



ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ



*Старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии
НИИ травматологии и ортопедии, к.м.н. Чернышова А.В.*

Астана, 20 октября 2017

«Иммунный статус» пациента это оценка состояния его иммунной системы в данный момент времени.

Иммунограмма – расширенный анализ крови, в котором исследуются компоненты иммунной системы.

Полноценный клинический анализ иммунограммы можно проводить лишь в комплексе с оценкой клинической картины и данных анамнеза!

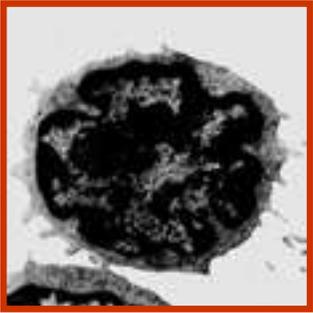
ПОКАЗАНИЯ К НАЗНАЧЕНИЮ ИММУНОГРАММЫ

- ▶ *Подозрение на наличие генетически обусловленных дефектов иммунной системы*
- ▶ *Аутоиммунные заболевания*
- ▶ *Аллергические заболевания*
- ▶ *Инфекционные заболевания с затяжным и хроническим течением*
- ▶ *Злокачественные новообразования*
- ▶ *Проведение цитостатической, иммунодепрессивной и иммуномодулирующей терапии*
- ▶ *Подготовка к полостным операциям*
- ▶ *Осложненное течение послеоперационного и/или послеродового периода*

ОСНОВНЫЕ ТЕСТЫ ИММУНОГРАММЫ

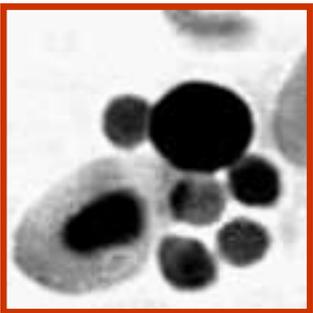
- ▶ *Субпопуляционный состав лимфоцитов и их количественное соотношение;*
- ▶ *Основные классы иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgM);*
- ▶ *Фагоцитоз;*
- ▶ *Белки системы комплемента;*
- ▶ *Циркулирующие иммунные комплексы.*

Эволюция исследований



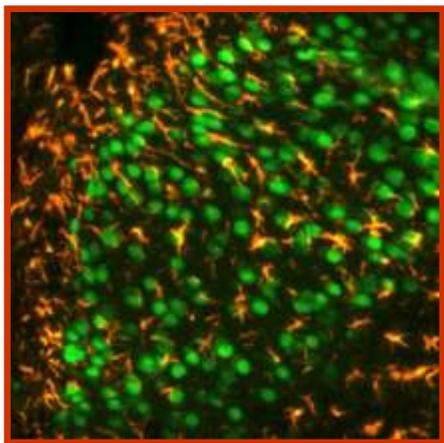
МОРФОЛОГИЯ

- *лимфоциты*
- *фагоциты*
- Т- и В-лимфоциты морфологически не отличаются →



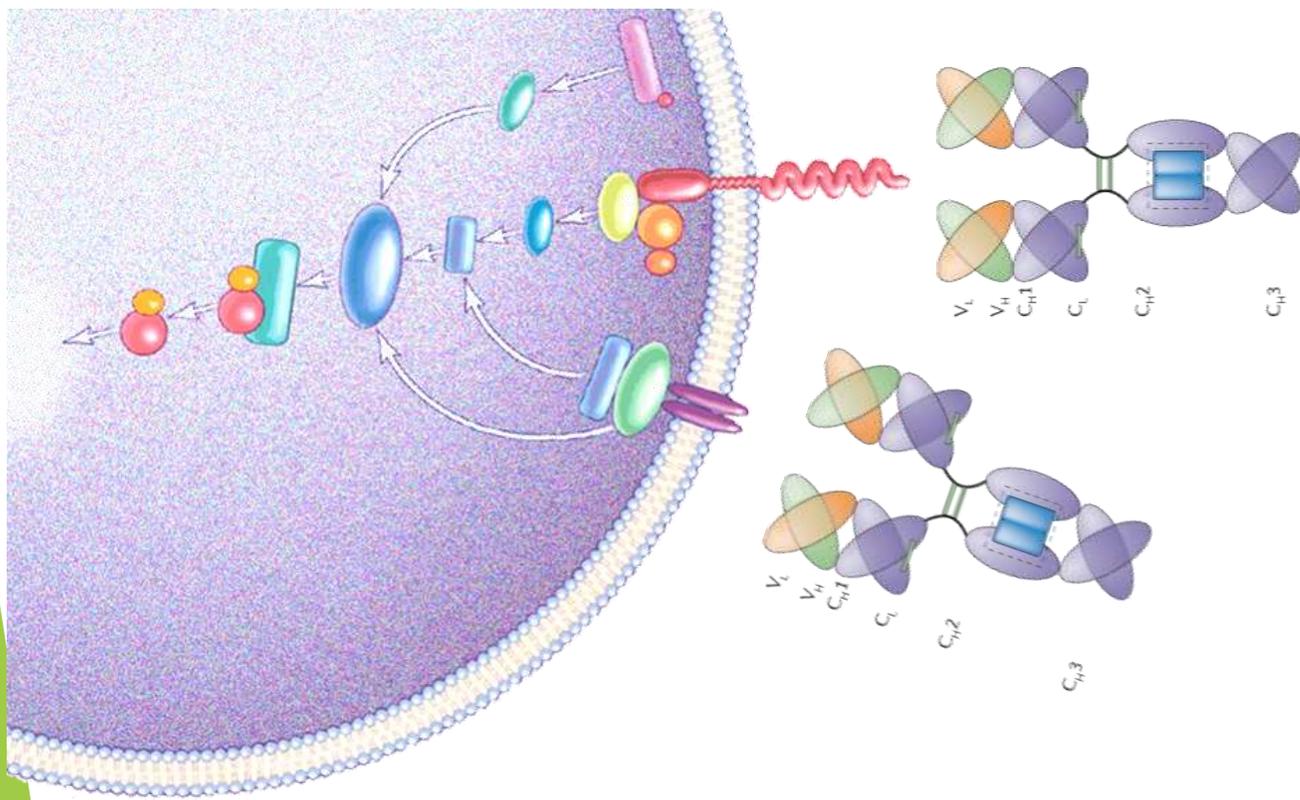
РОЗЕТОЧНЫЕ ТЕСТЫ

- *Т-лимфоциты* (Е-РОК)
- *Т-хелперы* (Т μ) и *Т-супрессоры* (Т γ)
- *В-лимфоциты* (ЕАС-РОК)
- большие погрешности + высокое индивидуальное мастерство →



АНТИСЫВОРОТКИ и МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

- *субпопуляции лимфоцитов и новые популяции ИКК*
- *стадиеспецифические маркеры*: дифференцировочные и функциональные (>100 шт.)
- получение новых антител



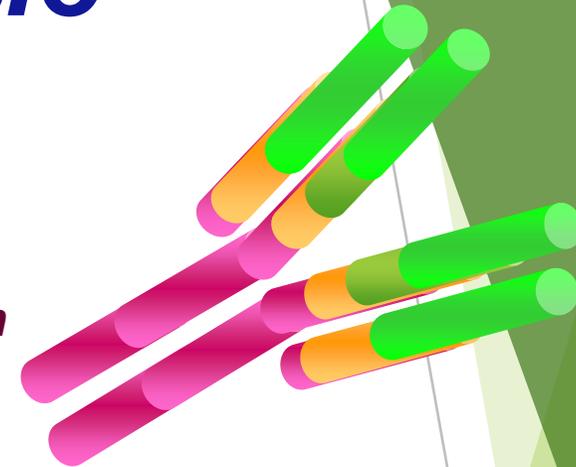
Моноклональные антитела



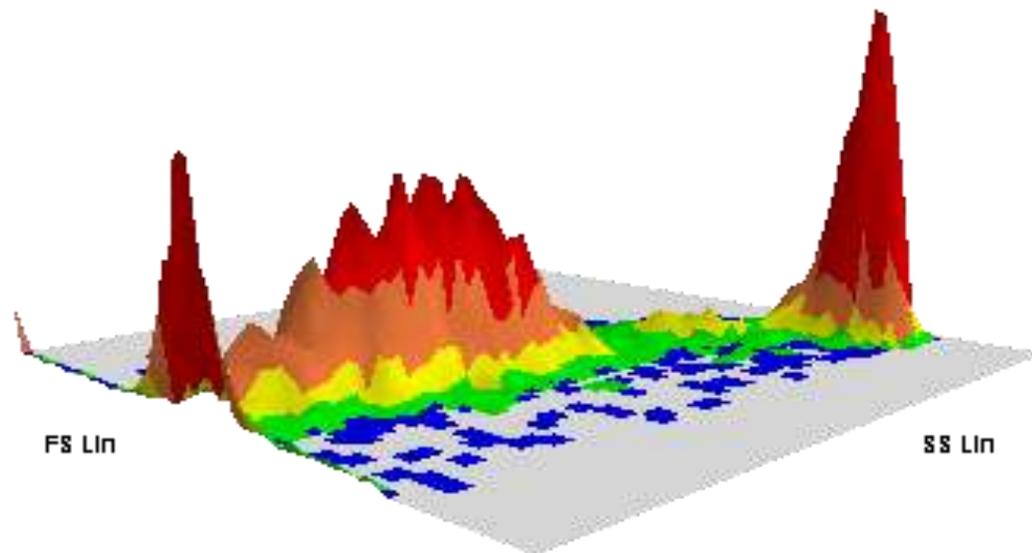
CD = The Cluster of Differentiation
Система классификации всех
антител против антигенов
человека.

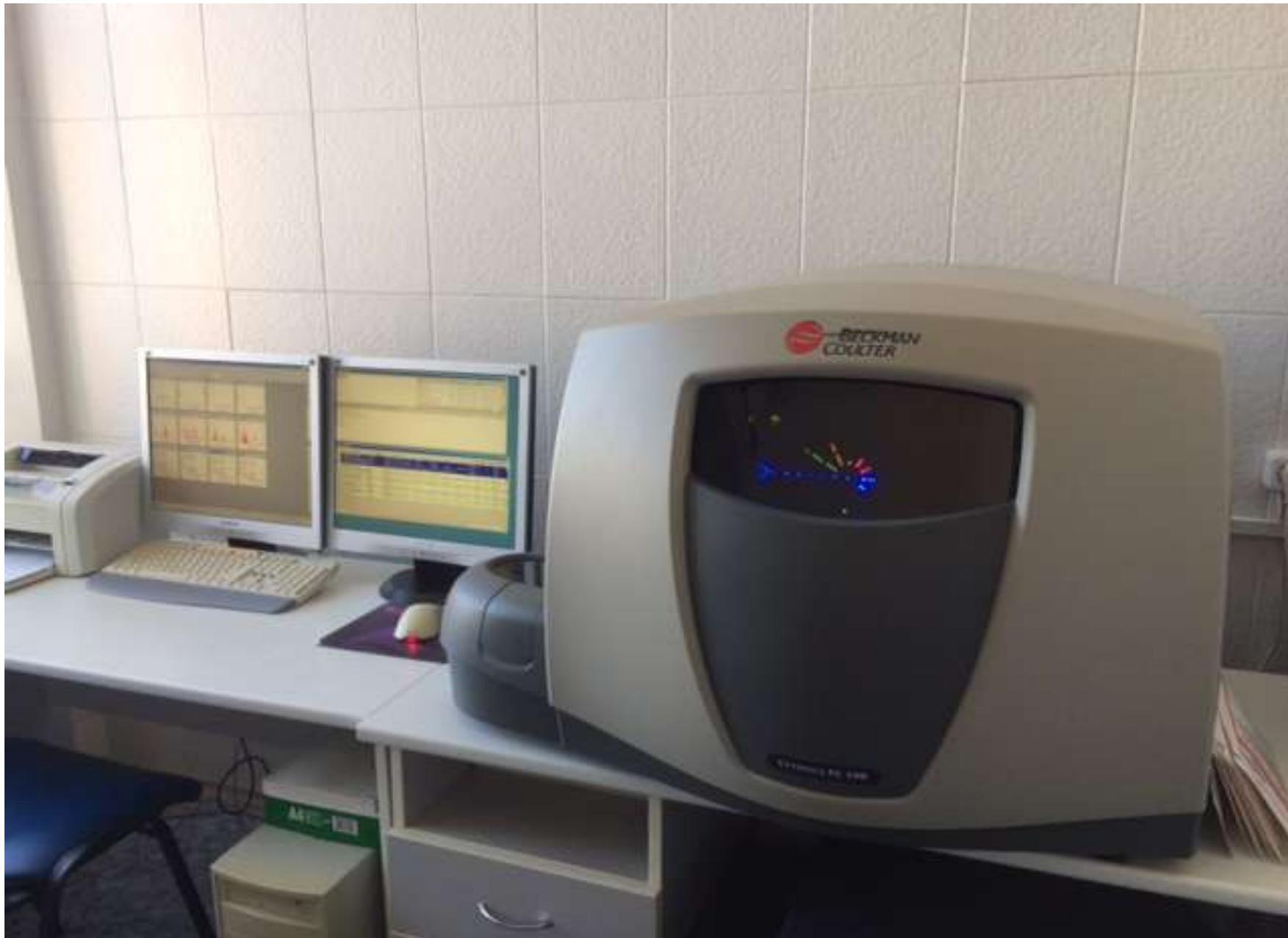
Определяется на рабочих
совещаниях (HLDA-10 Workshop).

CD включает все клоны антител
распознающих одни и те же
антигены, но не их эпитопную
специфичность.



Проточная цитометрия - современная технология быстрого измерения поверхностных и внутриклеточных маркеров клеток.





ОСНОВНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ

Основные субпопуляции лимфоцитов	Маркеры дифференцировки	Описательное название субпопуляции
Т-лимфоциты	CD3+	Т-лимфоциты
	CD3+CD4+	Т-хелперы
	CD3+CD8+	цитотоксические Т-лимфоциты
	CD3+(CD16+56+)	Т-киллеры
В-лимфоциты	CD19+CD20+CD22+CD5+CD27+	
Натуральные киллеры	CD3-CD(16+56+)	

- ▶ CD25+ на CD3+CD4+ для количественной оценки активированных лимфоцитов
- ▶ HLA-DR на В-лимфоцитах, моноцитах и активированных Т-лимфоцитах

Наиболее часто используемая панель для определения иммунного статуса
гейтирование по CD45

FITC

IgG

CD45

CD45

CD3

CD3

CD3

CD3

CD3

PE

IgG

CD14

CD3

CD19

CD4

CD8

CD56 (+/-CD16)

HLA-DR

Контроль

Гэйт (в комбинации без CD45)

Т-лимфоциты

В-лимфоциты

Т-хелперы

Т-цитотоксические

NK-клетки

Т-активированные

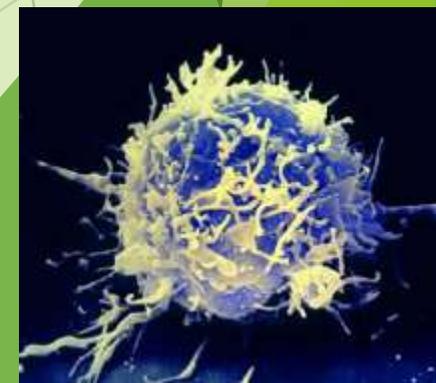
T-лимфоциты (CD45+CD3+)

61-85%

T-лимфоциты - это сложная по составу группа клеток, которая происходит от полипотентной стволовой клетки костного мозга, а созревает и дифференцируется в тимусе. Общим маркером для T-лимфоцитов является CD3.

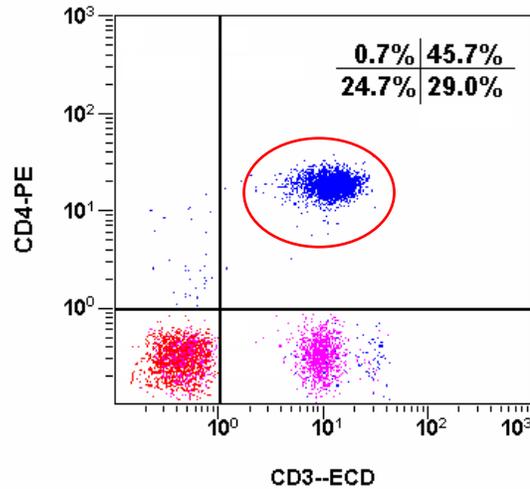
В организме T-лимфоциты обеспечивают клеточную форму иммунного ответа (ГЗТ, трансплантационный иммунитет, противоопухолевый иммунитет), определяют силу и продолжительность иммунной реакции.

T-лимфоциты также разделяют на две субпопуляции: иммунорегуляторы и эффекторы.

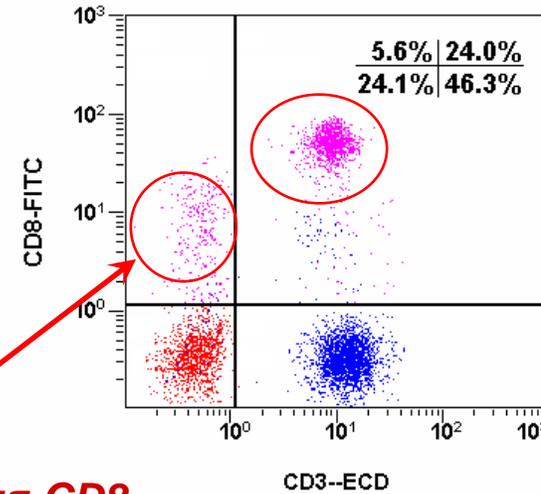


Анализ Т-клеток

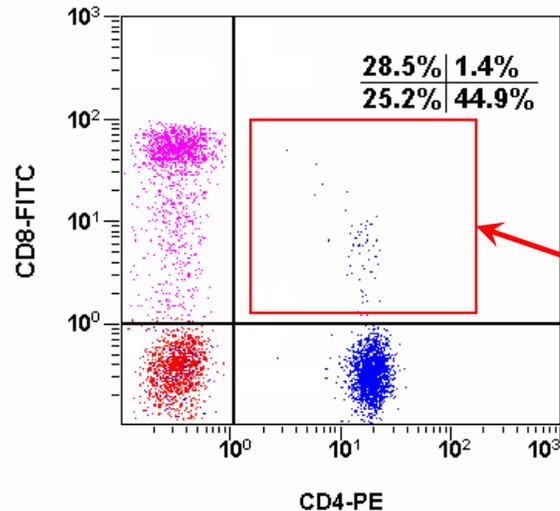
Т-клетки хелперы 35-55%



Цитотоксические Т-клетки 19-35%



Экспрессия CD8 на НК-клетках



CD4+CD8+ Т-клетки высоко дифференцированные Т-клетки памяти, действующее в адаптивном иммунном ответе против инфекционных агентов.

Клинические ситуации, ассоциированные с изменениями Т-лимфоцитов

Повышение:

- ▶ Острые и хронические инфекции
- ▶ Гормональный дисбаланс
- ▶ Длительный прием лекарственных препаратов (особенно монотерапия)
- ▶ Прием БАД
- ▶ Интенсивные занятия спортом
- ▶ Беременность
- ▶ Т-клеточные лейкозы

Понижение:

- ▶ Иммунодефициты
- ▶ Алкогольный цирроз печени
- ▶ Карцинома печени
- ▶ Аутоиммунные заболевания
- ▶ Некоторые опухоли
- ▶ Облучение
- ▶ Дефицит белка, железа
- ▶ Прием иммуносупрессивных препаратов и кортизола

Клинические ситуации, ассоциированные с изменениями Т-хелперов

Повышение:

- ▶ Аутоиммунные заболевания
- ▶ Отдельные Т-клеточные лейкозы
- ▶ Некоторые инфекции
- ▶ Отравление солями бериллия

Понижение:

- ▶ ИДС
- ▶ ВИЧ
- ▶ Вирусные инфекции
- ▶ Прием иммуносупрессивных препаратов и ГКС

Клинические ситуации, ассоциированные с изменениями цитотоксических Т-лимфоцитов

Повышение:

- ▶ Отдельные Т-клеточные лейкозы
- ▶ Некоторые вирусные инфекции
- ▶ Наркоз
- ▶ Стресс
- ▶ Острая фаза аллергии
- ▶ Менопауза

Понижение:

- ▶ Некоторые виды аутоиммунной патологии
- ▶ Прием иммуносупрессивных препаратов

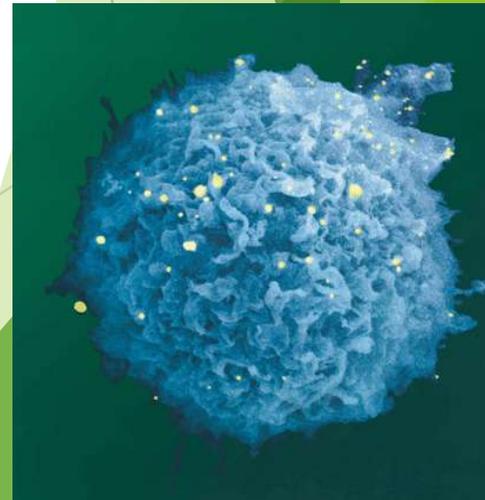
В-лимфоциты CD19+;CD20+;CD21+;CD5+;CD27+

7-17%

Из костного мозга пре-В-клетки мигрируют в тимуснезависимые зоны лимфоидных органов.

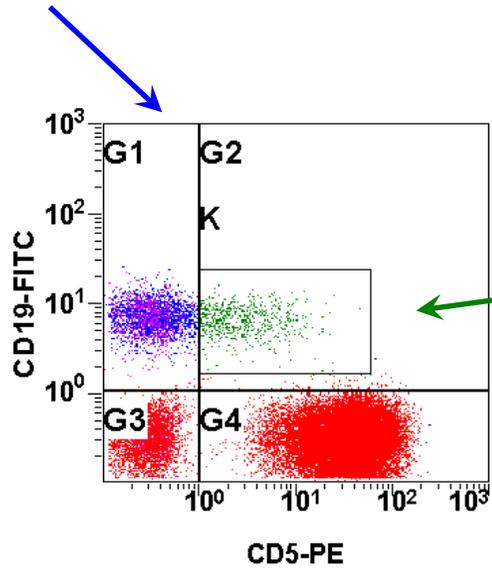
После антигенной стимуляции В-лимфоциты дифференцируются в

- *плазматические клетки* (интенсивно синтезирующие и секретирующие АТ)
- *В-клетки памяти* **CD19⁺CD27⁺CD5⁻**.
- Основная функция заключается в том, чтобы в ответ на стимуляцию антигеном произошли дифференцировка и размножение клеток, синтезирующих антитела к данному конкретному антигену.

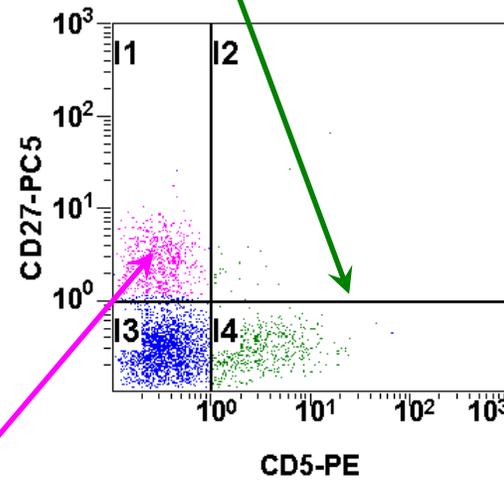
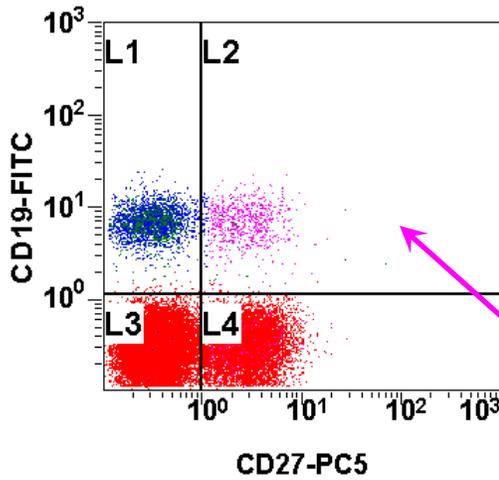
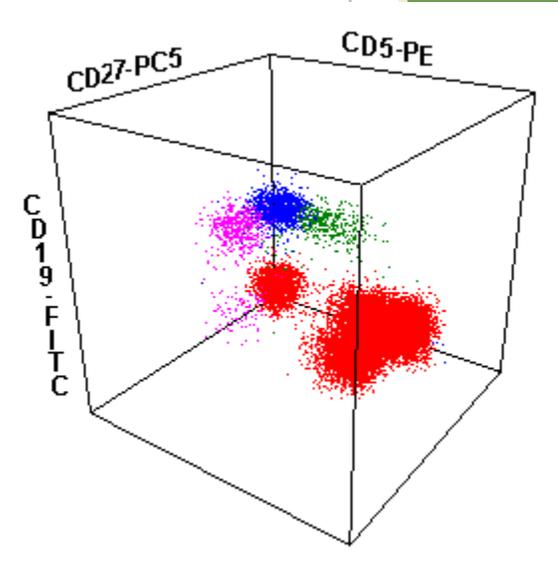


Анализ В-клеток

B-2 (CD19⁺CD5⁻)



B-1 – аутореактивный клон (CD19⁺CD5⁺)



В-клетки памяти (CD19⁺CD27⁺CD5⁻)

Клинические ситуации, ассоциированные с изменениями В-лимфоцитов

Повышение:

- ▶ Ряд аутоиммунных заболеваний (рассеянный склероз, ревматоидный артрит)
- ▶ В-клеточные лимфомы
- ▶ Стресс
- ▶ Длительная экспозиция формальдегидом

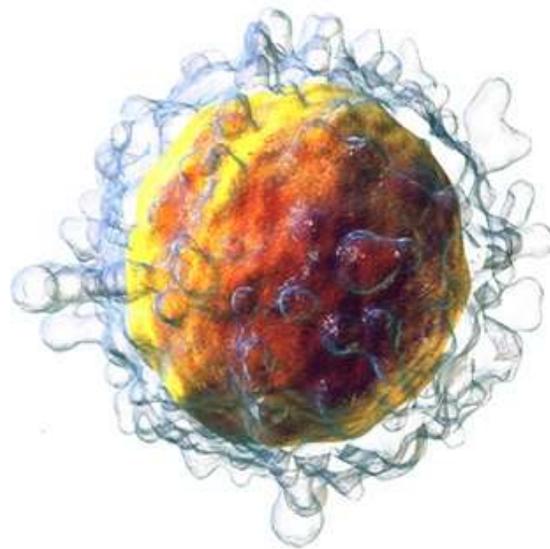
Понижение:

- ▶ ОВИН
- ▶ ПИД
- ▶ Менопауза
- ▶ Алкогольный цирроз печени
- ▶ Бактериальные инфекции дыхательного тракта
- ▶ Бактериальные инфекции желудочно-кишечного тракта

НК-клетки 5-20%

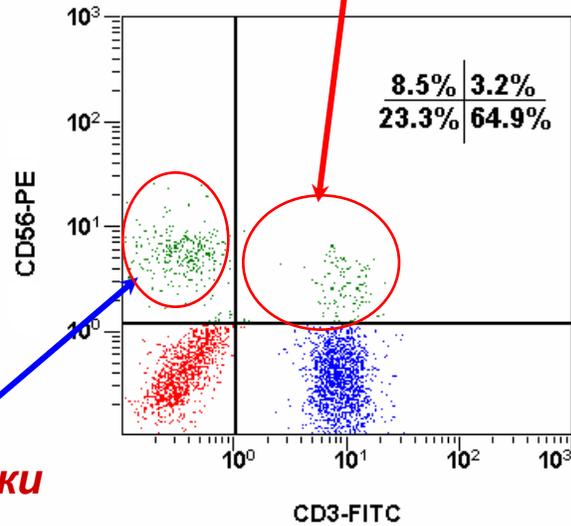
Это популяция лимфоцитоподобных клеток, обладающих противоопухолевой, противовирусной и противопаразитарной активностью.

Способны лизировать определенные клетки-мишени без предварительного контакта.

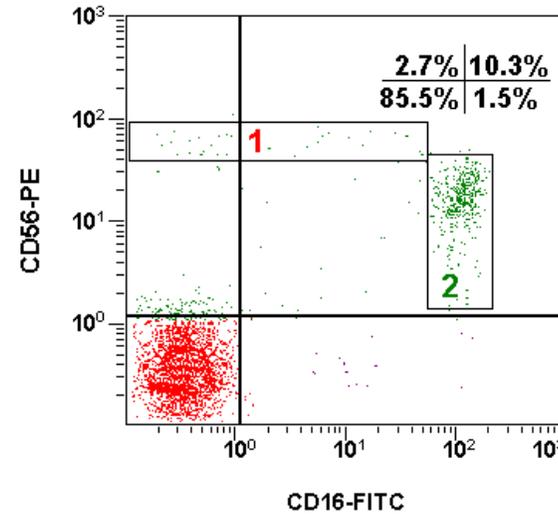


Анализ НК-клеток

НКТ клетки



Анализ по зоне CD45



1 - CD16^{dim-to-neg}CD56^{bright} - секретируют IFN-γ и другие цитокины, имеют меньшую цитолитическую активность.

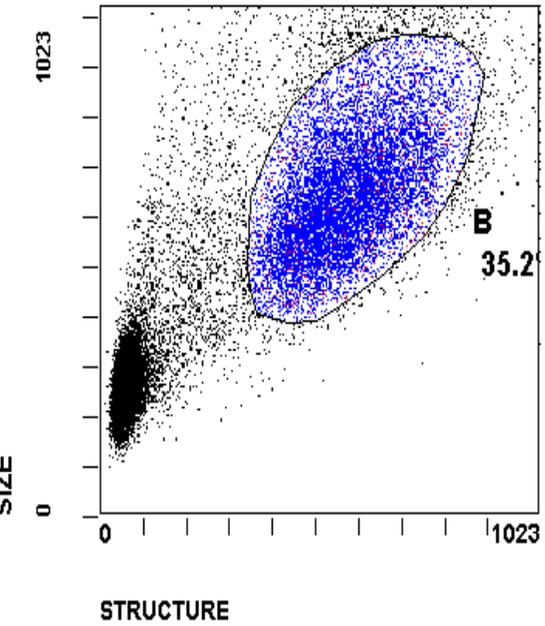
2 - CD16^{bright}CD56^{dim} - слабо секретируют цитокины, но обладают высокой цитолитической активностью.

Интервалы распределения основных и малых популяций лимфоцитов в периферической крови практически здоровых лиц.

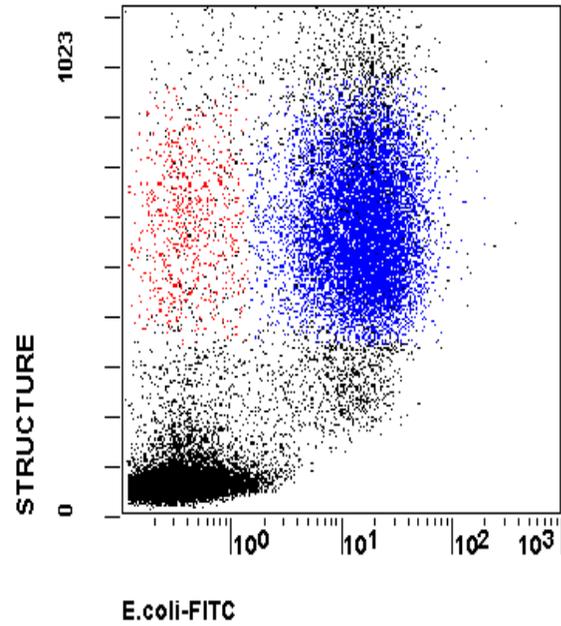
Субпопуляции	Содержание	
	Относительно лимфоцитов (%)	Абсолютное количество (Кл x 10 ⁹ /л)
В-клетки (CD3-CD19+HLA-DR+CD45+)	7,0 – 17,0	0,111-0,376
В-1 клетки (CD19+CD5+CD27-CD45+)	0,5 – 2,1	0,022-0,115
В-2 клетки (CD19+CD5-CD27-CD45+)	6,5 – 14,9	0,081-0,323
В-клетки памяти (CD19+CD5-CD27+CD45+)	1,8 – 6,8	0,012-0,040
NK-клетки (CD3-CD16+CD56+CD45+)	8,0 – 18,0	0,123 - 0,369
NK-клетки цитолитические (CD3-CD16 ⁺ CD56 ^{dim} CD45+)	0,2 – 1,0	0,003 - 0,022
NK-клетки цитокин-продуцирующие (CD3-CD16 ⁻ CD56 ^{bright} CD45+)	7,8 – 17,0	0,120 - 0,347
Т-NK клетки (CD16-CD56+CD3+CD45+)	0,5 – 6,0	0,007 - 0,165
Т-клетки (CD3+CD19-CD45+)	61,0 – 85,0	0,946 - 2,079
Т хелперы (CD3+CD4+CD8-CD45+)	35,0 – 55,0	0,576 - 1,336
Т цитотоксические (CD3+CD8+CD4-CD45+)	19,0 – 35,0	0,372 - 0,974
Т-хелперы активированные/памяти (CD4+CD45R0+CD45RA±CD45+)	5,0 – 25,0	0,068 - 0,702
Т-хелперы наивные (CD4+CD45RA+CD45R0-CD45+)	20,0 – 40,0	0,272 - 1,123
Т клетки актив. (CD3+HLA-DR+CD25+CD45+)	0,5 – 6,0	0,007 - 0,165
Регуляторные Т-клетки (CD4+CD25 ^{bright} CD127-CD45+)	0,6 – 1,1	0,009 - 0,078
Индекс соотношения (Т-хелперы/Т цитотоксические)	1,5 – 2,6	

Фагоцитоз

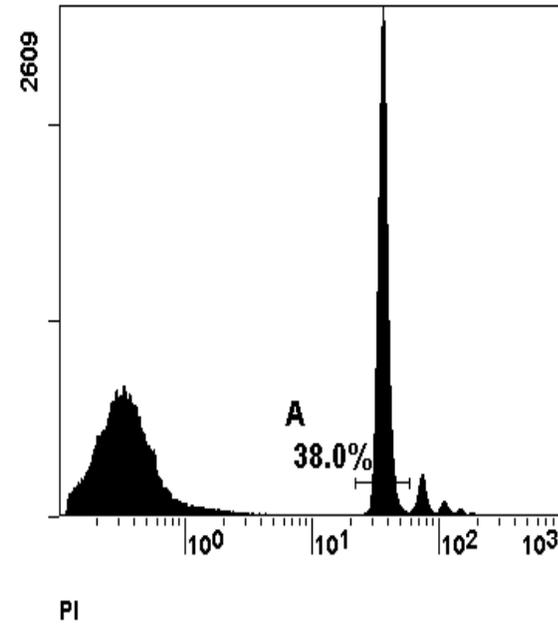
(F1)[A] Z0011596.LMD : SS/FS



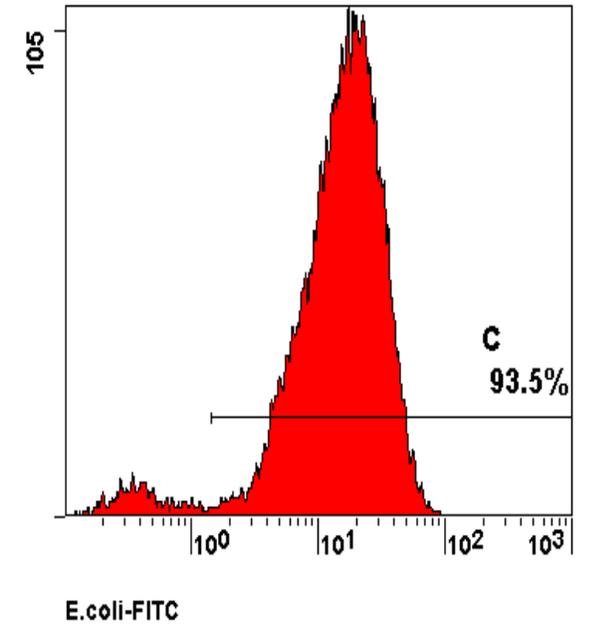
(F1)[A] Z0011596.LMD : FL1 LOG/SS



(F1)[Ungated] Z0011596.LMD : FL3 LOG



(F1)[A AND B] Z0011596.LMD : FL1 LOG



Оценка иммунного статуса – это не самоцель, а способ выявления дефектов иммунной системы.

Имунофенотипирование HLA B27 методом проточной цитометрии

Определение антигена HLA-B27 значимо в дифференциальной диагностике аутоиммунных заболеваний, клиника которых включает суставной синдром.

Серонегативные спондилоартропатии

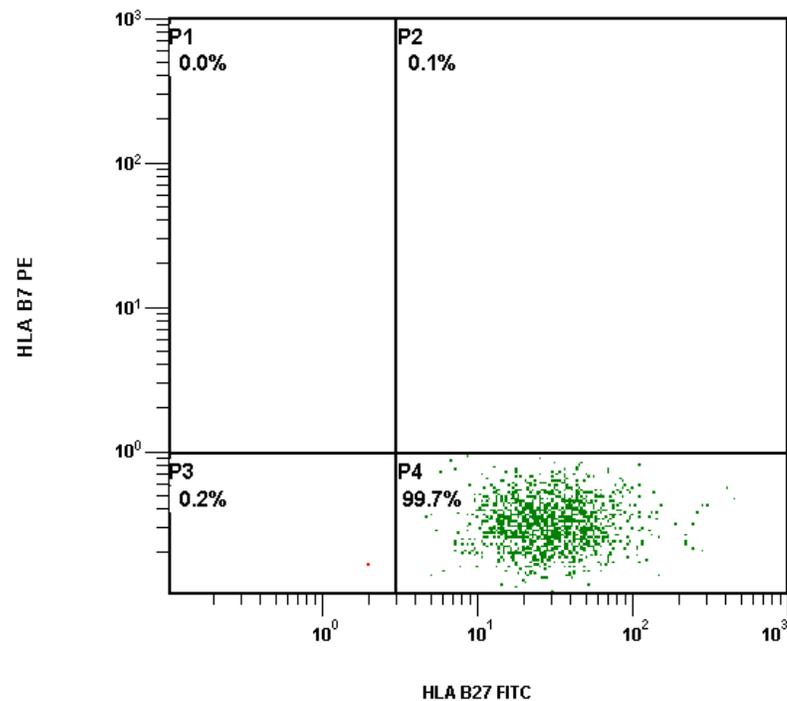
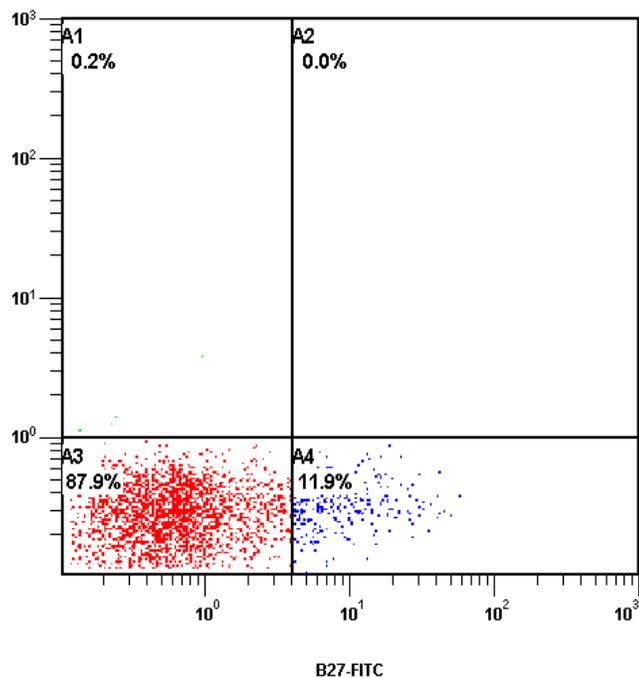
- группа воспалительных заболеваний опорно-двигательного аппарата, характеризующихся общностью клинико-рентгенологической картины с вовлечением в патологический процесс осевого скелета и отсутствием в сыворотке крови больных ревматоидного фактора.

При всех заболеваниях, входящих в эту группу, имеется высокая степень ассоциации с HLA B27.

Серонегативные спондилоартропатии

- идиопатический анкилозирующий спондилоартрит (болезнь Бехтерева)
- ювенильный анкилозирующий спондилоартрит (встречается в основном у мальчиков в возрасте 9-16 лет)
- реактивные (урогенитальные и постэнтероколитические) артриты, включая болезнь Рейтера
- псориатический артрит
- артриты при хронических воспалительных заболеваниях кишечника (болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, болезнь Уиппла)
- недифференцированный спондилоартрит

**В фенотипе лимфоцитов
антиген HLA B27 и HLA B7 не
выявлен**



**В фенотипе лимфоцитов антиген HLA B27
выявлен, в фенотипе лимфоцитов антиген
HLA B7 не выявлен**

Аллергодиагностика - тест активации базофилов

Allergenicity kit (Beckman Coulter)

Преимущества лабораторной диагностики

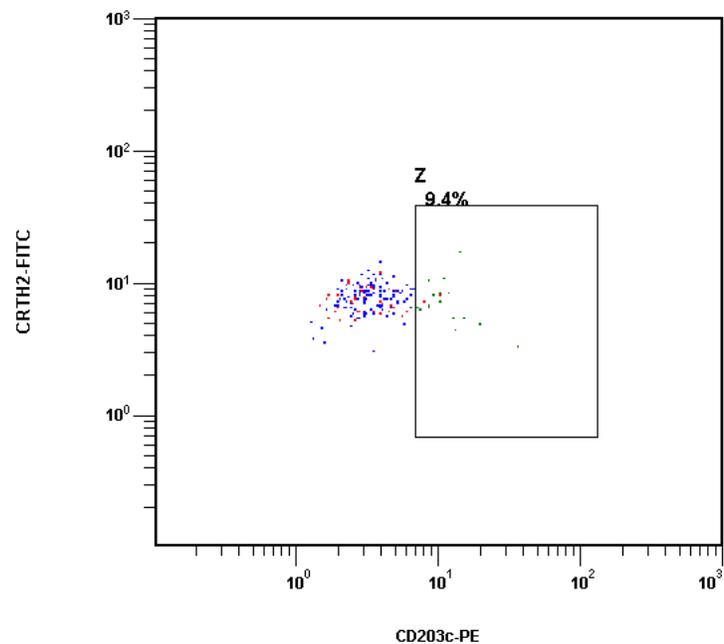
- Использование небольшого количества образца цельной крови
- Идентификация базофилов без их выделения
- Возможность исследования одновременно значительного количества аллергенов
- Отсутствие необходимости отмены антигистаминных препаратов
- Отсутствие противопоказаний для обследования
- Исключена возможность тяжелых реакций во время обследования
- Возможность тестирования различных классов лекарственных препаратов
- Получение результата в относительно короткие сроки

Недостатки лабораторной диагностики

- Возможность ложно-отрицательных результатов в период ремиссии
- Возможность ложно-положительных результатов, обусловленных наличием латентной сенсibilизации
- Высокая стоимость
- Использование высокотехнологичного оборудования, доступного в специализированных центрах

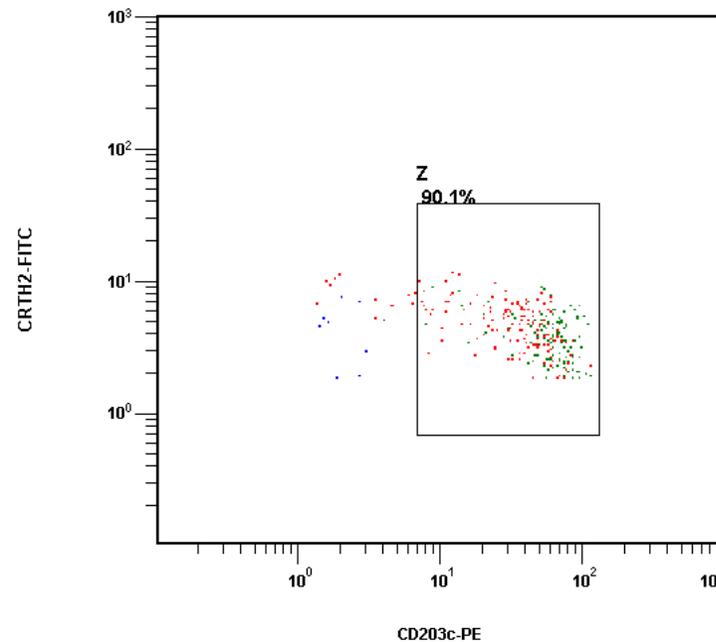
Гистограммы индуцированной активации базофилов

Гейт по регионам S, X и Y



Индукцированная активация базофилов
на аллерген коровьего молока

Гейт по регионам S, X и Y



Индукцированная активация базофилов
на аллерген домашней пыли





*Во, какое у нас
есть «богатство»!!!*