

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и  
микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБУ « НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России)

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор  
ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи»  
Минздрава России  
академик РАН



А.Л.Гинцбург

« 16 » марта 2020 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ  
ПО ПРОГРАММЕ КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ, АЛЛЕРГОЛОГИЯ  
подготовка научно-педагогических кадров высшей квалификации (аспирантура)  
30.06.01 Фундаментальная медицина

Москва 2020

## Организация исследования клеток и молекул иммунной системы.



Оснащение иммунодиагностической лаборатории в зависимости от этапов и задач исследования (Методы иммунологических исследований : лабораторный практикум / Т. Р. Романовская [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – 100 с)

### Общие принципы правильного забора материала:

- перед забором материала необходимо оценить соотношение риск/польза для пациента;
- по возможности забор клинического материала следует производить до назначения antimicrobial and immunomodulatory drugs;
- забор материала должен проводиться с использованием соответствующей техники, специального оборудования и строгим соблюдением правил асептики. Наиболее правильный способ взятия жидких материалов – объемно с помощью стерильного шприца. Отбор материала тампоном производят только при невозможности осуществления объемного метода (отделяемое женских половых органов, отделяемое ушей, глаз и т. д.). Свищи и фистулы первоначально очищают от отделяемого, и забор материала производят из глубины. Отделяемое из дренажей берут шприцем или используют концы удаленных дренажных трубок. Биоптаты из ран получают путем

иссечения участка ткани из глубоких слоев раны или производят забор отделяемого тампоном после тщательной обработки раны физиологическим раствором и 70° этиловым спиртом. Количество клинического материала определяется выбором методов исследования и разумной достаточностью. Нужно иметь в виду, что иммунодиагностические процедуры предполагают оценку свойств как клеток, так и гуморальных факторов, представленность которых различна в разных биологических средах, а, следовательно, различается и их диагностическая значимость.

**Виды биологических материалов, используемых для иммунологического исследования**

Виды материала	Возможность исследования	
	жидкой фракции	клеточной фракции
1. Периферическая кровь	+	+
2. Синовиальная жидкость	+	+
3. Перитонеальная жидкость	+	+ при патологических процессах
4. Плевральная жидкость	+	+ при патологических процессах
5. Слюна	+	-
6. Слезная жидкость	+	-
7. Ликвор	+	+ при патологических процессах
8. Раневой транссудат	+	+
9. Раневой экссудат	-	+/-
10. Моча	+	+ при патологических процессах
11. Желчь	+	-
12. Содержимое тонкого кишечника	+	-
13. Плотные ткани	-	+

**Используемые градиенты плотности при выделении клеток человека**  
[Cell separation methods and applications, ed. by D. Recktenwald, 1997]

Тип клеток	Плотность градиента, г/см <sup>3</sup>
Т-лимфоциты	1,077
В-лимфоциты	1,077
Моноциты	1,064
Гранулоциты	1,093
НК-лимфоциты	1,06
Эритроциты	1,115
Остеобласты	1,055

## **Методы сепарации, основанные на использовании моноклональных антител (МАТ)**

Гетерогенность клеточных популяций по экспрессируемым поверхностным клеточным маркерам позволяет, используя анти-CD МАТ, проводить специфическую сортировку клеток:

**1. Лазерная проточная сортировка** (FACS = fluorescence- activated cell sorting). Меченные флуорохромом анти-CD МАТ связываются с соответствующими поверхностными маркерами клеток. Внося клетки в проточную систему клеточного цитометра при прохождении ими оптической скамьи, происходит сортировка (сортинг) клеток – выделение клеток на основе параметров, измеряемых проточной цитометрией (схема сортера – лаб. занятие № 4).

**2. При иммуномагнитной клеточной сепарации** используются содержащие Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> полистироловые бусы (гранулы), покрытые анти-Ig моноклональными антителами (МАТ) либо анти-CD МАТ. Схематично прямая и непрямая иммуномагнитная клеточная сепарация представлена на рис. 1.5. При связывании МАТ, находящихся на бусах, с клеткой мишенью в магнитном поле уже через 2–3 минуты происходит разделение клеток. Затем, для последующих исследований у выделенных клеток можно избавиться от магнитных гранул спонтанно при инкубировании в культуральной среде в течение 24–72 ч, либо принудительно с помощью ферментов (папаина или О-сиалогликопротеазы) либо использовать анти Fab АТ.

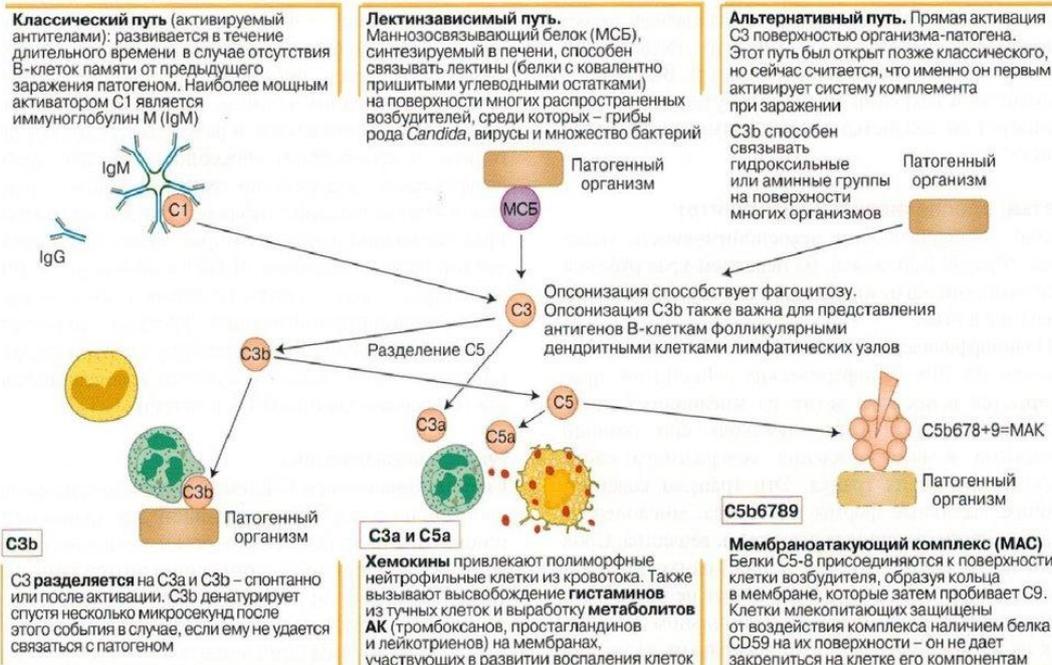
### **Контрольные вопросы**

1. Оснащение иммунологической лаборатории и особенности приобретения реактивов и оборудования для целей исследований иммунного статуса.
2. Правила техники безопасности при работе с биологическим материалом.
3. Методы утилизации биологического материала.
4. Цели и задачи иммунодиагностики.
5. Биологически среды, в которых присутствуют молекулы и клетки иммунной системы.
6. Виды биологических материалов и их использование для иммунологических/иммунодиагностических исследований.
7. Принципы фракционирования биологических материалов.
8. Процедуры подготовки клеток к иммунологическим исследованиям.
9. Методы разделения клеточных суспензий на градиентах плотности.
10. Методы сепарации клеточных суспензии с использованием моноклональных антител.

# Исследование системы комплемента

## Система комплемента

### Медиаторы воспаления: система комплемента



### Основные направления исследования системы комплемента

Направления исследования	Методы исследования
1. Определение концентрации основных компонентов системы комплемента	Серологический метод (реакция Манчини) или методы турбидиметрии и нефелометрии
2. Определение функциональной активности путей активации и отдельных компонентов комплемента	Функциональный метод – метод гемолитического титрования и его варианты
3. Определение концентрации субкомпонентов, не участвующих в каскаде активации (Ba, C4a, C3a, C5a)	Варианты иммунохимического анализа – иммуноферментный анализ (ИФА) или радиоиммунный анализ (РИА)

**Основные параметры, определяемые при оценки функциональной активности системы комплемента**

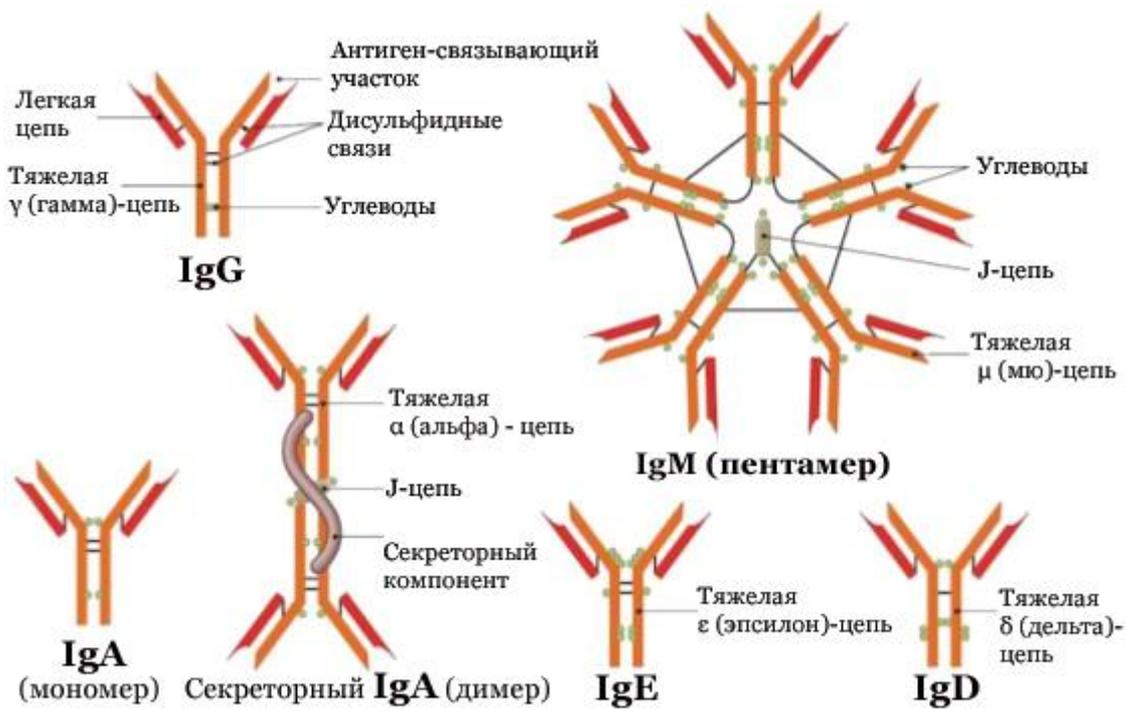
Направления исследования	Значение определяемых параметров
1. Определение концентрации основных компонентов СК	Есть возможность регистрации резкого снижения концентрации компонентов, что важно для констатации дефицита системы комплемента. Тесты диагностически значимы для заболеваний печени, ангионевротического отека (при дефиците C1-ингибитора). Кроме этого, снижение концентрации компонентов комплемента развивается при реакции активации системы и потреблении комплемента, при некоторых аутоиммунных заболеваниях
2. Определение функциональной активности путей активации и отдельных компонентов	Позволяет определить достаточность функциональной активности СК, что важно при диагностике системных аутоиммунных заболеваний, острых и хронических инфекционных заболеваниях, сопровождающихся иммунопатологическими реакциями
3. Определение концентрации субкомпонентов, не участвующих в каскаде активации (Ba, C4a, C3a, C5a)	Позволяет определить, по какому пути происходит активация СК и связано ли снижение активности или концентрации СК с ее дефектами, или это снижение – результат активации и потребления компонентов

**Контрольные вопросы**

1. Система комплемента, состав, особенности биосинтеза.
2. Пути активации системы комплемента. Функции компонентов и субкомпонентов комплемента. Регуляция активности системы комплемента.
3. Физиологическая и патофизиологическая роль системы комплемента.

# Методы исследования уровня иммуноглобулинов в биологическом материале

## Классы иммуноглобулинов



## Свойства иммуноглобулинов

Свойства иммуноглобулинов	Класс иммуноглобулинов				
	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Молекулярная масса	160	900	170-350	160	190
Скорость седиментации, S	7	19	7-13	7	8
Количество мономеров	1	5	1,2,4	1	1
Период полураспада, сутки	21	5	6	3	2
Термостабильность	+	+	+	-	-
Прохождение через плаценту	+	-	-	-	-
Активация комплемента по классическому пути	+	+	-	-	-
Нейтрализация токсинов	+	+	-	-	-
Агглютинация, преципитация антигенов	+	+	-	-	-
Бактериолиз, опсонизация	+	+	-	-	-
Цитофильность	+	-	+	?	+

Методы исследования Ig включают в себя определение уровня Ig разных классов и подклассов и АТ к определенным АГ. Классические методы иммунохимического анализа основаны на регистрации образованного антителами в присутствии АГ преципитата, однако для визуальной регистрации процесса преципитации необходимы высокие концентрации компонентов и длительное время проведения реакции. Результаты такого анализа не всегда можно однозначно интерпретировать и, кроме того, в большинстве случаев они носят качественный или полуколичественный характер. Кроме того, для многих одновалентных АГ (гаптенов), например гормонов, лекарственных соединений, эти методы непригодны. Индикация образовавшегося комплекса АГ-АТ в растворе может быть осуществлена, если в один из исходных компонентов реакционной системы ввести метку – изотопную, ферментную, флуоресцентную, парамагнитную, которая легко детектируется соответствующим физикохимическим методом.

Условно методы иммунохимического анализа можно разделить на четыре большие группы:

1) прямые (непосредственные) методы определения реакции АГ-АТ. Образующийся при этом комплекс АГ-АТ идентифицируется визуально в процессе постановки реакции агглютинации (бактериальных клеток и простейших) и гемагглютинации (реакции агглютинации эритроцитов антителами или вирусами) либо при помощи простых оптических устройств (методами нефелометрии и турбодиметрии);

2) реакции пассивной агглютинации, т. е. агглютинации частиц, с поверхностью которых связаны АГ или АТ. К этим методам относятся реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и непрямой гемагглютинации (РНГА), латексагглютинации,

коаггутинации, агглютинации частиц бентонита, желатиновых капсул, частиц сефарозы и др.;

3) индикаторные методы, основанные на использовании различного рода меток для выявления реакции АГ-АТ. Наиболее распространены иммуноферментный, иммунофлуоресцентный, радиоиммунологический анализ; 4) иммуносенсоры

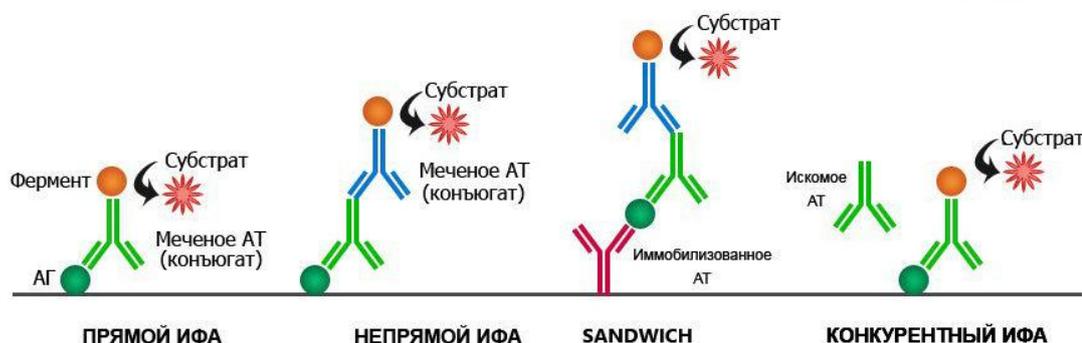
### Основные принципы ИФА:

- комплекс АГ-АТ можно выявить, если ввести в состав одного из участников иммунной реакции (ковалентно присоединить) одну или несколько молекул фермента. Причем процесс конъюгирования с ферментом ни на промежуточных (в процессе конъюгирования), ни на финальной стадии (конъюгат антигена или антитела с ферментом) не должен изменять иммунные свойства фермент-меченого участника иммунной реакции;

- проявление ИК осуществляется с использованием способности фермента расщеплять субстрат, который при ферментативной модификации изменяет свой цвет. Способ детекции – спектрофотометрический;

- ИК можно выявлять как в растворе, так и при адсорбции (или ковалентной иммобилизации) на твердом носителе. Выделяют следующие виды ИФА: твердофазный (иммобилизированные антитела сорбированы на твердом носителе, например, полистирольном планшете), гомогенный (в гомогенном растворе), флуоресцентный (с использованием флуоресцентных меток). В зависимости от стадийности выполнения различают прямой, непрямой ИФА и ИФА с комплементом.

В иммунодиагностике ИФА нашел широкое применение для количественного анализа субклассов Ig. Иммуноферментный анализ, основе которого лежит применение антител, связанных с ферментом, в англоязычной литературе получил название ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

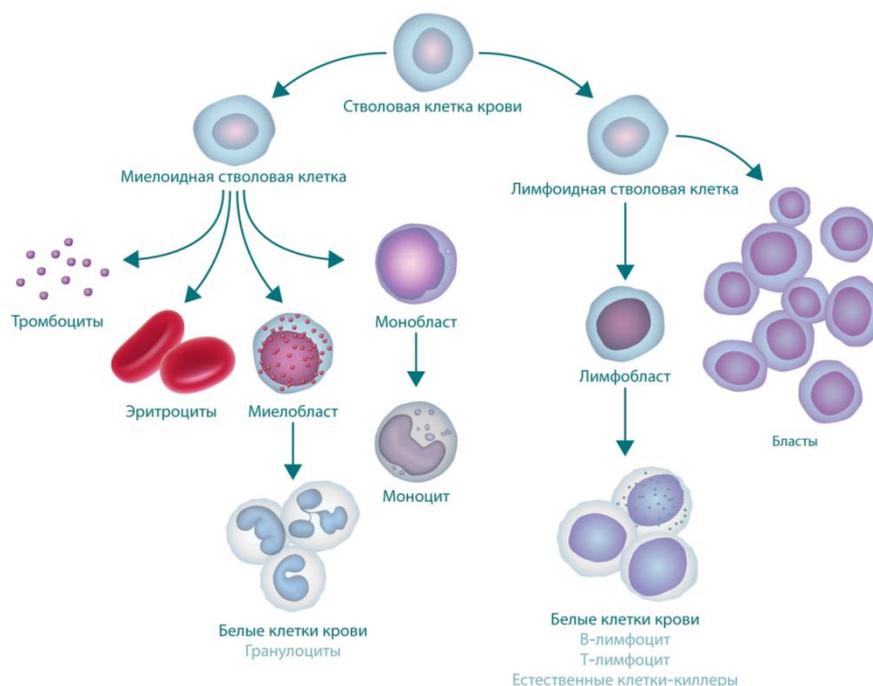


### Контрольные вопросы

1 Структура молекулы АТ. Функции отдельных участков молекулы Ig.

2. Нормативные показатели концентрации Ig разных классов сыворотки крови человека.
3. Физиологическое и патофизиологическое значение Ig разных классов.
4. Методы определения концентрации основных изотипов иммуноглобулинов (реакция простой радиальной иммунодиффузии по Манчини).
5. Реакции серологического метода и их значение в детекции антител.

## Количественное исследование субпопуляций лимфоцитов



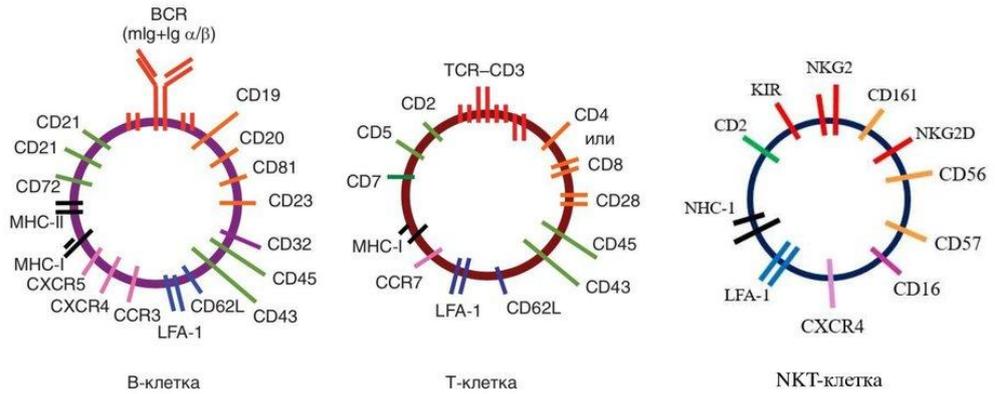
HORNEWS

На мембране иммунокомпетентных клеток (ИКК) экспрессируется большое количество гликопротеиновых молекул, которые выполняют функцию рецепторов и классифицированы по системе Cluster of differentiation (CD).

В зависимости от экспрессируемых ИКК рецепторов можно определить следующие параметры:

- 1) принадлежность клетки к той или иной субпопуляции;
- 2) стадию дифференцировки лимфоцита;

3) функциональное состояние иммунного ответа (активированные или неактивированные ИКК). Метод определения совокупности рецепторов/маркеров ИКК и, как следствие, принадлежности клеток к той или иной популяции называется иммунофенотипированием и имеет решающее значение в исследовании состояния иммунной системы человека.



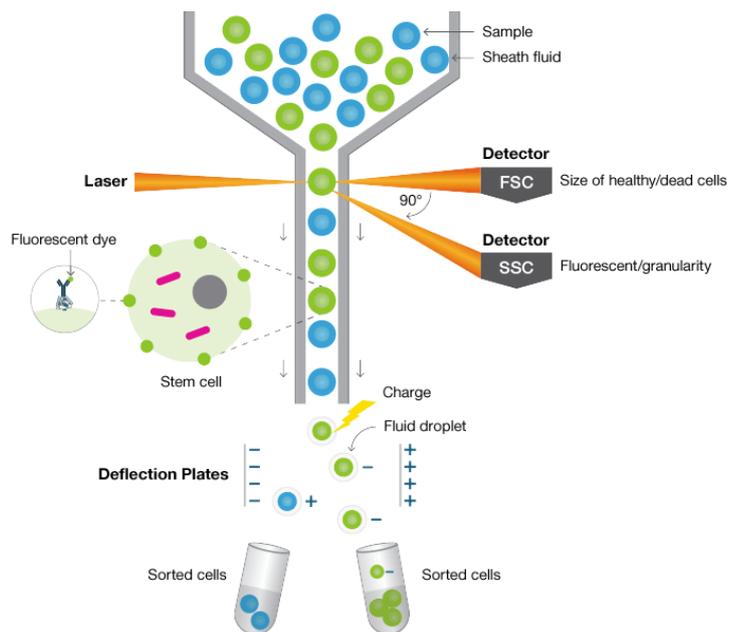
Мембранные маркеры лимфоцитов. Мембранные молекулы отмечены линиями, пересекающими круг. Цветом выделены разные функциональные группы молекул.

### Используемые флуорохромы в иммунофлуоресценции

Флуорохром	Пик возбуждения (нм)	Пик эмиссии (нм)	Лазер* (нм)	Цвет флуоресцентной эмиссии
FITC, Fluorescein Isothiocyanate	495	520	488 А	зеленый
PE, Phycoerythrin	564	576	488 А	желтый
TX, Texas Red	595	620	595	оранжевый
APC, Allophycocyanin	650	660	630 Н	красный
PE-Cy7, Phycoerythrin-cyanine7 conjugate	495	755	488 А	инфракрасный

Примечание. \* А – аргон-ионный лазер, Н – гелий-неонный лазер.

### Схема клеточного сортера



### **Контрольные вопросы**

1. Субпопуляционная дифференцировка ИКК на основе мембранных рецепторов.
2. Функции основных мембранных рецепторов лимфоцитов.
3. Основные стадии лимфопоэза и смена мембранных маркеров лимфоцитов в процессе лимфопоэза и иммуногенеза.
4. Принцип работы проточного цитофлуориметра.

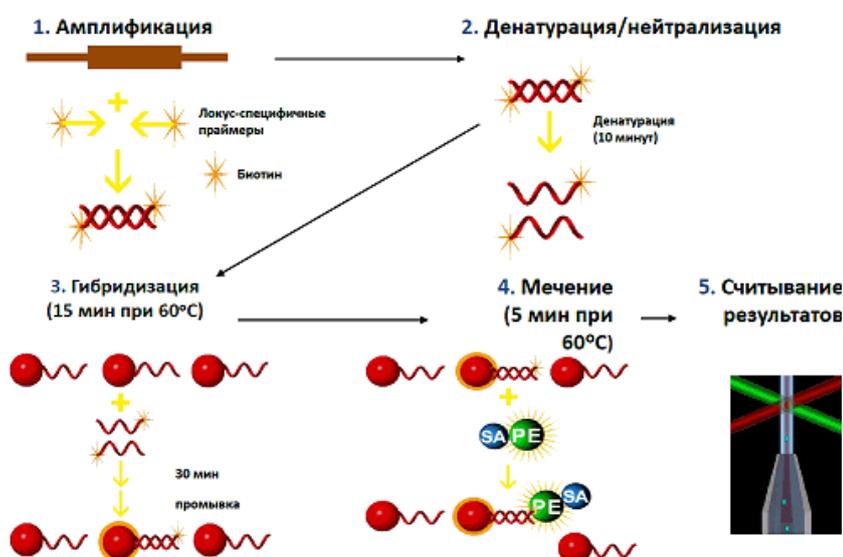
## Типирование молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС)

Типирование молекул и/или генов ГКГС представляет собой чрезвычайно важную задачу, позволяющую решить ряд иммунодиагностических проблем. Типирование ГКГС используют в трансплантологии, при диагностике аутоиммунных заболеваний, а также в научноисследовательских целях (при исследовании процессов эволюции и становления рас и народностей), причем варианты типирования ГКГС различны как по определяемым параметрам, так и по решаемым задачам:

**Области применения типирования молекул и генов главного комплекса гистосовместимости**

Области медицины	Трансплантология	Диагностика аутоиммунных заболеваний
Показатели		
Спектр определяемых параметров	Типирование проводится в отношении максимально большого количества определяемых молекул/генов ГКГС	Проводится определение лишь тех конкретных молекул ГКГС, которые связаны с развитием диагностируемого заболевания
Решаемые задачи	Позволяет определить совместимость пары донор-реципиент и минимизировать возможность развития отторжения трансплантата	Позволяет определить генетическую предрасположенность к развитию заболевания, либо подтвердить диагноз

Методы типирования молекул HLA (или ГКГС человека) условно можно разделить на 2 группы: фенотипические, то есть определение антигенной специфичности молекул HLA и молекулярногенетические – идентификация различных локусов генов системы HLA, характерных для индивидуума.



Процедура генотипирования

### Генотипирование супружеской пары (HLA) II класса

HLA-типирование супруги

Лocus DRB1: 04,11  
Лocus DQA1: 0301,0501  
Лocus DQB1: 0301,0302

HLA-типирование супруга

Лocus DRB1: 04,15  
Лocus DQA1: 0102,0301  
Лocus DQB1: 0302,0602-8

HLA-типирование пары

Выявлено четыре совпадения по трем локусам.

Результат генотипирования

### Контрольные вопросы

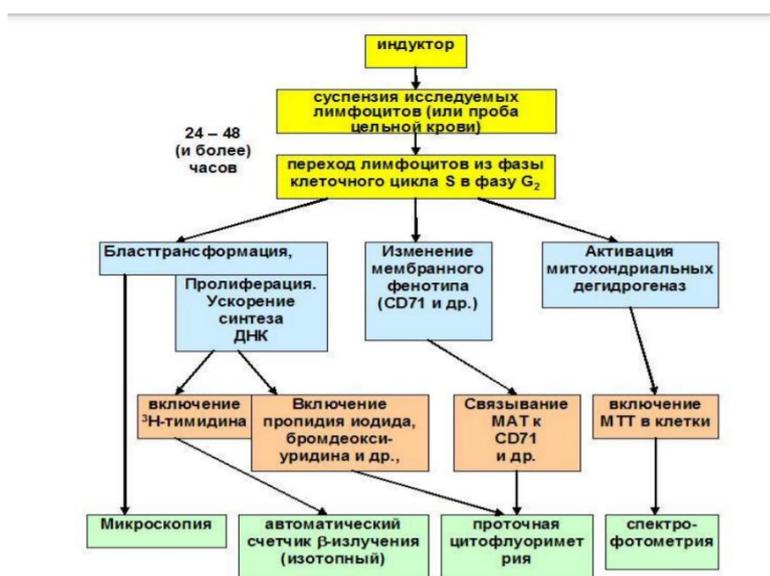
1. Генетическая карта главного комплекса гистосовместимости. Функции.
2. Понятие о генах и антигенах гистосовместимости. HLA система человека.
3. Номенклатура, ее особенности.
4. Понятие HLA фенотипа, генотипа, гаплотипа. Особенности наследования.
5. Методы исследования и типирования HLA системы: серологические, молекулярно-генетические.
6. Практические аспекты типирования HLA антигенов. HLA в популяциях, биологическое значение.
7. HLA и заболевания человека, механизмы ассоциации.

## Исследование цитотоксической и пролиферативной активности лимфоцитов

Существует большое количество методов оценки функциональной активности лимфоцитов. Как правило, методы оценки функциональных свойств лимфоцитов отличаются необходимостью значительного количества клеток, длительностью исследования, требуют специального оборудования. В то же время диагностическое значение получаемой информации не всегда адекватно поставленным задачам, что связано с особенностями доступных для исследования лимфоцитов. В силу данных причин введение многих методик оценки функциональных свойств в иммунодиагностическую практику затруднено, а спектр научно-исследовательских методов более обширен. В настоящее время оценка функциональных свойств лимфоцитов в рамках иммунодиагностики включает три основных направления, обладающих собственной диагностически значимой информацией.

### Основные направления исследований функциональных свойств лимфоцитов

Направление исследования	Предмет исследования
1) пролиферативная активность лимфоцитов	способность клеток реагировать на активационный сигнал бластной трансформацией, вступлением в митотический цикл и последующей пролиферацией
2) цитокинпродуцирующая активность лимфоцитов и других типов иммунокомпетентных клеток	регуляторные функции клеток и особенностей механизмов иммунных реакций
3) эффекторные функции лимфоцитов, включая цитотоксическую активность, продукцию антител, развитие ГЗТ	способность к развитию эффекторных реакций лимфоцитов, выполняемых клетками в рамках эффекторной/продуктивной фазы иммунного ответа



## Основные феномены пролиферации лимфоцитов и методы их регистрации

### Сравнение способов регистрации результатов пролиферативного теста

Способы регистрации результатов пролиферативного теста	Достоинства	Недостатки
Микроскопический	Высокая специфичность, легко определить возможную бактериальную контаминацию	Низкая производительность, длительность учета, высокие трудовые. Высокое значение субъективного фактора
Изотопный	Высокая специфичность, высокая производительность. Отсутствие субъективности при учете	Требуются условия для работы в лаборатории с радиоактивными изотопами. Есть проблема дифференцировки пролиферации клеток от бактериальной контаминации (при размножении бактерий происходит быстрое включение <sup>3</sup> H-тимидина)
Проточная цитофлюориметрия	Высокая специфичность, высокая производительность. Отсутствие субъективности при учете	Высокая стоимость реактивов и оборудования
Спектрофотометрия (МТТ-тест)	Высокая специфичность, высокая производительность. Отсутствие субъективности при учете	Требуется большее, чем в других случаях, количество клеток, а значит для исследования следует забирать большее количество материала

### Основные подходы к исследованию эффекторных функций лимфоцитов в условиях *in vitro* и *in vivo*

Уровень оценки	Эффекторные функции лимфоцитов		
	Цитотоксичность лимфоцитов	Активность ГЗТ	Продукция антител
<i>In vivo</i>	Определение спонтанного уровня цитотоксичности, а также количества и активности киллерных клеток по экспрессии специфичных для них маркеров	Внутрикожные пробы с туберкулином и другими антигенами, могут быть использованы и митогены	Решается в рамках серологического или иммунохимического исследования
<i>In vitro</i>	Определение уровня цитотоксической активности в биологических тестах с клетками-мишенями	?	Решается в рамках культурального метода при стимуляции мононуклеаров периферической крови или иного биологического материала с последующей оценкой продукции антител методом ИФА или серологическим

## **Контрольные вопросы**

1. Особенности функциональной активности лимфоцитов, принадлежащих различным субпопуляциям.
2. Феномены реализации активационного сигнала на уровне лимфоцита (бласттрансформация и пролиферация, изменение спектра мембранных маркеров, продукция цитокинов, осуществление эффекторных функций и т. д.).
3. Основные методические подходы для исследования синтетических и эффекторных функций лимфоцитов.
4. Особенности и условия проведения культурального метода исследования в иммунологии.

## Принципы анализа и интерпретации результатов исследования иммунного статуса человека

Оценка иммунного статуса в настоящее время является распространенной процедурой в комплексе клинико-лабораторных исследований. Однако, несмотря на широкий спектр используемых тестов и методов, интерпретация и анализ иммунограммы остается сложной задачей. В ряде ситуаций определение иммунного статуса может быть мало эффективным с точки зрения постановки диагноза, либо совсем неэффективным. Причины недостаточного диагностического значения иммунограммы можно условно разделить на субъективные и объективные. К субъективным причинам следует отнести необходимость тесного контакта врача клинической практики и сотрудника иммунодиагностической лаборатории, которая во многом определяется коммуникативностью, психологической совместимостью и умением обеих сторон к продуктивному диалогу. Такая совместимость также связана с общностью или различиями теоретической подготовки специалистов. К объективным причинам относятся особенности генерации, распространения и циркуляции лимфоцитов, особенности биосинтеза иммуноактивных молекул, особенности патогенеза патологических процессов. Существенный вклад в недостаточную эффективность диагностического значения иммунограммы вносит и использование периферической крови в качестве основного материала для исследования

### Диагностическое значение параметров иммунного статуса различно в зависимости от особенностей патологических процессов

Уровни диагностического значения параметров иммунного статуса	Типы патологических процессов
1. <u>Высокий</u> (диагноз заболевания может быть поставлен практически только с помощью иммунодиагностических методов)	Врожденные иммунодефициты. Некоторые формы гемобластозов, парапротеинемии и проч.
2. <u>Средний</u> (постановка диагноза заболевания требует привлечения дополнительных методов, иммунодиагностические тесты играют вспомогательную роль)	Приобретенные иммунодефициты. Аутоиммунные заболевания. Инфекции с признаками системности или генерализации в острой фазе или в фазе обострения, в субкомпенсированной и декомпенсированной форме
3. <u>Низкий</u> (параметры иммунного статуса практически не информативны)	Локальные патологические процессы, включая онкологические, инфекционно-воспалительные, аутоиммунные заболевания в стадии ремиссии и/или в компенсированной форме

### Значение оценки иммунного статуса при ряде заболеваний и состояний

Задачи	Заболевания/ состояния*
1	2
<b>диагностическая</b> – позволяет поставить диагноз определенного заболевания	первичные иммунодефициты, лимфопролиферативные процессы, гемобластозы, трансплантации органов, клеток и тканей (определение совместимости пары донор-реципиент)
<b>патогенетическая</b> – позволяет установить вовлеченность иммунной системы в патогенез заболевания, а также позволяет установить механизм иммунного ответа или тип реагирования иммунной системы на патологический процесс	инфекционные процессы, аллергические процессы, аутоиммунные процессы, острые состояния – ДВС-синдром, ожоги, оперативные вмешательства, любые заболевания, протекающие с инфекционно-воспалительным, лимфопролиферативным, аллергическим или аутоагрессивным синдромами
<b>мониторинговая</b> – позволяет оценить тяжесть течения болезни, риск развития некоторых осложнений, эффективность терапии, включая иммунокорректирующую терапию	ВИЧ-инфекция, состояния после обширных оперативных вмешательств, аутоиммунные процессы, аллергические заболевания, состояния после трансплантации органов, клеток и тканей системные, генерализованные и локальные инфекционно-воспалительные заболевания, состояния, сопровождающиеся повреждениями тканей (инфаркт миокарда, острый панкреатит, острый гепатит, ожоговая болезнь и др.), онкологические заболевания

\* – перечень наиболее эффективных тестов может быть различен при исследовании иммунного статуса при разных формах патологических процессов.

Алгоритм анализа и интерпретации иммунограммы 1. Анализ иммунограммы выполняется по следующим шагам: а) сравнение показателей иммунного статуса обследуемого пациента с показателями контрольной группы (референс-контроль), б) определение возможных лабораторных артефактов. Например, должны обращать на себя внимание чрезмерно низкие или чрезмерно высокие показатели ряда параметров, выходящие за рамки обычных колебаний значений, так как они могут отражать использование дефектных реактивов или нарушений при проведении методики исследования. 2. Интерпретация иммунограммы выполняется по следующим шагам: а) установите наиболее явные изменения в иммунном статусе (по отклонению от контрольных значений) и их логическую связанность с изменениями других показателей; б) далее отвечайте на вопросы: – При каких процессах индуцируются подобные изменения? – Какие факторы контролируют изменения данных параметров иммунного статуса? – При каких иммунологических процессах происходит активация данных регуляторных факторов? – Могут ли данные иммунологические процессы иметь место в развитии заболевания у обследуемого пациента? – Являются ли эти процессы вариантом физиологического ответа иммунной системы или отражают развитие иммунопатологических процессов? – Какова диагностическая и прогностическая значимость наблюдаемых изменений? – Какая дополнительная информация необходима для уточнения иммунологического диагноза? 3. Заключение по иммунограмме содержит ряд логически связанных между собой блоков: а) перечисляются значимые изменения параметров иммунного статуса, б) указываются иммунологические феномены, при

которых могут наблюдаться эти изменения, в) дается заключение о состоянии иммунной системы у данного пациента или об особенностях реагирования, г) перечисляются возможные варианты прогноза состояния иммунной системы и организма в целом данного пациента, д) даются рекомендации по мониторингу состояния иммунной системы, е) перечисляются.

### **Показания для назначения иммунограммы**

#### **Исследование иммунного статуса обязательно:**

- 1) при подозрении на наличие иммунодефицитного или иного иммунопатологического состояния, 2
- 2) перед назначением иммунокорректирующих препаратов для оптимального выбора препарата и последующего мониторинга эффективности терапии;
- 3) в случаях длительного течения инфекционно-воспалительного процесса, трудно поддающегося стандартной терапии.

#### **Исследование иммунного статуса желательно:**

- 1) для любого человека с целью определения особенностей его иммунной системы.

Особое значение придется исследованию иммунного статуса детей, так как в детском возрасте формируются основные индивидуальные особенности функционирования иммунной системы, зависящие, с одной стороны, от генетических факторов, а с другой – от эффективности иммунного ответа на проникающие в организм антигены. Мониторинг иммунограммы проводится с различными интервалами в зависимости от иммунопатогенеза заболевания и продолжительности жизни иммунокомпетентных клеток и отдельных молекул

**Возможные артефакты при проведении лабораторных тестов иммунограммы**

Обнаруженный феномен	Тактика анализа ситуации
1	2
<p>Определен уровень Ig в сыворотке крови в реакции простой радиальной иммунодиффузии по Манчини:                      IgG &lt; 5,0 г/л,                      IgM &lt; 0,5 г/л,                      IgA &lt; 0,9 г/г</p>	<p>1) в первую очередь оцените возможность артефактов:                      – просмотрите результаты всех анализов, выполненных одновременно с данным образцом,                      – проверьте, какие реактивы использовались при проведении исследования (недавно полученные из нового источника, напротив, с истекшим сроком годности и проч.),                      – проверьте, не произошло ли случайное неправильное разведение образца? Если нет, то</p> <p>2) обратите внимание на возраст пациента, для ребенка 1 года жизни эта находка может указывать на соответствующий первичный иммунодефицит. У взрослого человека – указывать на причину, связанную с потерей белков в целом (гастроэнтеропатии, нефротический синдром, ожоги, проведение плазмафереза и др.). В этом случае определяется общее снижение белковой фракции крови, а не изолированное снижение Ig (следует запросить результаты биохимического анализа крови). Кроме этого, гипоимуноглобулинемия развивается при иммуносупрессивной терапии, присутствии антител к иммуноглобулинам и др. состояниях (запросите более подробную информацию об этом). Если нет, то</p>

1	2
<p>Определен уровень Ig в сыворотке крови в реакции простой радиальной иммунодиффузии по Манчини:            IgG &lt; 5,0 г/л,            IgM &lt; 0,5 г/л,            IgA &lt; 0,9 г/г</p>	<p>3) ищите артефакт. В любом случае этот образец подлежит повторному исследованию, желательно с реактивами разных серий. Иммуноглобулины относятся к достаточно стабильным молекулам. При замораживании и размораживании образцов колебания уровня иммуноглобулинов незначительны. При хранении при +4 °С стабильность образца снижается (она связана с периодом полужизни молекул, для IgG – около 3 нед., для IgM – 5-6 сут., IgA – 7 сут.)</p>
<p>Определен уровень Ig в сыворотке крови в реакции простой радиальной иммунодиффузии по Манчини:            IgG &gt; 20,0 г/л,            IgM &gt; 5,5 г/л,            IgA &gt; 3,0 г/г</p>	<p>см. п. 1, кроме этого, проверьте, не стояла ли проба длительное время открытой. Испарение жидкой фракции сыворотки крови или крови в целом может привести к искусственному изменению уровня Ig,            2) запросите дополнительную информацию о пациенте. Если он страдает заболеванием, связанным с потерей жидкой фракции крови (ожоговая болезнь, экссудацией в «третье пространство»), то гипериммуноглобулинемия будет сочетаться с общим увеличением уровня белка в периферической крови, а также с общим увеличением всех классов Ig. Гипериммуноглобулинемия может отражать развитие опухолевых процессов В-лимфоцитов. Если нет, то п. 3</p>
<p>При мониторинговом контроле с интервалом 3–4 дня обнаружено 2–3-х-кратное снижение уровня IgG</p>	<p>1) помните о продолжительности периода полужизни Ig. При указанных условиях исследование артефактно, если только пациент не подвергался процедуре плазмафереза. Повторите исследование, оба образца сыворотки крови исследуйте одновременно (метод «парных» проб). Ошибка могла произойти из-за смены серий реактивов</p>

Обнаруженный феномен	Тактика анализа ситуации
1	2
Результаты НСТ-теста не соответствуют заболеванию: НСТ-тест характерный для острого воспалительного заболевания при его отсутствии (аналогично для фагоцитарной активности нейтрофилов)	1) проверьте чистоту посуды. Примеси и остатки бактериальных продуктов могли выступать в роли стимуляторов метаболической активности нейтрофилов. Контролируйте посуду для взятия крови и постановки этих тестов!
Результаты НСТ-теста крайне низкие	1) такое возможно только при хроническом гранулематозе, а также после применения мощной антибактериальной терапии. Уточните, по какому поводу проводится исследование? Если нет, то 2) проверьте качество реактивов – они всегда должны быть свежеприготовленными. Хранение готовых субстратов не допускается!!
При иммунофенотипировании получены крайне низкие уровни экспрессии ряда маркеров	1) проблема МАТ – проверьте качество, 2) оцените, могут ли данные маркеры присутствовать на клетках периферической крови? Ряд адгезивных молекул, например, обнаруживается лишь на тканевых формах лимфоцитов или в пристеночном сосудистом пуле. Посоветуйтесь с коллегами.
Обнаружены монотонно высокие уровни функциональной активности СК и отдельных компонентов	1) не гемолизирована ли сыворотка крови? 2) тщательно ли отделена сыворотка крови от сгустка? 3) обратите внимание на результаты контролей. Годны ли эритроциты барана для приготовления гемсистемы? Повторите исследование
Обнаружены нулевые уровни активности компонентов СК	1) проверьте какой образец Вы исследовали? Не плазму ли? 2) качество посуды!!! Примеси ПАВ значительно изменяют активность комплемента. Повторите исследование

## Правила работы в лабораториях

### Аппараты, приборы и оборудование

1. При пользовании спиртовой горелкой (спиртовкой) нельзя наливать спирт в нее, не потушив спиртовку, так как при наливании спирта выделяемые пары его могут воспламениться. Спиртовка должна иметь металлическую трубку и шайбу для фитиля. При их отсутствии может быть воспламенение паров спирта внутри резервуара и взрыв спиртовки.

2. Помещения лаборатории должны быть оборудованы приточновытяжной вентиляцией с механическим побуждением. Вентиляционные устройства должны размещаться так, чтобы шум от них не мешал работе персонала. Вентиляция во всех помещениях лаборатории должна включаться до начала работы.

3. В помещениях для проведения исследований мочи и кала, биохимических, серологических и гормональных исследований следует устанавливать вытяжные шкафы с механическим побуждением. Скорость движения воздуха в полностью открытых створках вытяжного шкафа должна быть 0,3 м/с, при работе с ртутью – 0,4 м/с, с сероводородом – 0,7 м/с. Створки (дверцы) вытяжного шкафа во время работы следует держать максимально закрытыми (опущенными с небольшим зазором внизу для тяги). Открывать их можно только на время обслуживания приборов и установок. Приподнятые створки должны прочно укрепляться приспособлениями, исключающими неожиданное падение этих створок.

4. Помещения лаборатории должны освещаться непосредственно прямым естественным светом. Отношение площади окон к площади пола должно быть 1:4 или 1:5.

5. Металлические корпуса всех электроприборов и электродвигателей (автоклавы, центрифуги, муфельные печи, сушильные шкафы и т. д.) должны быть обязательно заземлены. При эксплуатации центрифуг необходимо соблюдать следующие требования: а) при загрузке центрифуги стаканами или пробирками соблюдать правила строгого попарного уравнивания; б) перед включением центрифуги в электрическую сеть необходимо проверить, хорошо ли привинчена крышка к корпусу; в) включать центрифугу в электрическую сеть следует плавно при помощи реостата, после отключения надо дать возможность ротору остановиться, тормозить ротор рукой запрещается; г) после работы центрифугу нужно осмотреть и протереть.

6. При эксплуатации термостата необходимо соблюдать следующие требования: а) запрещается в термостат ставить легковоспламеняющиеся вещества; б) предохранительные колпаки от регулирующих устройств нельзя снимать без электромонтера; в) чистку термостата производить только после отключения его от сети.

7. При эксплуатации рефрижераторов (холодильников) нельзя допускать перестановку и перемещение их без участия специалиста.

8. Электроплиты, муфельные печи и другие нагревательные приборы должны устанавливаться на асбестовом или другом теплоизолирующем материале. Не следует допускать попадание на них кислот, щелочей, растворов солей и т. д.

9. При прекращении подачи электрического тока необходимо выключить все электроприборы.

10. Лабораторные столы для микроскопических или каких-либо других точных исследований должны располагаться у окон. Для предотвращения переутомления и порчи зрения при микроскопировании и пользовании другими оптическими приборами необходимо обеспечить правильное освещение поля зрения, предусмотренное для данного микроскопа или прибора, не закрывать неработающий глаз, работать попеременно то одним, то другим глазом и делать перерывы в работе при утомлении зрения.

11. Верхняя доска лабораторного стола должна изготавливаться из водонепроницаемого, кислото-щелочестойкого и несгораемого материала.

12. Перед каждыми аналитическими весами необходимо иметь светильники.

13. Баллоны со сжатыми газами должны иметь предохранительные колпачки. Баллоны нельзя помещать в места, освещаемые прямыми солнечными лучами, они не должны находиться вблизи нагревательных приборов, отопительных приборов и соприкасаться с электрическими проводами.

14. Расстояние от радиаторов и других отопительных приборов до баллонов должно быть не менее 1 м, а от печей и других источников тепла с открытым огнем – не менее 5 м. При наличии у отопительных приборов экранов, предохраняющих баллоны от местного перегрева, расстояние между экраном и баллоном должно быть не менее 100 мм. Баллоны должны быть тщательно закреплены в вертикальном положении.

15. Работающие в лаборатории обязаны перед началом работы надеть установленную действующими нормами спецодежду и иметь индивидуальные средства защиты, предусмотренные инструкцией. Для работников лаборатории должны быть индивидуальные шкафы для спецодежды персонала.

16. В помещении лаборатории запрещается: а) оставлять без присмотра зажженные горелки и другие нагревательные приборы, держать вблизи горячих горелок вату, марлю, спирт и другие воспламеняющиеся вещества; б) убирать случайно пролитые огнеопасные жидкости при зажженных горелках и включенных электронагревательных приборах; в) зажигать огонь и включать ток, если в лаборатории пахнет газом. Предварительно необходимо определить и ликвидировать утечку газа и проветрить помещение. Место утечки газа определяется с помощью мыльной воды; г) наливать в горящую спиртовку горючее, пользоваться спиртовкой, не имеющей металлической трубки и шайбы для сжатия; д) употреблять бензин для разжигания примусов; е) проводить работы, связанные с перегонкой, экстрагированием, растиранием вредных веществ и т. д., при неисправной вентиляции; ж) при работе в вытяжном шкафу держать голову под тягой; з) пробовать на вкус и вдыхать неизвестные вещества; и) наклонять голову над сосудом, в котором кипит или в который налита какая-либо жидкость; к) хранить запасы ядовитых, сильнодействующих, взрывоопасных веществ и растворов на рабочих столах и стеллажах; л) хранить и применять реактивы без этикеток; м) хранить в рабочих помещениях какие-либо вещества неизвестного происхождения; н) хранить и принимать пищу, а также курить; о) хранить личную одежду в помещениях лаборатории, а также уносить спецодежду домой; п) работать без установленной специальной и санитарной одежды и предохранительных приспособлений; р) выполнять работы, не связанные с заданием и не предусмотренные рабочими инструкциями; с) сушить что-либо на отопительных приборах; т) загромождать и захламлять проходы и коридоры, а также подходы к средствам пожаротушения.

## **Хранение, учет и применение ядовитых, сильнодействующих, едких, взрывоопасных и огнеопасных средств и растворов, а также работа с инфицированным материалом**

Ядовитые средства должны храниться в отдельной комнате в металлических шкафах или сейфах под замком и пломбой. Комната должна быть оборудована водопроводом, канализацией, вентиляцией и вытяжным шкафом. В аудиториях, где производятся занятия с учащимися, хранение ядовитых средств после окончания учебных занятий не разрешается. Концентрированные растворы кислот должны храниться в специальных бутылках с притертой пробкой, поверх которой необходимо надевать стеклянный притертый колпачок. Щелочи должны храниться в широкогорлых банках оранжевого стекла, закрытых корковыми пробками, и заливаться слоем парафина. Посуда для хранения ядовитых веществ, щелочей и кислот должна иметь четкие надписи (чернилами по стеклу). Горючие и взрывоопасные вещества должны содержаться в толстостенных емкостях (банках) в железных ящиках, выложенных асбестом. Эти реактивы должны быть хорошо закупорены.

При закупоривании реактивов пробками следует учитывать свойства реактивов.

Резиновые пробки сильно набухают под действием спирта, бензола, ацетона, эфира. Под действием галогенов (брома, йода) резиновые пробки становятся хрупкими, теряют эластичность. Такие реактивы лучше закупоривать стеклянными притертыми пробками. Щелочь нельзя закупоривать притертыми пробками, так как внутренняя поверхность горла сосуда смачивается щелочью, а затем под влиянием углекислого газа между пробкой и горлом образуются карбонаты, которые плотно заклинивают пробку. Если реактив чувствителен к действию света, его хранят в банках из оранжевого стекла. Банку из светлого стекла можно завернуть в темную бумагу и поставить в шкаф, непроницаемый для света.

Категорически запрещается совместное хранение легковоспламеняющихся огне- и взрывоопасных веществ с кислотами и щелочами. Работу с ядовитыми веществами можно поручать только работникам, прошедшим специальный инструктаж. Расфасовка, измельчение, взвешивание и отмеривание ядовитых и сильнодействующих средств должно проводиться в вытяжных шкафах с использованием специально выделенных для этой цели приборов и посуды.

Нагревание ядовитых веществ должно производиться только в круглодонных колбах. Нагревать колбы на открытом огне запрещается.

Работу с ядовитыми веществами следует проводить в резиновых перчатках, защитных очках, при необходимости в противогазе. Наполнение сосудов ядовитыми веществами, концентрированными кислотами и щелочами следует проводить сифоном или специальной пипеткой с резиновой грушей.

После окончания работы следует тщательно вымыть руки, а в соответствующих случаях – вычистить зубы и прополоскать рот. Биксы, банки, бутылки с летучими веществами должны открываться только в момент непосредственного пользования ими.

Открывание сосудов с концентрированными кислотами и щелочами и приготовление растворов из них разрешается только в вытяжном шкафу с включенной принудительной вентиляцией. Щелочи следует брать из банки шпателями. При приготовлении растворов щелочей определенную навеску щелочи опускают в большой сосуд с широким горлом, заливают необходимым количеством воды и тщательно

перемешивают. Большие куски едкой щелочи разбивают в специально отведенном месте. При разбивании щелочь накрывают холстом или другими материалами. При разбавлении крепких кислот, во избежание разбрызгивания их, следует кислоту добавлять в воду, а не наоборот. При работе с кислотами и щелочами запрещается насаживать жидкость в пипетку ртом. Для набора жидкости в пипетку следует использовать резиновые груши с трубками.

При кипячении растворов и до полного их остывания нельзя закрывать посуду (пробирки, колбы) пробкой. Нагревая жидкость в пробирке, необходимо держать пробирку отверстием в сторону от сотрудников и от себя. При пролипании неядовитых реактивов достаточно вытереть поверхность стола тряпкой, держа ее резиновыми перчатками, после чего хорошо прополоскать тряпку, вымыть водой стол и перчатки.

Если пролита щелочь, то ее надо засыпать песком или опилками, затем удалить песок или опилки и залить это место сильно разбавленной соляной кислотой или же уксусной. После этого удалить кислоту тряпкой, вымыть водой стол и перчатки.

Если пролита кислота, то ее надо засыпать песком (опилками засыпать нельзя), затем удалить пропитанный песок лопаткой и засыпать содой, затем соду также удалить и промыть это место большим количеством воды. Растворы для нейтрализации концентрированных кислот и щелочей должны находиться на стеллаже (полке) в течение всего рабочего времени.

Отработанные горючие жидкости собирают в специальную герметично закрывающуюся тару и передают для регенерации или уничтожения. Спуск их в канализацию воспрещается.

Использованные кислоты и щелочи следует собирать порознь в специально предназначенную посуду. Небольшое количество едких веществ можно выливать в раковину лишь после сильного разведения их водой. Для слива отходов летучих веществ, распространяющих резкий, неприятный запах, необходимо предусмотреть раковину в вытяжном шкафу с подведенным к ней водопроводным краном.

**При проведении бактериологических исследований с инфекционным материалом** должны соблюдаться следующие правила: 1) при распаковке инфекционного материала, присланного в лабораторию для исследования, банки и пробирки, содержащие материалы, обтирают дезинфицирующим раствором и ставят на металлические подносы, кюветы или в штативы; 2) перед работой тщательно проверяют целостность стеклянной посуды, проходимость игл и поршней у шприцев; 3) запрещается прикасаться к исследуемому материалу и к конденсату воды в засеянных чашках руками. Работу с инфекционным материалом следует проводить с помощью инструментов (пинцетов, игл, петлей, корнцангов и т. д.); 4) посев в пробирки и чашки Петри проводить около горячей горелки с обжиганием петли, шпателя и краев пробирки; 5) переливание инфекционных жидкостей из сосуда в сосуд через край не допускается; 6) при посеве инфекционного материала на пробирках, чашках, колбах, флаконах и прочей посуде делают надписи с указанием названия материала, номера анализа и даты посева; 7) в комнате, предназначенной для обработки и посева инфекционного материала, запрещается проводить другие виды работ; 8) в процессе работы и после окончания работы используемые предметные стекла, пипетки, шпатели погружают на одни сутки в банки с дезинфицирующим раствором, затем моют и кипятят; 9) посуду с использованными

питательными средами, калом и мочой и др. материалами, взятыми от инфекционных больных, собирают в баки и обеззараживают автоклавированием, обрабатывают дезинфицирующим раствором или кипячением; 10) запрещается оставлять на столах нефиксированные мазки, чашки Петри, пробирки и другую посуду с инфекционным материалом; 11) поверхность рабочих столов обрабатывают дезинфицирующим раствором, руки обмывают дезинфицирующим раствором, а затем моют в теплой воде с мылом как после окончания работы, так и при перерыве в работе, при выходе из помещения; 12) при уборке помещения в конце рабочего дня полы моют с применением дезинфицирующего раствора, стены, двери, полки, подоконники, окна, шкафы и т.д. протирают дезинфицирующим раствором; дезинфекционные работы персонал должен проводить в резиновых перчатках.