

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ ПО ОСВОЕНИЮ
ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.04 Иммунологические методы исследования

Направление подготовки (специальность) 06.04.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очно-заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Тематическое содержание дисциплины	3
1.1. Тема 1: «Методологическая и технологическая база иммунологических исследований».....	3
1.2 Тема 2: «Иммунный статус: направления исследований».....	4
1.3 Тема 3: «Иммунологические методы исследования в диагностической практике инфекционных заболеваний и иммунопатологических состояний»	6
2. Методические рекомендации по выполнению курсовой работы (проекта).....	10
3. Методические рекомендации по выполнению индивидуальных домашних заданий (контрольных работ).....	10

1. Тематическое содержание дисциплины

1.1. Тема 1: «Методологическая и технологическая база иммунологических исследований» .

1.1.1. Перечень и краткое содержание рассматриваемых вопросов:

1. Наименование вопроса №1. Методы иммунологических исследований.

1. Методы определения веществ, характеризующихся наличием АТ против них. Методы иммуноанализа а) РА; б) методы гемолиза; в) РП; г) ИФА; РИА, иммунофлюоресцентный анализ.

2. Методы фракционирования: а) выделение Ig солями серной кислоты; б) методы хроматографии; в) центрифугирование в средах с градиентами плавучей плотности; г) электрофорез; д) проточная цитофлюометрия.

3. Иммуногистохимические методы

4. Методы молекулярной биологии (ПЦР):

1) Генетические методы: а) Методы направленного мутагенеза; б) методы изучения экспрессии генов и методы картирования и исследования мутаций.

5. Методы биотехнологии – клонирование молекул, ПЦР, получение рекомбинантных белков, создание инбриидных генов.

6. Методы изучения свойств нативных клеток иммунной системы в культурах *in vitro*.

7. Методы исследования функции и взаимодействия клеток *in vivo*

Современная иммунологическая лаборатория имеет возможность провести: 1) оценку иммунного статуса; 2) диагностику первичных иммунодефицитов; 3) аллергodiагностику;

4) диагностику аутоиммунных, инфекционных, онкологических заболеваний; 5) обеспечить трансплантацию.

2. Наименование вопроса №2. Организация проведения иммунологических исследований

3. Наименование вопроса №3. Принципы организации иммунологической лаборатории.

Основные принципы организации иммунологической лаборатории: 1) востребованность клиницистами; 2) минимум «ненужных» анализов; 3) преемственность лабораторных иммунологических исследований; 4) стандартные протоколы методов; 5)

контроль качества; 6) рентабельность лаборатории.

4. Наименование вопроса №4. Виды биологических материалов. Методы фракционирования крови.

Биологические материалы для исследований в иммунологической лаборатории: цельная и периферическая кровь; сыворотка крови; плазма крови; клетки крови; отделенные от жидкой фракции; цереброспинальная жидкость; синовиальная жидкость; бронхоальвеолярный лаваж; выделения слизистых секретов половых органов; выделения из носа; моча; супернатанты, полученные от культивирования *in vitro* клеток; гомогенаты тканей; цитоплазматические и ядерные компоненты клеток.

Фракционирование крови - это разделение плазмы крови на группы – компоненты осаждения и хроматографические компоненты. К компонентам крови относятся: трансфузионные среды с признаками донора (резус-фактор, группа крови). Это эритросодержащие смеси, свежезамороженная плазма крови, тромбоцитарные и другие смеси.

1.2. Тема 2: «Иммунный статус: направления исследований ».

1.2.1 Перечень и краткое содержание рассматриваемых вопросов:

1. Наименование вопроса №1. Количественные и функциональные показатели лейкоцитов в иммунном статусе.

Эти показатели имеют большое значение в диагностике гематологических, инфекционных, воспалительных заболеваний, а также оценке тяжести состояния и эффективности проводимой терапии. Лейкоцитарная формула включает в себя определение относительного количества (%) нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцито. Методики подсчёта разные: с помощью камеры Горяева; с помощью электронных аппаратов (автоанализатор «Техникон», «Культер», «Целлоскоп» и др.).

2. Наименование вопроса №2. Гибридомная технология и моноклональные антитела.

Гибридомная технология - это метод получения большого количества идентичных антител (также называемых моноклональными антителами). Этот процесс начинается с введения мыши (или другого млекопитающего) антигена, который вызывает иммунный ответ. Тип лейкоцитов, В-клетки , вырабатывает антитела, которые связываются с введенным антигеном. Эти продуцирующие антитела В-клетки затем собирают у мышей и, в свою очередь, сливают с бессмертными В-клеточными раковыми клетками, миеломой для получения гибридной клеточной линии, называемой гибридомой , которая обладает как способностью продуцировать антитела, так и В-клетками. клетка, а также долголетие

и воспроизводимость миеломы. Гибридомы можно выращивать в культуре, причем каждая культура начинается с одной жизнеспособной клетки гибридомы, продуцируя культуры, каждая из которых состоит из генетически идентичных гибридом, которые продуцируют одно антитело на культуру (моноклональные), а не смеси различных антител (поликлональные). Линия клеток миеломы, которая используется в этом процессе, выбирается из-за ее способности расти в культуре ткани и из-за отсутствия синтеза антител. В отличие от поликлональных антител, которые представляют собой смеси многих различных молекул антител, все моноклональные антитела, продуцируемые каждой линией гибридомы, химически идентичны.

3. Наименование вопроса №3. Количественные и функциональные показатели иммуноактивных молекул в иммунном статусе (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН, ФНО).

Для оценки процессов распознавания и активации предложены: оценка образования цитокинов (ИФН-гамма, ИЛ-4 и др.) Т-клетками при распознавании специфического антигена; оценка уровня провоспалительных цитокинов (ФНО-альфа, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и др.) в сыворотке крови и других биологических жидкостях. Цитокины исследуются преимущественно в ИФА.

4. Наименование вопроса №4. Количественные и функциональные показатели лимфоцитов в иммунном статусе.

Систему адаптивного иммунитета характеризует субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови, для исследования которого применяют определить метод иммунофенотипирования с помощью проточной цитофлюориметрии. Иммунофенотипирование основано на реакции моноклональных антител с антигенами. С помощью этого метода на поверхности лейкоцитов определяют маркеры дифференциации, называемых CD-антigenами (клusters дифференцировки). Лейкоциты синтезируют и представляют набор поверхностных и цитоплазматических маркеров (антигенов), специфичных как для своей субпопуляции, так и определенной стадии развития

5. Наименование вопроса №5. Проточный цитофлюориметр.

Проточный цитофлюориметр – это прибор, позволяющий измерять оптические свойства индивидуальных клеток в суспензии. Использование суспензии клеток является необходимым условием, поскольку измерение производится в токе жидкости. Большинство существующих в настоящее время приборов измеряют такие параметры клеток, как светорассеяние под разными углами и флуоресценция в различных диапазонах спектра. Высокая производительность проточных цитофлюориметров

обеспечивает измерение до нескольких десятков тысяч клеток в секунду, при этом для каждой клетки, в зависимости от конструкции прибора, может измеряться от 5 до 14 и более параметров. Анализ собранных данных позволяет выделить популяции клеток, обладающие теми или иными свойствами, определить их относительное и абсолютное содержание в образце.

6. Наименование вопроса №6. Методы определения количественных и качественных показателей гуморальных факторов врожденного иммунитета.

Комплемент - это термолабильные сывороточные белки, которые при активации вызывают лизис. Методом оценки функциональной активности системы комплемента является метод 50% гемолиза. Его суть сводится к тому, что исследуемый образец сыворотки крови в разных разведениях смешивают с гемолитической системой, играющей индикаторную роль. При этом гемолитические системы, используемые для тестирования классического и альтернативного путей активации комплемента, различаются. Гемолитическая система для тестирования классического пути активации комплемента представляет собой суспензию эритроцитов барана, сенсибилизованных (обработанных) антителами к ним же.

Лактоферрин. Определение основано на принципе иммунохроматографического анализа. Анализируемый образец жидкого биологического материала абсорбируется поглощающим участком тест-полоски. При наличии в образце лактоферрина он вступает в реакцию с нанесенными на стартовую зону специфическими моноклональными антителами против лактоферрина, меченными окрашенными частицами, и продолжает движение с током жидкости. В аналитической зоне тест-полоски происходит взаимодействие со специфическими моноклональными антителами, иммобилизованными на поверхности мембранны, с образованием окрашенного иммунного комплекса.

Определение активности лизоцима в сыворотке крови основано на способности лизоцима сыворотки крови вызывать лизис бактерий *Micrococcus lisodeicticus*. Расчет: показателем активности лизоцима служит относительная величина, равная разности между % светопропускания испытуемой смеси после часовой экспозиции и % светопропускаемости исходной взвеси.

1.3. Тема 3: «Иммунологические методы исследования в диагностической практике инфекционных заболеваний и иммунопатологических состояний».

1.3.1 Перечень и краткое содержание рассматриваемых вопросов:

1. Наименование вопроса №1. Исследование цитотоксической и пролиферативной активности лимфоцитов. Оценка цитокинпродуцирующей активности клеток.

Для исследования пролиферативной активности иммунокомpetентных клеток

используют тесты на определение: способности Т- и В-лимфоцитов усиливать пролиферацию в ответ на различную стимуляцию (митогенами, антигенами).

Цитотоксические тесты проводят, чтобы оценить способность Т-киллеров, NK-клеток, макрофагов убивать соответствующие клетки-мишени *in vitro*. Пролиферативную активность Т-лимфоцитов оценивают по интенсивности синтеза ДНК в ответ на стимуляцию митогеном (поликлональная стимуляция) или антигеном (моно- и олигоклональная стимуляция).

2. Наименование вопроса №2. Методы исследования уровня иммуноглобулинов и цитокинов в биологическом материале.

Для количественного определения содержания Ig различных классов в сыворотке крови и других биологических жидкостях широкое применение нашли различные варианты постановки реакции преципитации в геле и в жидкой среде, а также метод ИФА. определение концентрации взвешенных частиц, основанная на оценке интенсивности:

IgA, IgG, IgM: методы определения, иммуноблоттинг

IgA, IgG, IgM: методы определения, непрямая иммунофлюoresценция

IgA, IgG, IgM: методы определения, реакция агглютинации.

При постановке непрямого твердофазного ИФА используются моноклональные антитела к IgG.

3. Наименование вопроса №3. Количественные и функциональные иммунологические показатели при первичных иммунодефицитах.

Для первичных иммунодефицитов характерно: 1) снижение числа лейкоцитов всех типов (лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов), иногда лейкоцитоз, эозинофилия, моноцитоз и др.; 2) снижение общего уровня комплемента (C50), гипогаммаглобулинемия при электрофорезе сыворотки крови (менее 10%); 3) уменьшение или отсутствие тени тимуса при рентгенографии у детей; 4) наличие условно-патогенных микроорганизмов в мокроте, на слизистых оболочках, в экссудатах, в крови в диагностических титрах; дисбиозы.

4. Наименование вопроса №4. Количественные и функциональные иммунологические показатели при вторичных иммунодефицитах.

Вторичный иммунодефицит — это патологическое состояние, при котором дефект одного или нескольких механизмов иммунного ответа приводит к нарушению иммунной системы в целом. Оно развивается на фоне основного заболевания.

Схема обследования различных звеньев иммунной системы (иммунограмма): лейкоцитарная формула (высокий или низкий уровень нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов); реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) — исследование

субпопуляций и функциональной активности Т- и В-лимфоцитов (повышение или понижение СД4-, СД8-, СД16-, СД95-клеток); оценка неспецифической защиты — фагоцитоза и комплемента (снижение бактерицидной активности макрофагов, гранулоцитов, фагоцитарного числа, индекса завершённости фагоцитоза и содержания комплемента); показатели работы интерферонового звена (снижение уровня α - и γ -интерферона); реже исследуют продукцию цитокинов (фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин-1, -2, -4 и др.) и более углубленно изучают функциональную активность отдельных клеточных субпопуляций. На вторичный иммунодефицит могут указывать как пониженные, так и повышенные показатели иммунограммы.

5. Наименование вопроса №5. Количественные и функциональные иммунологические показатели при аллергиях.

В основе аллергических болезней лежат иммунологические реакции специфической повышенной чувствительности организма к аллергенам. Последние, поступая в организм человека, приводят к повышенной выработке антител (иммуноглобулинов – IgE, IgG). Аллергические реакции, в механизме развития которых задействован IgE, получили название «истинных», или IgE-опосредованных. При взаимодействии IgE-антител и аллергена развивается каскад реакций, приводящих к воспалению и повреждению тканей. Диагностический план обследования при аллергических заболеваниях может также включать: бактериологическое исследование мокроты на флору и чувствительность к антибиотикам; общие анализы крови, анализ крови на содержание кортизола; определение уровня IgA, IgM, IgG в сыворотке крови иммунный и интерфероновый статус; провокационные тесты с аллергенами (конъюнктивальный, назальный, ингаляционный); определение уровня специфических IgG; тест торможения естественной эмиграции лейкоцитов и др.

6. Количественные и функциональные иммунологические показатели при аутоиммунных заболеваниях.

Аутоиммунные заболевания возникают вследствие повышенных иммунных реакций на молекулярные компоненты собственных клеток, тканей и органов, которые выступают в роли антигенов. Нарушается распознавание «своих» молекул клетками системы иммунитета, поэтому образуются аутоантитела и сенсибилизированные Т-лимфоциты со специфическими Т-клеточными рецепторами. Согласно современным представлениям в патогенезе аутоиммунных заболеваний наряду с активацией приобретенного иммунитета (гиперпродукция аутоантител) большая роль принадлежит врожденному звену иммунитета, ответственному за формирование аутоиммунного воспаления. Ключевую роль в активации врожденного иммунитета играют

Toll- (Toll-like receptor, TLR) и NOD-подобные (Nod-like-receptor, NLR) рецепторы, распознающие определенные последовательности (паттерны) микроорганизмов, компонентов ядра, высвобождающихся из подвергнутых апоптозу клеток, кристаллы мочевой кислоты, холестерина. Исследования иммунологических показателей, помимо оценки основных субпопуляций лимфоцитов, уровня циркулирующих иммунных комплексов и основных классов иммуноглобулинов, включает в себя более углубленный анализ малых популяций В-лимфоцитов. Это В-1 клетки (популяция, связанная с продукцией аутоантител), В-клетки памяти, а также Т-регуляторные клетки. Анализ этих клеток в совокупности с основными субпопуляциями лимфоцитов позволяет определить выраженность аутоиммунного компонента в течение заболевания, в динамике оценить эффективность проводимой иммуносупрессивной и противовоспалительной терапии.

7. Наименование вопроса №7. Качественные и функциональные иммунологические показатели при иммунопролиферативных заболеваниях.

Группа этих заболеваний объединяет патологические иммунопролиферативные процессы, которые исходят из клеток иммунной системы. Патология включает широкий спектр состояний от доброкачественных инфекций (инфекционный мононуклеоз) до нарушений злокачественного характера. Среди иммунопролиферативных состояний можно выделить ситуации с выраженным клеточным полиморфизмом или преобладанием однотипных клеточных форм. Основой клинической иммунологии является оценка иммунного статуса человека, т.е. определение количественных показателей и функциональной активности иммунной системы, как в норме, так и при патологии. Предлагается двухэтапный принцип оценки иммунного статуса. На первом этапе выявляются «грубые» дефекты иммунитета с помощью ориентировочных тестов, к которым относятся: определение Т- и В-лимфоцитов в периферической крови; измерение концентрации сывороточных иммуноглобулинов А, G, M; определение фагоцитарной активности лимфоцитов. К тестам второго уровня относятся все тесты, позволяющие оценить функциональную активность Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток, фагоцитов.

8. Наименование вопроса №8. Применение различных иммунологических методов при диагностике бактериальных и вирусных заболеваний.

ОАК при бактериальной инфекции: лейкоциты увеличены иногда значительно (очень редко норма); нейтрофилы выше нормы; лимфоциты ниже нормы (редко норма); СОЭ увеличена. Но тут надо иметь в виду, что СОЭ – показатель медленно реагирующий. Он постепенно, в течение 5-10 дней от начала заболевания, повышается, и также постепенно снижается; при среднетяжелой и тяжелой форме течения бактериальной

инфекции могут появляться молодые формы клеток: миелоциты и метамиелоциты.

ОАК при вирусной инфекции: лейкоциты снижены или остаются в норме (зависит от вируса и индивидуально реакции организма); лимфоциты увеличены; моноциты увеличены; нейтрофилы ниже нормы; скорость оседания эритроцитов (СОЭ) в норме или незначительно повышенна.

Кроме ОАК при диагностике бактериальных и вирусных заболеваний очень широко применяются различные серологические реакции, позволяющие выявлять как АТ в сыворотке крови, так и различные АГ.

9. Наименование вопроса №9. Применение различных иммунологических методов при диагностике инвазионных заболеваний.

Иммунологические методы являются дополняющими к комплексу паразитологических, клинических и лабораторно-инструментальных методов диагностики паразитарных болезней. В диагностике гельминтозов и протозоозов применяются как методы определения специфических антител, так и методы определения антигенов возбудителей. Иммунологические методы выявления антител и антигенов гельминтов и простейших: иммуноферментный анализ (ИФА) (иммуноферментный анализ антител, иммуноферментный анализ антигенов, иммуноферментное определение индекса авидности (ИА) антител класса G, иммунный блоттинг), иммунохроматографический анализ (ИХА), реакция непрямой гемагглютинации (РИГА), реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ).

2. Методические рекомендации по выполнению курсовой работы (проекта)

Курсовая работа (проект) не предусмотрены РУП.

3. Методические рекомендации по выполнению индивидуальных домашних заданий (контрольных работ)

Индивидуальные домашние задания (контрольные работы) не предусмотрены РП.