

Лабораторная диагностика в практике врача аллерголога-иммунолога



Лабораторные методы исследования, используемые для диагностики аллерго- и иммунопатологии:

- Клинический анализ периферической крови;
- Биохимический анализ крови (общий белок!, СРБ, α -фетопротеин при А-Т);
- Определение белковых фракций сыворотки крови (γ -глобулины);
- Иммунный статус;
- Цитология назального секрета, мазка или смыва с конъюнктивы;
- Бактериологические исследования мокроты, мазков с конъюнктив, слизистых оболочек, кожных элементов;
- Ревматологические пробы (СКВ, ЮРА при CVID, CGD);
- Исследование гормонального профиля (гипоплазия паращитовидных желез при DGS; СД1т., гипотиреоз при IPEX);
- Вирусологическое исследование (ПЦР, определение антигенов вирусов или антител к ним);
- Паразитологическое исследование (копроовоцистоскопия, выявление антител к паразитарным антигенам);
- Общий анализ мокроты;
- Общий анализ мочи;
- Копрограмма.

Особенности гемограммы

при ИДЗ

- нейтропения;
- ЖДА (в т.ч.с ↑уровнем ферритина)
- Мегалобластная, иммунная гемолитическая анемия;
- эритроидная аплазия;
- панцитопения;
- злокач.лимфопрлиферация;
- тромбоцитопения, лимфопения ($<1,0 \times 10^9 / \text{л}$)

НОЗОЛОГИИ

- X-сцепленная агаммаглобулинемия;
- Гипер-IgM-синдром (HIGM1, 3); ALPS;
- ОВИН , HIGM1 (парвовирус B19);
- X-сцепленный ЛПС (гемофагоцитоз);
- Синдромы хромосомных поломок (A-T, NBS);
- WAS; DGS;

Лабораторные методы оценки иммунного статуса (ИС)

ИС - комплекс клинико-лабораторных показателей, характеризующих состояние иммунной системы человека на момент обследования(!)

- Согласно методическим рекомендациям, опубликованным в 1984 г. акад. Р.В.Петровым и соавт., оценка иммунного статуса человека осуществляется в 2 этапа:

с помощью тестов I уровня определяют:

- Субпопуляции лимфоцитов;
- Фагоцитарную активность лейкоцитов;
- Титр комплемента (не всегда);
- Иммуноглобулины (IgA, M, G, E).

*служат для выявления грубых
поломок иммунной системы*

с помощью тестов II уровня определяют:

- Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов с помощью моноклональных антител;
- Тест торможения миграции лейкоцитов;
- Оценка пролиферативной активности Т- и В- лимфоцитов на митогены (РБТЛ);
- Оценка активности киллерных лимфоцитов;
- Выявление ЦИК;
- Определение различных компонентов комплемента;
- Определение медиаторов иммунной системы (ИЛ);
- НСТ-тест;
- Анализ генов, ответственных за экспрессию иммунологически значимых молекул.

аналитические

Иммунодиагностика нарушений фагоцитоза

- Оценка хемотаксиса нейтрофилов;
- Оценка адгезивных свойств фагоцитов (пластик, стекло, культура эпителиальных клеток);
- Определение иммунофенотипа нейтрофилов;
- Определение фагоцитарного индекса и числа;
- НСТ-тест;
- Оценка периваривающей способности нейтрофилов.
- микроскопия (поликарбонатн. фильтры+хемоаттрактанты: ФАТ, цитокины); радиометрия;
- непрямая иммунофлуоресценция+моноклональные антитела; спектрофотометрия;
- Проточная цитофлуометрия;
- В присутствии активных форм O_2 , нитросиний тетразолий окрашивается в синий цвет;
- Проточная цитометрия (по меченым флуоресцин-5-тиоционатом *S.aureus*; метит аминокислотные группы белков и при их ферментативном расщеплении выбрасывается из клетки).

Методы количественного определения иммуноглобулинов

- Радиальная иммунодиффузия по Манчини в геле (диаметр кольца преципитации тем больше, чем выше С внесенного антигена);
- Иммуноэлектрофорез;
- Фотометрия;
- Иммуноферментный анализ (ИФА);
- Радиоиммунный анализ (метки – радионуклиды I, ³H).

Особенности иммунной системы у детей

Преобладание Th2-типа иммунного ответа
(предотвращение риска отслойки плаценты,
иммунологических конфликтов с участием
АТ)

Синтез собственных IgE, IgM – 14-15 неделя
эмбрионального периода

Синтез собственных IgG – с 3-х месяцев

IgA – на 1-ом году жизни;

нормализация уровня IgG и IgA - к 3 годам

Шифт Th2 → Th1 – первые годы жизни

Снижено количество Т-клеток памяти

«Атопики» - преобладание Th2 иммунного
ответа

«ЧБД» - преобладание Th2 иммунного ответа

ELISA (ИФА)-твердофазный анализ с использованием реагентов, меченных ферментами

- высокоспецифичен;
- чувствителен;
- позволяет выявить все классы Ig, включая IgE, D, а также секреторные компоненты не только в крови, но и в других биологических жидкостях (sIgA слюна, молозиво, молоко, отделяемое слизистой оболочки респираторного и урогенитального трактов); антигенспецифические иммуноглобулины.

ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС

- Интерлейкины (ИЛ-1 - ИЛ-29)
- Интерфероны (ИФН-альфа, ИФН-бета, ИФН-гамма)
- Факторы некроза опухоли (ФНО-альфа, ФНО-бета)
- Колониестимулирующие факторы (Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ)
- Хемокины (СХС, альфа-хемокины; СС, бета-хемокины; С, гамма-хемокины; СХЗС, дельта-хемокины) Oppenheim J., 1991
- Семейство ростовых факторов (TGF-бета1; TGF-бета2; TGF-бета3; BMP; GDF; GDNF; Nodal; Lefty; MIS)

ЦИТОКИНЫ ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ

- ИЛ-4. Клетки-мишени – базофилы, тучные клетки, Т-клетки (Th2-, CD8+-), В-клетки.
Рецепторы - IL-4R α ; IL2R γ цепь
- ИЛ-5. Клетки-мишени – В-клетки, тучные клетки, Т-клетки (Th2-), моноциты, макрофаги
Рецепторы - IL-5R α ; β цепь
- ИЛ-13. Клетки-мишени - базофилы, тучные клетки, Т-клетки (Th2-, Th1?)
Рецепторы - IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-4R α , IL2R γ цепь
Факторы некроза опухоли - ФНО-альфа.
Клетки-мишени – нейтрофилы, ЕК-клетки, моноциты, макрофаги, В-клетки, Т-клетки (CD8+-, Th2-, Th1?).
Рецепторы – CD120 α , CD120 β

Цитокины

Антагонисты

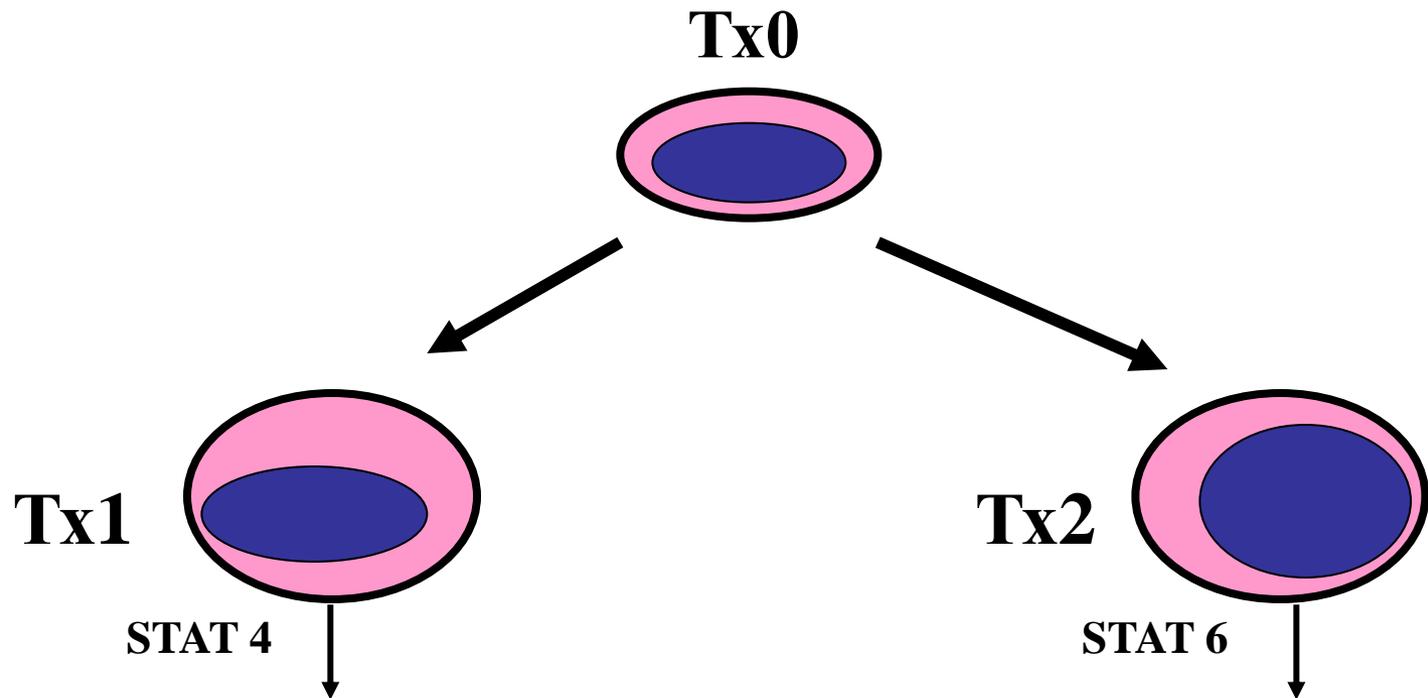
ИЛ-4 ингибирует синтез ИФН- γ

ИЛ-12 препятствует выработке

ИЛ-4

Синергисты

ФНО, ИЛ-1, ИЛ-6



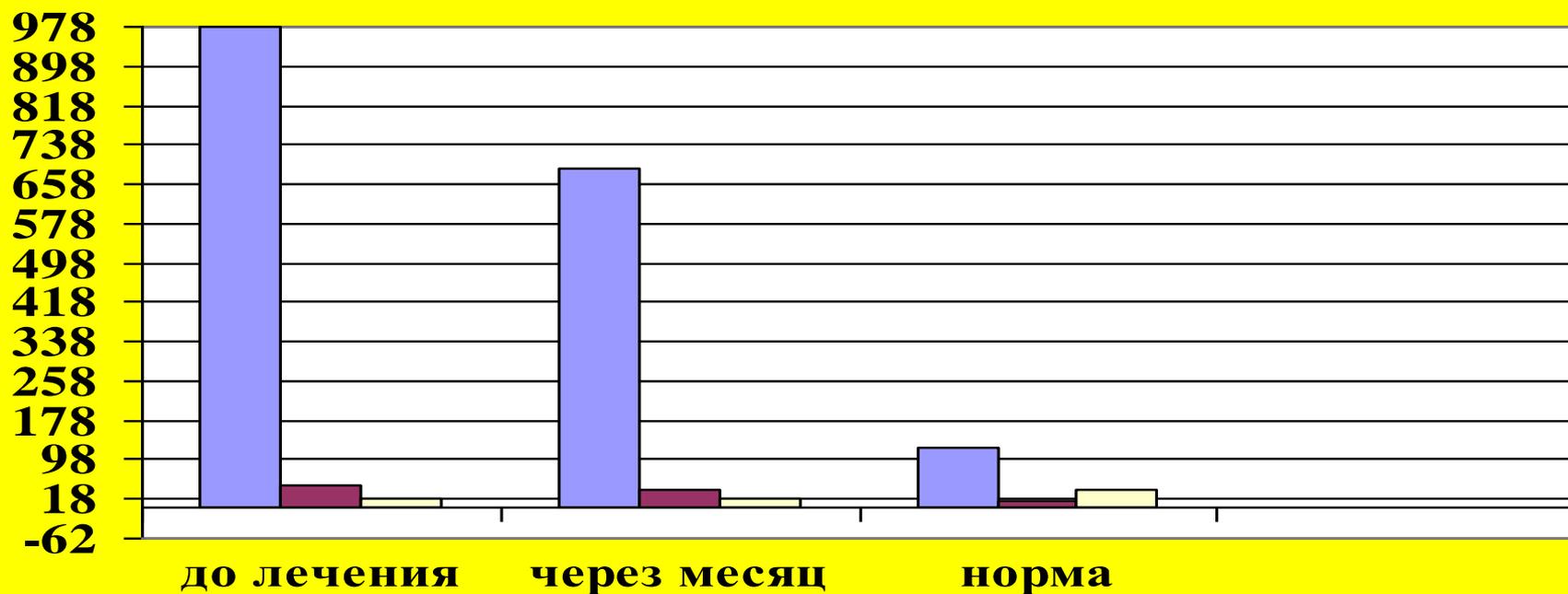
NF-κB ← TLR7 → ИФН1 типа

аллерген

**ИЛ-10, ИЛ-12, ФНОγ, ИФН α ,
ИФН γ**

ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, eotaxin

Уровень ФНО-альфа, ИЛ-4 и ИФН-гамма в слюне у больных
КАР средней и тяжелой степени тяжести, осложненным
хронической инфекцией рото- и носоглотки (мкг/мл) (Булкина
О.З., 2009)



■ ФНО-альфа ■ ИЛ-4 ■ ИФН-гамма

Особенности иммунной системы пациентов с аллергическими заболеваниями



- Снижение синтеза интерферона гамма (ИФН- γ)
- Снижение защитных барьерных функций слизистой оболочки

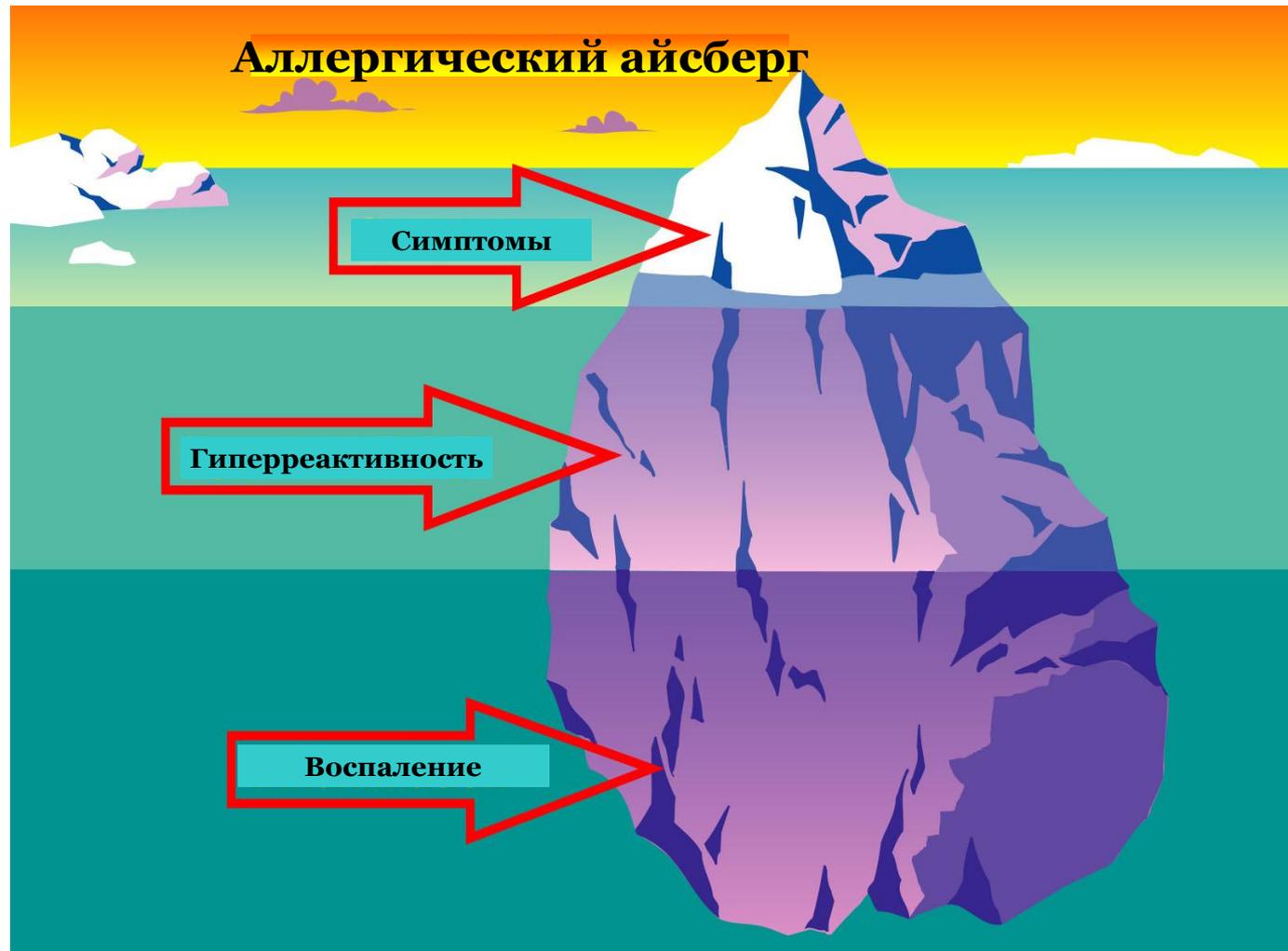
Молекулы адгезии (ICAM): роль в аллергической реакции и воспалении



- Молекулы Адгезии замедляя миграцию эозинофилов по кровяному руслу, помогают их проникновению в ткани.
- При аллергических заболеваниях на клетках повышена экспрессия молекул ICAM; в тканях повышена инфильтрация эозинофилов и определяется персистирующее воспаление

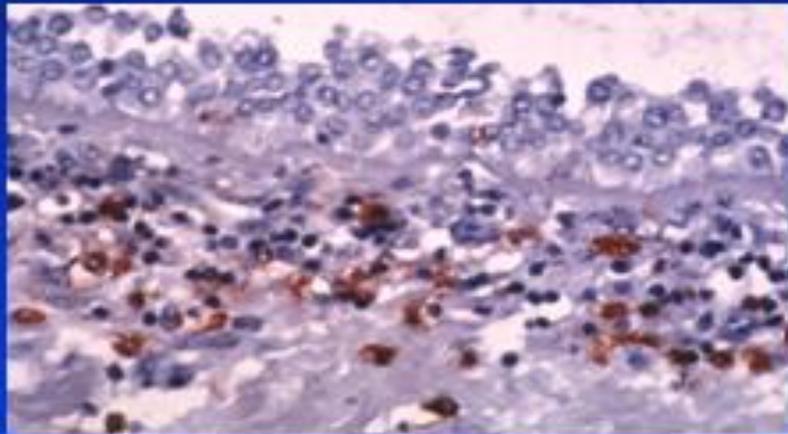
Эндотелиальная
клетка

Миграция эозинофилов и воспаление - «подводная часть аллергического айсберга»



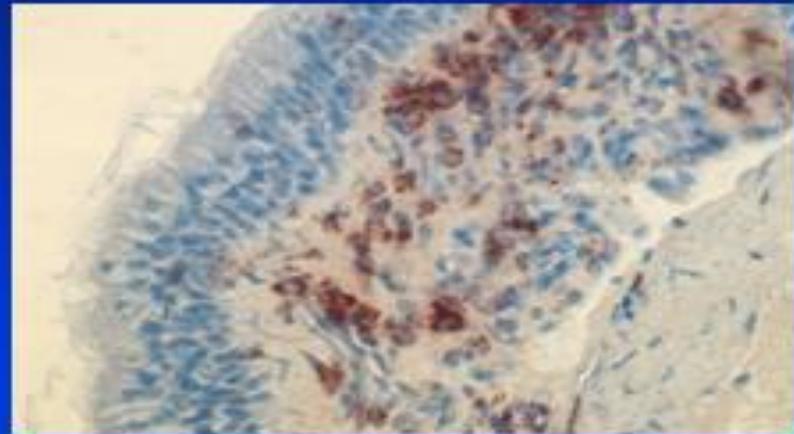
Eosinophils (EG2+cells) in biopsies of asthmatics

Bronchial mucosa



Bousquet J *et al.* N Engl J Med 1990

Nasal mucosa



Chanez P *et al.* Am J Respir Crit Care Med 1999

Роль эпителиальных клеток слизистых

- При повреждении – синтез цитокинов ИЛ-12, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-альфа
- Имеют рецепторы для ИЛ-2, ИФН-гамма
- Экспрессируют HLA-DR, участвуя в презентации АГ
- Синтезируют гликопротеины секреторных IgM и IgA
- Бактерии – сапрофиты на слизистых, через ЛПС стимулируют местный иммунитет

Бронхиальная астма

- Иницирующими воспалению сигналами является Th2-опосредованный локальный «цитокиновый шторм» (синтез ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ФНО α , IgE, повышение экспрессии Fc ϵ рецепторов 1, 2 типа), провоцирующий распространение «от ткани к ткани» сенсibilизации к аллергенам и формирование аллергического
- воспаления

Global atlas of asthma. Ed. Cezmi A. Akdis, Ioana Agache. Published by EAACI 2013. 179p

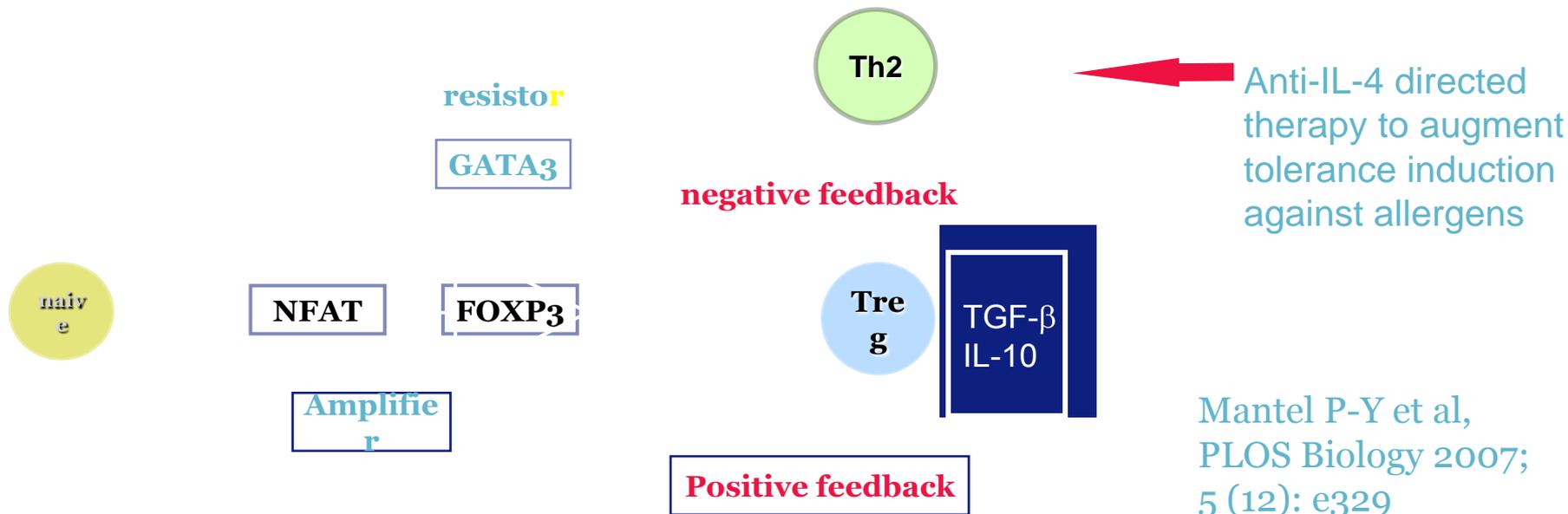
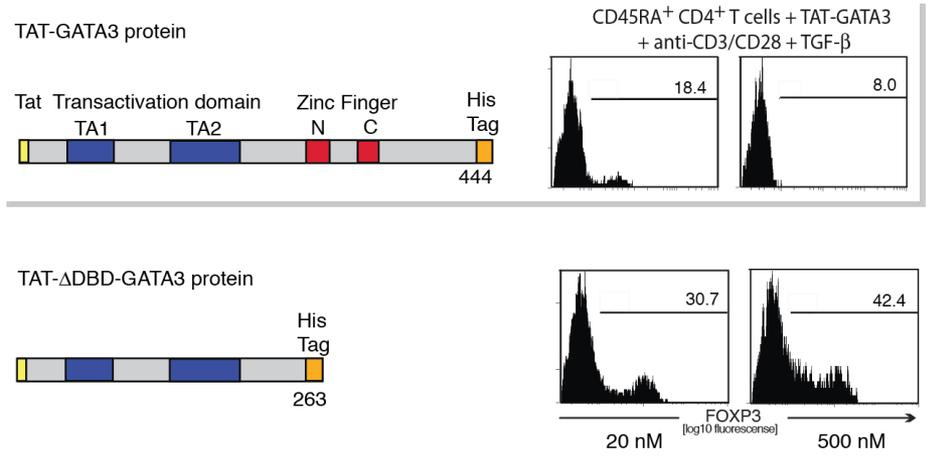
Th2 ответ предупреждает развитие толерантности

OPEN ACCESS Freely available online PLOS BIOLOGY

GATA3-Driven Th2 Responses Inhibit TGF- β 1-Induced FOXP3 Expression and the Formation of Regulatory T Cells

Pierre-Yves Mantel¹, Harmjan Kuipers², Onur Boyman³, Claudio Rhyner¹, Nadia Ouaked¹, Beate Rückert¹, Christian Karagiannidis¹, Bart N. Lambrecht², Rudolf W. Hendriks^{2,4}, Reto Cramer¹, Cezmi A. Akdis¹, Kurt Blaser¹, Carsten B. Schmidt-Weber^{1,5*}

1 Swiss Institute of Allergy and Asthma Research Davos (SIAF), Davos-Platz, Switzerland, 2 Department of Pulmonary Medicine, Erasmus Medical College, Rotterdam, The Netherlands, 3 Division of Immunology and Allergy, University Hospital of Lausanne (CHUV), Lausanne, Switzerland, 4 Department of Immunology, Erasmus Medical College, Rotterdam, The Netherlands, 5 Department of Allergy and Clinical Immunology, Imperial College London, London, United Kingdom



Лабораторные маркеры аллергопатологии:

- Общий IgE



первичный билиарный цирроз;
ВИЧ-инфекция; семейный
дефицит IgE с рецидивирующими
синопульмональными инфекциями



первичные иммунодефициты
(гипер-IgE-синдром, WAS),
паразитарные инвазии, ауто-
иммунные заболевания,
неоплазии, пульмонарный
гемосидероз

!Около 30% пациентов с атопией имеют N уровень IgE+
вариабельность границ нормы!

Специфические IgE (РАСТ, МАСТ)

Преимущества:

- ✓ безопасность;
- ✓ на проведение не влияет состояние кожи и прием ЛС;
- ✓ однократная инвазивность .

Недостатки:

- ✓ стоимость;
- ✓ готовность результатов через 5-7 д.;
- ✓ измеряются только циркулирующие IgE;
- ✓ не распознаются неболковые антигены;
- ✓ наличие перекрестной реактивности между ингаляционными и пищевыми аллергенами.

Молекулярная диагностика аллергии

- Аллергокомпоненты – индивидуальные аллергенные белки:
 - мажорные;
 - минорные;
 - натуральные;
 - рекомбинантные;
- Иммуносар ISAC – иммунохемилюминесценция на твердофазном аллергочипе;
- Высокоспецифичен;
- Прогноз перекрестной реактивности аллергенов;
- Позволяет оценить термостабильность/термолабильность белков, устойчивость к гидролизу пищеварительными ферментами.

Прогноз частоты и тяжести аллергических симптомов на примере наличия или отсутствия IgE к экстракту “Яичный белок”, f1 и компоненту белка яйца “Овомукоид nGal d1”.

Результаты тестирования	«Яичный белок», f1 + «n Gal d 1 Овомукоид»		
Результаты тестирования	Яичный белок - Овомукоид -	Яичный белок + Овомукоид -	Яичный белок + Овомукоид +
Интерпретация результатов	Низкий риск клинических проявлений на яйцо	Риск клинических проявлений на яйцо	Высокий риск клинических проявлений на яйцо
Прогноз	Низкий риск аллергии на яйцо	Отсутствие IgE к овомукоиду допускает прием в пищу термически обработанного яйца	Высокий риск постоянной аллергии на яйцо

РБТЛ в ответ на
действие митогенов
(ФГА)

Эозинофильный
катионный белок

β -триптаза – маркер
анафилаксии

Реакция
высвобождения
гистамина и
лейкотриенов из
базофилов

Эозинофилия
периферической крови,
на слизистых оболочках



Спасибо за внимание!