

Е.В. Просекова, Н.Р. Забелина, В.А. Сабыныч

# ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ



Владивосток  
Медицина ДВ  
2016



Издательство «Медицина ДВ»  
690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 4  
Тел.: (423) 245-56-49. E-mail: medicinaDV@mail.ru

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
Тихоокеанский государственный медицинский университет

**Е.В. Просекова, Н.Р. Забелина, В.А. Сабыныч**

# **ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ**

*Учебное пособие*

*Рекомендовано Координационным советом по области образования  
«Здравоохранение и медицинские науки» в качестве учебного пособия  
для обучающихся по основным профессиональным образовательным  
программам высшего образования – программам ординатуры  
по специальности Клиническая лабораторная диагностика*



Владивосток  
Медицина ДВ  
2016

УДК 616-074/-078(075.8)  
ББК 53.4я7  
П 822

*Издано по рекомендации редакционно-издательского совета  
Тихоокеанского государственного медицинского университета*

**Рецензенты:**

**Ю.С. Хотимченко** – д.б.н., профессор, директор школы биомедицины  
Дальневосточного федерального университета  
Министерства образования и науки Российской Федерации  
**Т.Ф. Боровская** – д.м.н., профессор кафедры биологической химии  
и клинической лабораторной диагностики  
Дальневосточного государственного медицинского университета  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Просекова, Е.В.**

П 822 Иммунологические методы исследования в клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / Е.В. Просекова, Н.Р. Забелина, В.А. Сабыныч. – Владивосток : Медицина ДВ, 2016. – 120 с.  
ISBN 978-5-98301-070-3

В учебном пособии отражены современные подходы к патогенетическому принципу иммунологических методов исследования, представлены современные требования и рекомендации по теоретическим аспектам и практической значимости иммунологических методов в многопрофильной научно-исследовательской работе и клинической практике, рассмотрены особенности контроля их качества.

Учебное пособие составлено в соответствии с требованиями Федеральных государственных образовательных стандартов и предназначено для клинических интернов и ординаторов по специальности Клиническая лабораторная диагностика.

УДК 616-074/-078(075.8)  
ББК 53.4я7

ISBN 978-5-98301-070-3

© Коллектив авторов ТГМУ, 2016  
© «Медицина ДВ», 2016

## Список сокращений

АГ	– антиген
АТ	– антитело
АГ-АТ	– комплекс антиген-антитело (иммунный комплекс)
АОК	– антителообразующая клетка
ВПГ	– вирус простого герпеса
ВВЗ	– вирус Варицеллазостер
ВЭБ	– вирус Эпштейн-Барра
ГВИ	– герпесвирусные инфекции
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИА	– индекс авидности
ИФА	– иммуноферментный анализ
ИХЛА	– иммунохемилюминесцентный анализ
НИФ	– непрямая иммунофлюоресценция
ПИФ	– прямая иммунофлюоресценция
РА	– реакция агглютинации
РИФ	– реакция иммунофлюоресценции
РП	– реакция преципитации
РГА	– реакция гемагглютинации
РТГА	– реакция торможения гемагглютинации
РНГА	– реакция непрямой гемагглютинации
РПГА	– реакция пассивной гемагглютинации
РН	– реакция нейтрализации
РТН	– реакция торможения нейтрализации
РИА	– радиоимунный анализ
РМП	– реакция микропреципитации
РБО	– реакция бляшкообразования
РТБО	– реакция торможения бляшкообразования
РГадс	– реакция гемадсорбции
РТГадс	– реакция торможения гемадсорбции
ЦП	– цветная проба
ЦПД	– цитопатогенное действие
РТ ЦПД	– реакция торможения цитопатогенного действия

РТЦП	– реакция торможения цветной пробы
TCR-T	– лимфоцита клеточный рецептор
ЦМВ	– цитомегаловирус
CD4	– Т-хелперы
EBNA IgM	– иммуноглобулины к нуклеиновому антигену
IgM, IgG, IgA	– иммуноглобулины А, М, G
IgG EA	– иммуноглобулины к раннему антигену
NK	– натуральные киллеры
VCA IgM	– иммуноглобулины к капсидному антигену
Fab	– фрагмент антитела
PAMP	– Pathogen-associatedmolecularpatterns – патогенассоциированные молекулярные паттерны

## Введение

Иммунная система человека обладает способностью выработки *специфических молекул антител* к различным по своей индивидуальности *антигенам*. Уникальность иммунной системы состоит в том, что в ней заложены регуляторные функции, которые позволяют при наличии каждого конкретного антигена, являющегося пусковым механизмом иммунного ответа, реагировать нестандартно в соответствии с индивидуальными особенностями организма и системы иммунитета.

Иммунитет можно описать как систему своеобразных защитных реакций, обеспечивающих надзор за антигенным составом внутренней среды организма человека, основанную на наличии распознающих молекул и связанную с формированием неординарной памяти.

Лабораторная диагностика, основанная на специфическом взаимодействии антигенов и антител, позволяющая выявлять как антитела, так и антигены, широко используется в практической медицине. Эти реакции обозначили как серологические – от латинского *serum* – сыворотка и *logos* – учение. В настоящее время для названия методов исследования с использованием принципа специфической реакции взаимодействия антигена и антитела применяют термин иммунологические при единичном сохранении в научной литературе названия серологические.

В клинической диагностической лаборатории с помощью этих методов исследования определяют группы крови, диагностируют инфекционные и паразитарные заболевания, выявляют регуляторные белки, клеточные структуры, тканевые и опухолевые антигены, визуализируют процессы сенсибилизации и аутоиммунное воспаление, гормональные нарушения, проводят фенотипирование клеток.

Исторически феномен образования иммунных комплексов «антиген-антитело» был зарегистрирован бактериологами без объяснения и расшифровки иммунных механизмов специфичности этой реакции. Сыворотка человека, перенесшего заболевание, давала видимую реакцию склеивания с бактериями, вызвавшими данное заболевание. Этот феномен был назван «агглютинация».

Образование комплекса «антиген–антитело» происходит между антигенными детерминантами и Fab-фрагментом антитела. Связь между детерминантами и активным центром обеспечивается разными механизмами:

1. *Электростатическими силами* – притяжение между двумя противоположно заряженными ионизированными группами ( $\text{NH}_3^+$  и  $\text{COO}^-$ ).
2. *Водородными связями* – между  $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$  и  $\text{COOH}$  гидрофильными группами.
3. *Гидрофобными взаимодействиями* – при соприкосновении гидрофобных групп белков в воде наступает их взаимное притяжение.
4. *Вандерваальсовыми силами* – взаимодействие внешних электронных облаков, зависящее от площади контакта АГ и АТ и встречи зарядов противоположного знака.

Сила и прочность связи в иммунном комплексе между АГ-АТ варьируют в зависимости от характеристик и природы участников реакции и могут быть прочными и непрочными. Более прочному связыванию способствуют большее количество *антигенных детерминант* в антигене, количественное соотношение антигена и антитела (реакция становится результативнее при эквивалентном их соотношении), последовательность расположения концевых групп аминокислот в детерминанте, наличие в детерминанте ароматических аминокислот, а также *аффинность* и *авидность* антитела.

*Антитела*, применяемые в иммунных реакциях выявления антигена, входят в состав иммунных сывороток. Иммунные сыворотки ранее готовились путем иммунизации животных: баранов, ослов, кроликов, лошадей соответствующими антигенами. После выработки специфических антител у иммунизированного животного венепункцией забирали кровь, отделяли сыворотку от клеточной массы и определяли титр искомого антитела.

В настоящее время иммунные сыворотки готовят с использованием гибридомной технологии. Гибридома вырабатывает моноклональные антитела. Принцип применения технологии гибридомы состоит в том, что у иммунизированной мыши из селезенки выделяется антителообразующая клетка (АОК или плазмочит), способная вырабатывать антитела с одинаковыми свойствами. Эту клетку объединяют с опухолевой клеткой (выделенной из В-лимфомы), получая гибридную клетку, которая может одновременно вырабатывать антитела и быть бессмертной. Гибридомные технологии в настоящее время позволяют получать моноклональные антитела к широкому спектру антигенов.

*Иммунные реакции*, используемые в клинической лабораторной диагностике, в зависимости от механизмов и принципов визуализации классифицируют:

- на *двухкомпонентные* с применением только антигенов и антител – реакции агглютинации, преципитации, нейтрализации. Регистрация результатов в этих реакциях происходит визуально, иммунный комплекс образуется между корпускулярным антигеном и антителами, преимущественно представленными высоковалентными иммуноглобулинами М (IgM);
- на *реакции с использованием антигена, антитела и «метки»*, присоединяемой к одному из них, для визуализации и регистрации оптическими или иными приборами – иммунофлюоресцентный, радиоиммунный, иммуноферментный, иммунохемилюминесцентный, метод иммуноблотинга и др. Необходимость привлечения дополнительных средств визуализации объясняется тем, что результат реакции с образованием иммунного комплекса между растворимыми антигеном и антителом не визуализируется, а метка служит маркером завершённой реакции и количественно фиксируется с помощью аппаратуры. В зависимости от природы используемой метки применяют разные приборы учета результата реакции: для флюоресцентной метки – флюоресцентный микроскоп, цитофлюориметр, для радиоактивной – счетчик радиоактивности, для ферментной – измерение оптической плотности раствора.

## Основные понятия, термины и определения

**Аккредитация клинической диагностической лаборатории** – это процедура официального установления компетентности лаборатории в клинической диагностике.

**Аналитическая система** – полная совокупность измерительных приборов и другого оборудования, объединенных для выполнения специальных измерений, которая включает в себя также химические и биологические вещества и другие материалы.

**Аналитическая серия** – совокупность измерений лабораторного показателя, выполненных в одних и тех же условиях без перенастройки и калибровки аналитической системы, при которых характеристики аналитической системы остаются стабильными.

**Аналитические характеристики лабораторного метода исследования:**

**Аналитическая чувствительность метода** – способность определять возможно малые количества аналита.

**Аналитическая специфичность метода** – способность определять содержание только того вещества, для выявления которого этот метод предназначен.

**Воспроизводимость измерения (*precision*)** – качество, отражающее близость результатов измерений, выполненных практически в одинаковых условиях.

**Диагностическая специфичность** – частота негативных результатов у практически здоровых людей.

**Диагностическая чувствительность** – частота патологических результатов при обследовании пациентов с определенной патологией.

**Правильность измерения (*accuracy*)** – качество, отражающее близость полученного результата к истинному значению измеряемой концентрации вещества.

Основная функция иммунной системы состоит в защите организма от биологической агрессии, исходящей, как правило, извне от патогенов и их продуктов, чужеродных для макроорганизма. В качестве маркеров чужеродности рассматривают **антигены**.

**Антигены** – биологические тела и молекулы (высокомолекулярные соединения), несущие признаки чужеродной генетической информации, способные специфически стимулировать иммунокомпетентные лимфоидные клетки и обеспечивать развитие иммунного ответа (англ. – *antigen* от *antibody-generator* – «производитель антител»). Чужеродность антигена проявляется относительно конкретного организма – молекула, воспринимаемая как антиген одним организмом, может не восприниматься в качестве такового другим организмом.

**Антигены** – это любые простые или сложные вещества, которые при попадании в организм тем или иным путем вызывают иммунную реакцию и способны своеобразно взаимодействовать с продуктами этой реакции: антителами и иммунными Т-клетками. Иммуногенность молекул антигена во многом определяется наличием в их составе РАМР – патогенассоциированных молекулярных паттернов. По происхождению различают четыре группы АГ: природные; модифицированные; синтетические; гаптены. Виды антигенов: экзогенные (инфекционные и неинфекционные); эндогенные. Инфекционные – включают антигены бактерий, вирусов, грибов и простейших. Бактериальные антигены подразделяются на группоспецифические, видоспецифические, типоспецифические. Неинфекционные антигены состоят из аллергенов растений и лекарств, химических, природных, синтетических и других аллергенов, а также антигенов эритроцитов и лейкоцитов. Антигенами для иммунных реакций могут быть бактерии, вирусы, клетки, аллергены различной природы, рекомбинантные антигены бактерий, вирусов. Для иммунных реакций в лабораторных исследованиях данные препараты называются диагностикумами, готовятся разными методами: фракционированием, осаждением, очисткой и т.д.

**Антигены** обладают следующими свойствами: чужеродностью, антигенностью, иммуногенностью, специфичностью.

**Антигенность** – мера, по которой определяют качество АГ. На введение различных АГ один и тот же организм вырабатывает разное количество антител (АТ). Чем больше выработка АТ, тем выше антигенность АГ.

Антигены, которые позволяют различать особи или группы особей животных одного вида, называют **изоантигенами**.

При присоединении к молекуле белка группы, обеспечивающей новую иммунологическую специфичность, получают антигены, названные конъюгированными. При введении животным этих АГ, содержащих разные химические группировки, вырабатываются АТ,