

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ**

УТВЕРЖДЕНО

на заседании кафедры ФГБОУ ВО
ПСПбГМУ им. И.П. Павлова

(наименование кафедры)

«__» _____ 20__ г., протокол №__
заведующий кафедрой

(ФИО заведующего кафедрой)

Методические указания для ординатора

| | |
|--|---|
| по | Клиническая лабораторная диагностика <small>(наименование дисциплины)</small> |
| по | Методы оценки иммунного статуса. Лабораторные показатели клеточного иммунитета <small>(наименование темы занятия)</small> |
| для специальности/ направления подготовки | 31.08.05 Клиническая лабораторная диагностика <small>(наименование и код специальности/направление подготовки)</small> |
| факультет/ отделение (при наличии) | Послевузовского образования <small>(наименование факультета/отделения)</small> |
| кафедра | Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины <small>(наименование кафедры)</small> |

1. ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ИЗУЧЕНИЯ ТЕМЫ

составляет 4 часа

2. ЦЕЛИ

-
- Ознакомление с современными представлениями о клетках иммунной системы. Клетки адаптивного и врожденного иммунитета, промежуточные клетки.
- Основные популяции лимфоцитов периферической крови: Т-лимфоциты (Т-хелперы, классификация Т-хелперов), цитотоксические Т-лимфоциты, естественные киллерные Т-клетки (Т-НК-клетки), естественные киллерные клетки (НК-клетки). Иммунологический фенотип, свойства, функции.
- Ознакомление с основными терминами и понятиями, необходимыми для правильной интерпретации лабораторных показателей клеточного иммунитета: иммунный статус, иммунограмма, иммунофенотипирование, CD-маркер (Cluster of Differentiation – кластер дифференцировки).
- Ознакомление с современными лабораторными методами оценки показателей клеточного иммунитета.
- Ознакомление с показаниями к оценке иммунного статуса (расширенная иммунограмма).
- Ознакомление с факторами, влияющими на результаты оценки иммунного статуса.
- Краткое ознакомление с принципом метода проточной цитометрии. Проточные цитометры нового поколения.
- Ознакомление с правилами подготовки образцов периферической крови для исследования на проточном цитометре.
- Ознакомление со стандартными панелями моноклональных антител и (МКАТ) и тандемными флуорохромами, используемыми для оценки клеточного иммунитета с помощью иммунофенотипирования методом проточной цитометрии.
- Ознакомление с этапами оценки клеточного иммунитета. Этап 1 – Ориентировочный уровень (панель первого шага). Этап 2 – Аналитический уровень (панель второго шага).
- Ознакомление с правилами и последовательностью оценки параметров клеточного звена иммунитета: исследование субпопуляционного состава лимфоцитов/моноклеаров периферической крови:
 - а) определение относительного и абсолютного количества зрелых Т-клеток (CD3+), их отдельных субпопуляций - Т-хелперов (CD4+) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+);
 - б) оценка отношения CD4+/CD8+ - иммунорегуляторный индекс (ИРИ);
 - в) определение относительного и абсолютного количества Т-НК-клеток (CD3-CD16+CD56
 - г) определение относительного и абсолютного содержания больших гранулярных лимфоцитов (БГЛ) – НК-клеток (CD3+CD16+CD56+);
 - г) определение маркеров активации: CD69, CD25, CD38, CD95, CD71, CD127, HLA-DR;
 - д) фенотипическая характеристика регуляторных Т-клеток (CD4+CD25^{bright}CD127^{neg}CD45+). Основные функции регуляторных Т-клеток.
 - е) характеристика состояния Т-клеточного звена иммунитета: норма/активация/угнетение; по Т-хелперному типу /по Т-цитотоксическому типу;
 - ж) пересчет относительного количества субпопуляций лимфоцитов на абсолютные по формуле (абсолютное число ЛФ из клинического анализа крови умножить на относительное количество конкретной субпопуляции ЛФ из иммунограммы и разделить на 100).
- Ознакомление с последствиями дефектов клеточного звена иммунитета.

- Разбор клинического примера (см. материалы презентации по лекции к теме занятия).

- В результате изучения темы обучающийся должен знать:

1. Основные характеристики клеток адаптивного и врожденного иммунитета, промежуточных клеток иммунной системы.
 2. Основные показатели клеточного звена иммунитета и лабораторные методы их определения.
 3. Принцип метода проточной цитометрии.
 4. Показания к проведению комплексного исследования иммунного статуса (расширенная иммунограмма).
 5. Факторы, влияющие на результаты определяемых показателей клеточного иммунитета.
 6. Правила забора крови на анализ для оценки иммунного статуса.
 7. Правилами подготовки образцов периферической крови для исследования на проточном цитометре
 8. Фенотипические характеристики основных популяций лимфоцитов периферической крови.
 9. Фенотипические характеристики основных популяций лимфоцитов периферической крови.
- уметь:
1. Охарактеризовать основные популяции и субпопуляции лимфоцитов.
 2. Рассчитать иммунорегуляторный индекс (ИРИ) - отношение CD4+/CD8+;
 3. Оценить состояние Т-клеточного звена иммунитета: норма/активация/угнетение; по Т-хелперному типу /по Т-цитотоксическому типу.
 4. Охарактеризовать состояния иммунной системы, для которых характерно нормальное состояние /активация/угнетение Т-клеточного звена иммунитета.
 5. Уметь пересчитывать относительное количество субпопуляций лимфоцитов на абсолютные, используя формулу пересчета.
 6. На основании полученных данных интерпретировать результаты оценки параметров клеточного иммунитета.

3. ТРЕБОВАНИЯ К РЕЗУЛЬТАТАМ ОСВОЕНИЯ

| Код компетенции | Содержание компетенции | Индикаторы достижения компетенции | Оценочные средства |
|-----------------|--|--|---------------------------------------|
| УК-1 | – способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий | ИД-1 Знать разделы клинической иммунологии и лабораторной диагностики, в которых рассматриваются методы оценки иммунного статуса и характеристика параметров клеточного и гуморального звена иммунитета, показателей фагоцитоза и функциональной активности лейкоцитов. Клиническую интерпретацию реакции бластной трансформации лимфоцитов. Уметь делать выводы на основании полученных | Контрольные вопросы, тестовые задания |

| | | | |
|--|--|---|---------------------------------------|
| | | результатов оценки иммунного статуса. | |
| | | ИД-2 Знать современные методы лабораторной диагностики, применяемые для оценки иммунного статуса. Количественные и функциональные показатели иммунного статуса в норме и при различных заболеваниях. Показания к оценке иммунного статуса. Уметь анализировать изменения лабораторных показателей иммунного статуса в норме, при патологии и применении лекарственных средств. Уметь давать заключение к развернутой иммунограмме, характеризующее состояние клеточного, гуморального звена иммунитета, показателей фагоцитоза и функциональной активности иммунокомпетентных клеток. | Контрольные вопросы, тестовые задания |

4. СОДЕРЖАТЕЛЬНАЯ ЧАСТЬ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ

1. Повторение лекционного материала.
- Рассмотрение клинического примера пациента с нарушениями показателей клеточного звена иммунитета (см. материалы презентации по лекции к теме занятия).
2. Анализ иммунограмм с нарушениями Т-клеточного звена иммунитета, снижением или повышением отношения CD4+/CD8+, характеристика основных популяций и субпопуляций лимфоцитов, пересчет относительного количества субпопуляций лимфоцитов на абсолютные, с использованием формулы пересчета (абсолютное число ЛФ из клинического анализа крови умножить на относительное количество конкретной субпопуляции ЛФ из иммунограммы и разделить на 100), интерпретация результатов оценки параметров клеточного иммунитета, написание заключения по клеточному звену иммунитета.

3. Основной теоретический материал.

1. Выделяют 2 разновидности лабораторной деятельности, имеющей отношение к иммунологии:

1. использование иммунологических методов для оценки не иммунологических показателей;
2. определение иммунологических показателей для характеристики состояния иммунной системы (иммунного статуса).

Пример деятельности первого рода - широкое использование методов иммунохимического анализа для определения гормонов и других физиологически значимых молекул в сыворотке крови и других биологических субстратах. В последние десятилетия с этой целью используют практически исключительно количественные методы иммунолигандного анализа: в недалеком прошлом радиоиммунологического, и настоящее время иммуноферментного. С той же целью используют иммуноблоттинг. Преимущества иммунологических методов состоят в специфичности, высокой чувствительности, относительной простоте и дешевизне. Это направление лабораторной диагностики имеет отношение к использованию иммунологических методов, но только иногда — к решению иммунологических (т.е. собственно иммунодиагностических) задач — при определении антител, цитокинов и других молекул, непосредственно участвующих в иммунологических процессах. Одна из первоочередных задач современной иммунологии – это оценка функционирования иммунной системы в норме и при заболеваниях человека. Сложность этой проблемы обусловлена достаточно сложной, многокомпонентной организацией иммунной системы, разнообразием её структур на клеточном и молекулярном уровне, зависимостью от регуляторных сигналов со стороны нервной, эндокринной, кровеносной и многих других систем организма. Тем не менее, необходимость оценивать иммунную систему — современная реальность. К сожалению, в настоящее время не придумали единого теста для оценки иммунной системы в целом.

Современный взгляд на оценку иммунной системы начал формироваться с начала 70-х годов XX века, когда стало ясным, что в этой системе существуют клеточное и гуморальное звенья. Основы такого представления об иммунной системе человека были заложены в учении о первичных иммунодефицитах.

Первичные иммунодефициты – это генетически обусловленные заболевания, связанные с тем, что у больного не вырабатываются те или иные компоненты иммунной системы. Оценивая изменения в лабораторных анализах и сравнивая их с клинической картиной заболевания, делали заключение о функции нарушенных звеньев иммунной системы.

В дальнейшем стали появляться тесты для оценки как количественных, так и качественных характеристик параметров иммунной системы на клеточном, молекулярном и позже на геномном уровне.

На сегодняшний день в иммунологии огромное значение придают лабораторным исследованиям, и в первую очередь оценке такого состояния, как иммунный статус.

Иммунный статус - комплекс количественных и функциональных показателей, отражающих конкретное состояние иммунной системы, определяемое с помощью стандартных общепринятых тестов.

Кроме того, выделяют понятие «иммунодиагностика».

Иммунодиагностика - проведение лабораторного и клинического исследований, которые помогают выявить конкретные нарушения в иммунной системе, позволяющие:

- 1) выявить нарушенное звено в стройной системе функционирования иммунной системы;
- 2) провести анализ этиологии, патогенеза, прогноза заболевания;
- 3) выбрать средство иммунокоррекции;
- 4) провести оценку эффективности проводимой иммунокорректирующей терапии.

В настоящее время выделяют иммунодиагностические методы 1-го и 2-го уровня. Их основные отличительные характеристики представлены в таблице 1.

Таблица 1. Отличительные особенности иммунодиагностических тестов 1 и 2 уровня.

| Тесты 1-го уровня | Тесты 2-го уровня |
|---|--|
| Ориентировочные | Аналитические |
| Методики доступны | Методики трудоемки |
| Получение результата в течении нескольких суток | Получение результата в течении суток, недель. |
| Информативны | Высокая информативность |
| Возможно проведение в гематологических и биохимических лабораториях | Возможно проведение только в специализированных лабораториях |

Иммунодиагностические методы 1-го уровня включают в себя определение:

- 1) относительного и абсолютного числа лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови (общепринятый анализ крови клинический);
- 2) относительного и абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток с использованием моноклональных антител против CD3-, CD 19- (или CD 20-, CD 72)- и CD16- CD56- маркеров соответственно;
- 3) субпопуляций Т-лимфоцитов: Т-хелперов (CD3+CD4+) и Т-киллеров (CD3+CD8+) и их соотношения (CD4/CD8);
- 4) концентрации сывороточных иммуноглобулинов основных классов (IgM, IgG, IgA);
- 5) фагоцитарной активности лейкоцитов, выработки активных форм кислорода;
- 6) активности комплемента;
- 7) возможен анализ других показателей (например, цитокинов).

Минимальный набор тестов должны выполнять все лаборатории и центры клинической иммунологии, входящие в систему иммунологической службы РФ.

Изменение количества лейкоцитов.

Повышение числа лейкоцитов может происходить при остром инфекционном процессе, воспалении, при лейкозах.

Снижение числа лейкоцитов является лабораторным критерием иммунодефицитного состояния, чаще всего транзиторного (временного), возникшего в результате перенесенной острой инфекции, терапии антибиотиками, интерферонами.

Напомним, что в норме абсолютное число лейкоцитов в крови у взрослого человека составляет: **4.0-9.0x10³ в 1 мл**

Изменение количества лимфоцитов

У взрослого человека, в норме относительное число лимфоцитов: 19-37%, абсолютное число лимфоцитов 1.2-2.5x10³ в 1 мл.

Лимфопения относительная или абсолютная – это снижение относительного или абсолютного числа лимфоцитов. Так как лимфоциты являются частью лейкоцитов, то относительная лимфопения иногда компенсируется за счет увеличения общего числа лейкоцитов, а абсолютная лимфопения может быть следствием лейкопении. При нормальном количестве лейкоцитов относительная лимфопения соответствует абсолютной.

Причины стойкой лимфопении:

- . - хронические инфекционные, преимущественно вирусные, заболевания (в том числе ВИЧ-инфекция);
- . - состояние после химиотерапии или рентгеновского облучения;
- . - состояние после длительного лечения антибиотиками;
- . - при аплазии костного мозга;
- . - состояние хронического стресса;
- . - наркомания и/или алкоголизм.

Лимфопения является одной из характерных черт иммунодефицитного состояния. *Лимфоцитоз* относительный или абсолютный - повышение относительного или абсолютного числа лимфоцитов.

При нормальном количестве лейкоцитов относительный лимфоцитов соответствует абсолютному.

Причины лимфоцитоза:

- . хронический инфекционный процесс, вызванный бактериями или простейшими;
- . аутоиммунные и аллергические заболевания;
- . лимфопролиферативные заболевания.

Изменение количества Т-лимфоцитов (CD3+)

У взрослого человека в норме относительное число Т-лимфоцитов: 55-80%, абсолютное число лимфоцитов 950-1800 в 1 мл.

Относительное число Т-клеток может быть как сниженным, так и повышенным.

Повышение относительного числа Т-клеток чаще отмечается при резко поляризованном Тх1 типе иммунного ответа на вирусный антиген.

Снижение относительного числа Т-клеток бывает как при иммунодефицитном состоянии, так и при резком увеличении доли В-лимфоцитов при Тх2 типе ответа.

Увеличение абсолютного числа Т-клеток может быть связано с лимфоцитозом (при нормальном относительном числе Т-лимфоцитов), а также с увеличением относительного числа Т-лимфоцитов при резко поляризованном Тх1 ответе.

Снижение абсолютного числа Т-клеток может быть вызвано лимфопенией, кроме этого, может быть при наличии Т-клеточного иммунодефицита.

Изменение количества Т-лимфоцитов хелперов (CD4+)

У взрослого человека в норме относительное число Т-лимфоцитов: 31-51%, абсолютное число лимфоцитов 570-1100 в 1 мл.

Увеличение относительного числа Т-хелперов может отмечаться при Тх2 типе иммунного ответа. Из патологических состояний подобные нарушения наблюдаются при обострении аллергических и аутоиммунных заболеваний.

Снижение относительного числа Т-хелперов может быть одной из черт Т-клеточного иммунодефицита, в том числе и при ВИЧ-инфекции.

Увеличение числа Т-хелперов абсолютное может быть обусловлено:

- . лимфоцитозом и большим из-за этого числом клеток в популяции Т- лимфоцитов;
- . увеличением числа Т-хелперов при Тх2 типе иммунного ответа;
- . при аллергическом или, реже, аутоиммунном заболевании.

Снижение абсолютного числа Т-хелперов сопровождается Т-клеточными иммунодефицитами. Например, сниженное абсолютное количество Т-хелперов характеризует каждую из стадий ВИЧ-инфекции.

Изменение количества Т-лимфоцитов киллеров (CD8-)

У взрослого человека в норме относительное число Т-лимфоцитов: 19- 37 %, абсолютное число лимфоцитов 450-850 в 1 мл.

Повышение относительного числа Т-киллеров может происходить при инфекции, в определенный момент, когда идет увеличение специфических цитотоксических клеток. Аналогичные изменения наблюдаются при опухолевом росте, в поствакцинальном периоде, при аллотрансплантации.

Снижение относительного числа Т-киллеров может иметь место при аутоиммунных и аллергических заболеваниях. Учитывая, что при инфекционной и опухолевой патологии может наблюдаться миграция CD8-лимфоцитов в патологический очаг, в периферической крови может наблюдаться снижение относительного числа Т-киллеров.

Повышение абсолютного числа Т-киллеров может быть связано с лимфоцитозом и увеличением абсолютного числа Т-клеток. Повышение абсолютного числа Т-киллеров может быть связано с увеличением абсолютного числа антиген -

специфических цитотоксических клеток - в ходе иммунного ответа на инфекционный, вакцинальный, опухолевый, трансплантационный антигены.

Снижение абсолютного числа Т-киллеров выявляется при аутоиммунных и аллергических заболеваниях, а также при инфекционных и опухолевых заболеваниях (миграция цитотоксических лимфоцитов в патологический очаг).

Изменение соотношения CD4/ CD8

В норме иммунорегуляторный индекс (соотношение CD4/ CD8) = 1.5-2.0

Увеличение соотношения CD4/ CD8 может происходить за счет:

- 1) увеличения Т-хелперов (при нормальном количестве Т-киллеров),
- 2) снижения CD8 лимфоцитов;
- 3) увеличения CD4 и снижения CD8 лимфоцитов.

В первом случае это может быть следствием поляризованного T_H2 иммунного ответа на алло- или аутоантиген. Во втором случае – отражает миграцию Т-киллеров в патологический очаг при инфекционной патологии, аутоиммунных и аллергических заболеваниях.

Увеличение соотношения CD4/ CD8 за счет увеличения CD4 и снижения CD8 лимфоцитов обычно выявляется при смешанном T_H1/T_H2 ответе на алло- или аутоантиген.

Снижение соотношения CD4/ CD8 может происходить за счет:

- 1) увеличения Т-киллеров (при нормальном количестве Т-хелперов)
- 2) снижения CD4 лимфоцитов
- 3) увеличения CD8 и снижения CD4 лимфоцитов.

В первом случае это может быть следствием поляризованного T_H1 ответа при вирусной инфекции в тот период, когда нарастает число антигенспецифических цитотоксических Т-клеток.

Снижение CD4 лимфоцитов может происходить по многим причинам, в частности, за счет усиленного апоптоза Т-хелперов. Эти эффекты наблюдаются при ВИЧ-инфекции. Существует представление, что прогрессивное снижение коэффициента CD4/ CD8 коррелирует с прогрессией ВИЧ-инфекции, достигая в терминальной стадии 0,1.

Изменение количества НК клеток (CD16- CD56-)

Увеличение относительного числа естественных киллеров может выявляться при вирусных и бактериальных инфекциях, при опухолевом процессе, т.е. во всех случаях массивного поступления антигена, когда, кроме антиген-специфических механизмов элиминации патогена, задействованы антиген-неспецифические. Повышение относительного числа естественных киллеров может также наблюдаться и при аллергических и аутоиммунных заболеваниях.

Снижение относительного числа естественных киллеров выявляется при длительно текущей хронической инфекции, при злокачественном росте, в ряде случаев отмечается при аллергических и аутоиммунных заболеваниях (при миграции НК-клеток в патологический очаг).

Увеличение абсолютного числа НК-клеток может быть следствием абсолютного лимфоцитоза. Остальные причины увеличения абсолютного числа НК-клеток идентичны тем, которые вызывают увеличение относительного числа клеток данной субпопуляции.

Уменьшение абсолютного числа НК-клеток может быть результатом лимфопении, выявляться при длительно текущей инфекции, злокачественном росте, миграции клеток в патологический очаг, в том числе при аллергических и аутоиммунных заболеваниях.

II. Подготовка проб для исследования на проточном цитометре.

ПОВЕРХНОСТНОЕ окрашивание ИКК периферической крови с целью изучения активности экспрессии поверхностных рецепторов методом ПЦ.

Включает специальную пробоподготовку. Обязательное использование моноклональных антител (МКАТ), конъюгированных с флюорохромами (тандемными красителями), специфичных к конкретным поверхностным рецепторам (например, к основным CD-маркерам клеточного звена иммунитета).

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ окрашивания ИКК периферической крови с целью изучения активности экспрессии внутриклеточных белков различных органелл (лизосомальные, митохондриальные, белки ЭПР, каспазная активность) – пробоподготовка с обязательной пермеабиллизацией мембраны, в идеале – с реагентами для фиксации (PermFix/Beckman Coulter), позволяющими минимизировать повреждение внутриклеточных АГ и отложить исследование (на следующий день) на этапе фиксации.

Несопоставимый по трудоёмкости и временным затратам процесс по сравнению с поверхностным окрашиванием (многократные отмытки, аспирации супернатанта, длительные инкубации).

Стандартные панели МКАТ для оценки клеточного иммунитета - ИФТ методом проточной цитометрии (ПЦ):

1. Минимальное количество фенотипов

| | |
|-------------------|-----------------------------|
| anti-CD3+CD45+ | Зрелые Т-ЛФ |
| anti-CD3+CD4+ | Т-хелперы |
| anti-CD3+CD8+ | Т-цитотоксические лимфоциты |
| anti-CD3-CD19+ | В-лимфоциты |
| anti-CD3-CD56+16+ | НК-клетки |

2. Дополнительные показатели клеточного иммунитета

| | |
|---------------------|---|
| anti-CD3+CD16+CD56+ | (Т-НК-клетки) |
| anti-CD25+ | (Rc IL-2, маркер ранней активации) |
| anti-CD3+HLA-DR+ | (Активированные Т-лимфоциты) |
| anti-CD3+HLA-DR+ | (Общее количество активированных лимфоцитов) |
| anti-CD95+ | (Маркер активации и готовности клетки к апоптозу) |

Тандемные флуорохромы в ПЦ

ТАБЛИЦА 1. ФЛУОРОХРОМЫ, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПРЯМОЙ КОНЪЮГАЦИИ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

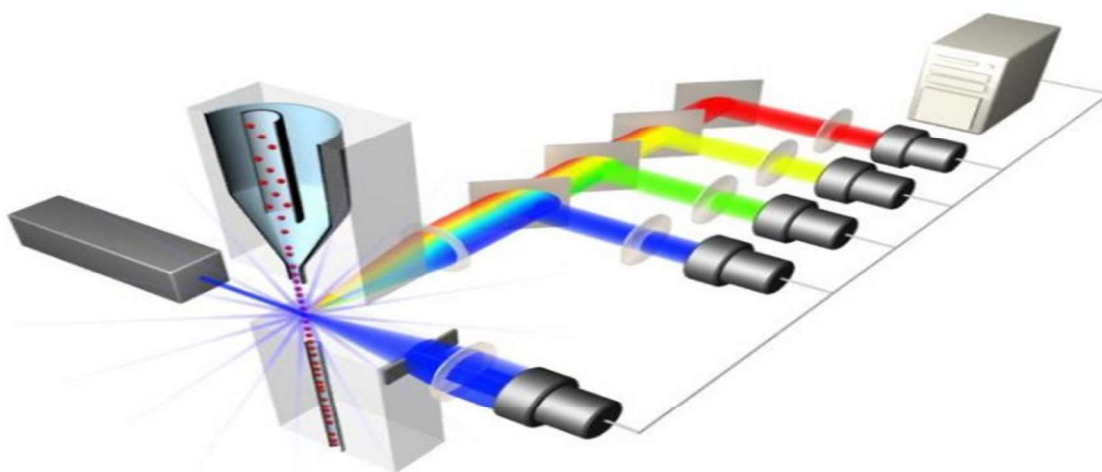
| Флуорохромы | Длина волны возбуждения (нм) | Эмиссия (нм) |
|------------------------------------|------------------------------|--------------|
| Флуоресцеинизотиоцианат (FITC) | 488 | 525 |
| Алекса Флуор 488 (Alexa Fluor 488) | 488 | 525 |
| Фикоэритрин (PE, R-PE, RD1) | 488 | 575 |
| ECD (PE-Texas Red)* | 488 | 610 |
| PC5 (PE/CY5)* | 488 | 675 |
| PC5.5 (PE/CY5.5)* | 488 | 700 |
| PE Alexa Fluor 700* | 488 | 725 |
| PC7 (PE/CY7) | 488 | 790 |
| Алофиоцианин (APC) | 633/635 | 680 |
| Alexa Fluor 647 | 633/635 | 680 |
| Alexa Fluor 700 | 633/635 | 725 |
| APC Alexa Fluor 700* | 633/635 | 725 |
| APC7 (APC/CY7)* | 633/635 | 790 |

Примечания: CY – цианин; * – тандемные флуоресцентные красители

III. Принцип метода проточной цитометрии.

- В основе проточной цитометрии лежат фотометрические и флуоресцентные измерения отдельных клеток, пересекающих лазерный луч.
- Таким образом, это анализ отдельной клетки с помощью лазерного луча на определённой длине волны (488-808 нм).
- Основное преимущество проточной цитометрии перед морфологическим методом исследования – это возможность оценки большого количества клеток за малый промежуток времени.

Основные компоненты проточного цитофлуориметра:
гидравлика, оптическая система и электроника (И.В. Кудрявцев, 2019).



Задачи компонентов:

- гидравлика – доставка образца для измерения;

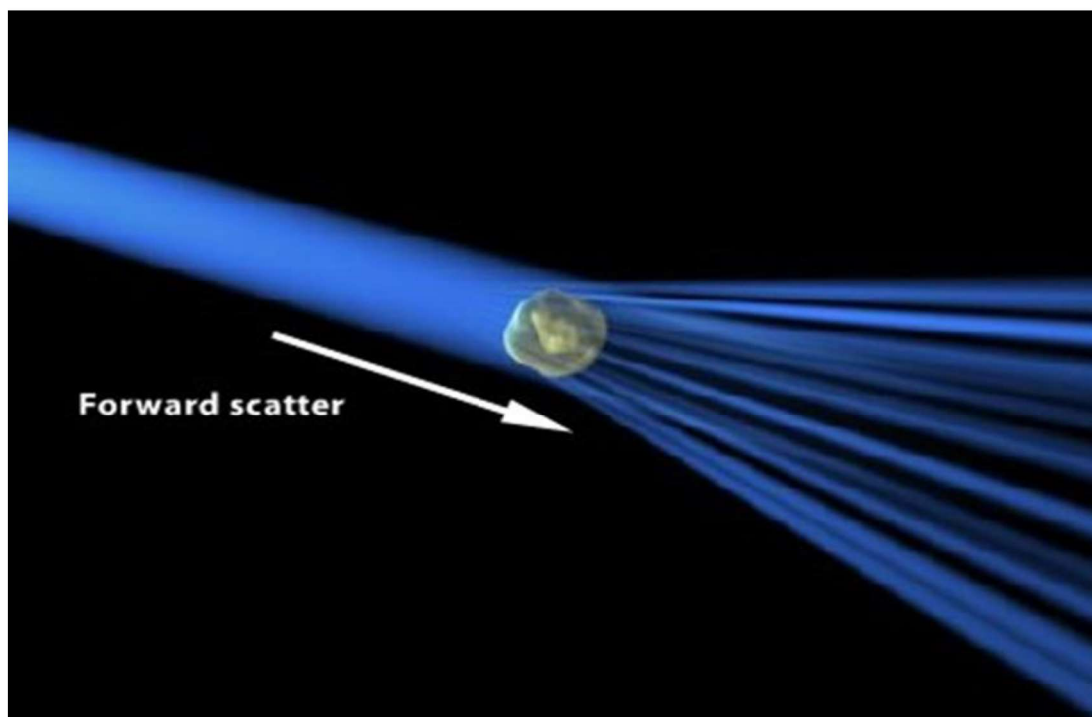
- оптическая система: источники света – облучение образца, система оптических фильтров – сбор излучения;
- электроника – перевод светового сигнала в цифровой сигнал, который может быть проанализирован при помощи программного обеспечения

Электроника – детекторы. Обработка сигнала.

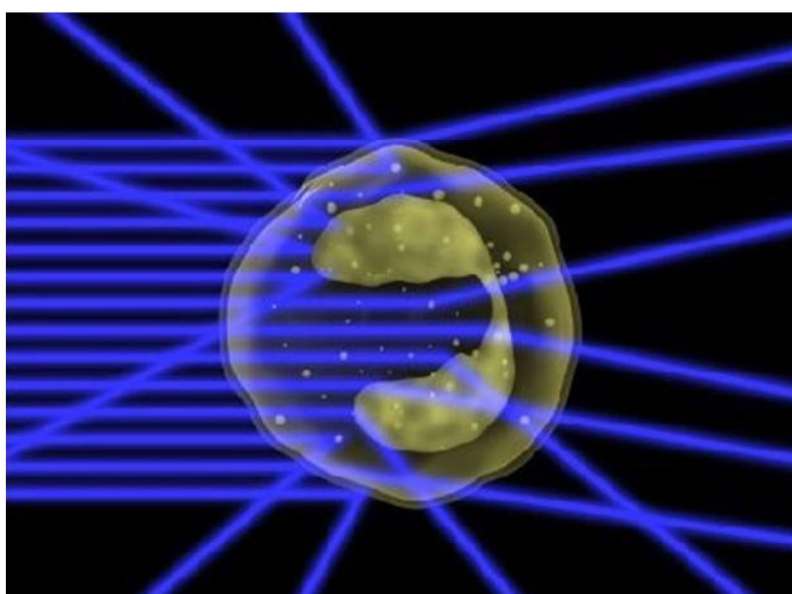
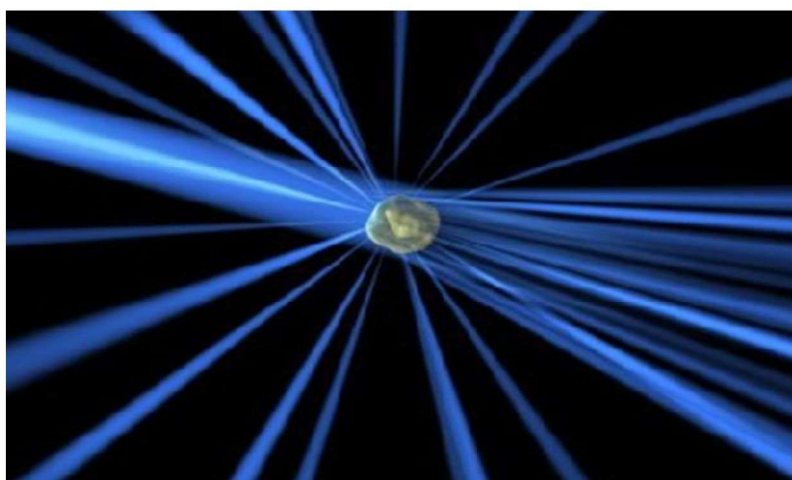
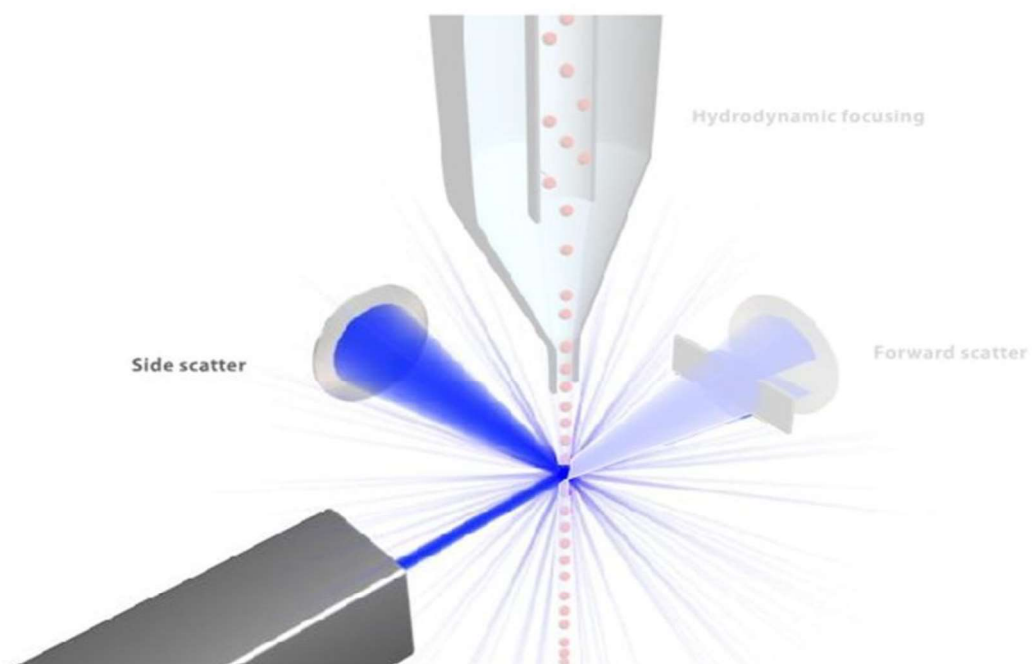
| Event | FS | SS | FL1 | FL2 |
|-------|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 100 | 500 | 650 | 4 |
| 2 | 110 | 505 | 700 | 6 |
| 3 | 90 | 480 | 670 | 10 |
| 4 | 95 | 490 | 720 | 15 |
| 5 | 12 | 76 | 15 | 13 |
| 6 | 120 | 600 | 810 | 785 |
| 7 | 108 | 530 | 595 | 18 |
| 8 | 117 | 654 | 720 | 12 |
| 9 | 54 | 276 | 576 | 18 |
| 10 | 193 | 803 | 912 | 790 |

Перевод светового сигнала в цифровой. Каждой клетке присваивается цифровое значение по каждому из каналов регистрации (FS, SS, FL1, FL2). Чем больше цифровое значение, тем выше экспрессия анализируемого антигена, так как сильнее испускаемое флуоресцентное излучение.

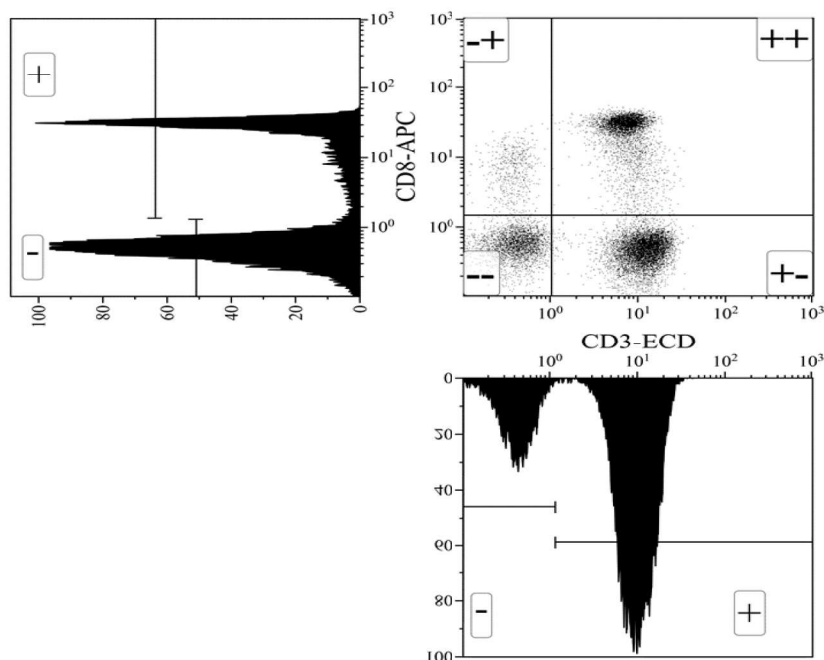
Регистрация светорассеяния в прямом направлении – анализ относительного размера или диаметра частиц



Регистрация светорассеяния в боковом направлении – анализ «структуры» частиц



Анализ сигнала. Двухпараметрическая гистограмма – это две однопараметрические гистограммы, сложенные «вместе»:



IV. Правила пересчёта относительного количества (%) лимфоцитов в иммунограмме на абсолютные числа.

1. Необходим клинический анализ крови (не позднее 2 дней до или после сдачи крови на иммунограмму).
2. Из клинического анализа крови берём абсолютное число лимфоцитов (например, 2,6).
3. Из иммунограммы берём относительное число определённой субпопуляции лимфоцитов (например, CD3=68%)
4. Считаем по формуле:

$$\frac{2,6 \times 68}{100} = 1,77$$

V. План написания заключения к развернутой иммунограмме:

I. Клеточное звено иммунитета (оценить состояние Т-клеточного звена: активация/угнетение/норма)

1) Т-клеточное звено (основные субпопуляции Т-лимфоцитов: CD3+клетки, CD4+клетки, CD8+ клетки).

Оценить относительное и абсолютное количество CD3+клеток и субпопуляций. Проверить сумму относительных чисел CD4+ и CD8+ клеток. Если определяли содержание Т-НК-клеток, прибавить их процентное количество к CD4+ и CD8+ клеткам.

2) Отношение CD4+/CD8+

При оценке отношения CD4+/CD8+ подчеркнуть состояние Т-клеточного звена иммунитета: угнетение/напряжение/норма.

3) Киллерные клетки: Т-НК-клетки, НК-клетки (натуральные киллерные) клетки. Оценить относительное и абсолютное количество клеток.

4) Маркеры активации (CD3+HLA-DR+, CD3+25+, CD95+).

II. Гуморальное звено иммунитета (оценить состояние Т-клеточного звена: активация/угнетение/норма)

1) В-клеточное звено. Оценить относительное и абсолютное количество В-клеток. Сопоставить с концентрацией иммуноглобулинов основных классов.

Проверить контрольную сумму: Т- + В- + NK-клетки (100±5)

2) Иммуноглобулины основных классов (А, G, М).

3) ЦИК (циркулирующие иммунные комплексы).

III. Система комплимента.

С3 компонент

С4 компонент

IV. Функциональная активность лейкоцитов (РТМЛ или РБТЛ).

IV. Фагоцитарная активность лейкоцитов.

VI. Общее заключение

Список рекомендуемой литературы по теме.

Основная:

1. Болевич С.Б. Биотерапия иммуноопосредованных воспалительных заболеваний / С.Б. Болевич, Т.Г. Синельникова. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012. - 128 с.

2. Хайтов Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учеб. пособие / Р.М. Хайтов. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 280 с.

3. Ковальчук Л.В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии: учебник. / Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская, Р.Я. Мешкова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 640 с.

4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник / Под ред. А.А. Воробьева. - М.: МИА, 2012. - 704 с.

5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник в 2 т. Т. 2. / Под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 480 с.

6. Хайтов Р.М. Иммунология: учебник / Р.М. Хайтов. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 496 с.

Дополнительная литература:

1. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии: учебник / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская, Р. Я. Мешкова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 640 с.

2. Ляликов С.А. Клиническая иммунология и аллергология. / С.А. Ляликов, Н.М. Тихон. - Минск: Вышэйшая школа, 2015. - 358 с.

3. Медицинская микробиология и иммунология: учебник / Под ред. В.В. Зверева, А.С. Быкова. - М.: МИА, 2016. - 816 с.

4. Основы клинической иммунологии и аллергологии: учеб. пос. для студентов медицинских вузов / Под редакцией Л.С. Намазова-Баранова, Л.В. Ганковская, Н.Г. Астафьева. - М.: ПедиатрЪ, 2016. - 154 с.

5. Хайтов Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учеб. пособие / Р.М. Хайтов. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. - 496 с.

6. Хаитов Р.М. Аллергология и иммунология: национальное руководство. Краткое издание / Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОТАР, 2019. – 328 с.