



Д.К. НОВИКОВ,
Ю.В. СЕРГЕЕВ
Витебский медицинский
университет,
Витебск, Беларусь
Институт аллергологии
и клинической иммунологии,
Москва

УДК 612-083-002.5/6

ИММУНОДИАГНОСТИКА: НЕИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ДОСТОВЕРНОСТЬ ПОЛУЧАЕМОЙ ИНФОРМАЦИИ

Иммунодиагностика — процесс постановки диагноза с помощью совокупности иммунологических методов, которые позволяют выявить то или иное заболевание и/или определить его возбудителя в исследуемом материале. Для этого используются различные методы соответственно основным вариантам иммунного статуса: иммунодефицитного, аллергического, аутоиммунного и др.[2,5]. Так как каждому виду иммунопатологии присущ тот или иной вариант иммунного статуса, следовательно, его будет характеризовать конкретный комплекс иммунологических методов.

Первым этапом диагностики иммунопатологии является выяснение жалоб и сбор анамнеза у больного.

Вторым этапом служит общее клиническое обследование, на основании которого можно установить характер иммунопатологии, ее локализацию, степень вовлечения в нее системы иммунитета (СИ). Исследование крови в этом плане конкретизирует участие СИ в патологическом процессе: лейко- и лимфопении обычно связаны с иммунодефицитом (ИД), эозинофилия — с аллергией, лейкоцитозы — с инфекцией и т.д.

Третий этап включает собственно иммунодиагностику, для которой применяются два вида методов: **антигенспецифические** и **антигеннеспецифические**.

I. ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИГЕННЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Антигеннеспецифические методы оценивают состояние различных клеточных и гуморальных систем иммунитета: лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов-макрофагов, тромбоцитов, системы комплемента. Используемые для этого реакции характеризуют как количество, так и функциональную активность клеток и применяются для

выявления дефекта в СИ при подозрении на иммунодефицит по данным анамнеза (рецидивирующие и хронические гнойно-воспалительные заболевания) и клинического обследования (табл.1).

В настоящее время для этого рекомендуется комплекс методов [1,2,4,8]. Следует подчеркнуть, что наиболее информативно их применение в *динамике иммунопатологии*, т.к. показатели СИ постоянно меняются вследствие иммуномодуляции как самим процессом, так и используемыми методами лечения.

Предлагается [4, 5, 8, 9] использовать при обследовании вначале простые тесты, затем более сложные, уточняющие. Однако на практике нередко оказывается, что простые тесты не нужны, а необходим один — решающий и часто трудоемкий. Так, например, обычными тестами не определить дефект аденозиндезаминазы Т-лимфоцитов (первичный иммунодефицит), или недостаточность С1ингибитора комплемента при наследственном ангионевротическом отеке Квинке.

Существует большое количество показателей важных при оценке состояния СИ.

Основные диагностические показатели лимфоидной системы

Данные анамнеза о реакциях лимфоидной системы и клинико-лабораторные показатели. Гиперплазия или гипоплазия лимфоидной ткани и органов (лимфатических узлов, селезенки, миндалин и др.). Тень тимуса при рентгеноскопии у детей (тимомегалия). Биопсии лимфоидных органов, костного мозга, тканей, их морфологический и иммуноцитохимический анализ. Общий анализ крови, количество лимфоцитов. Цитология экссудатов и биологического материала (лимфоцитоз, лимфопения). Количество гаммаглобулинов.

Т-система иммунитета

1. Количественная характеристика: Т-лимфоциты в крови, процент и абсолютное количество

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Гнойные заболевания ЛОР-органов (отиты, синуситы, флегмонозные ангины, перитонзиллярные абсцессы)	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
Рецидивирующие болезни бронхо-легочной системы (пневмонии, бронхиты и др.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Гнойные заболевания мочевыводящей системы	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Повторные лимфадениты, тонзиллиты, лимфоаденопатия	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Гастрозеропатия с диареей и дисбактериозом	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Вирусоносительство	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лихорадка, длительный субфебрилитет	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ОРВИ более 3-4 раз в году	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+

+ - необходимые; + - желательные исследования

Обращает на себя внимание значительное колебание показателей лимфоидной системы от средних величин у практически здоровых людей. Такая вариабельность “нормальных” величин в одних случаях может отражать скрытый патологический процесс, в других — неблагоприятные экологические воздействия, в третьих — профессиональные вредности, в четвертых — эффект сочетания нескольких “возмущающих” факторов. Поэтому при оценке “нормы” следует учитывать влияние всех указанных факторов. Индивидуальные величины показателя отклоняющиеся более чем на 1,5 сигмы от среднего уровня даже у здоровых должны исключаться из нормы.

Основные показатели системы мононуклеарных фагоцитов (МНФ)

1. Анамнез и клинические признаки, свидетельствующие о фагоцитарных дефектах (рецидивирующие, необычно текущие инфекции; наличие причин, вызвавших ИД).

2. Определение количества лейкоцитов крови, соотношений их видов (нейтрофилы: лимфоциты: моноциты), их морфология.

3. Морфологическая характеристика МНФ в экссудатах и отпечатках (слизистых оболочек и др.).

4. Оценка фагоцитарной и переваривающей активности.

5. НСТ-тест (обычный и стимулированный).

6. Цитохимические методы (миелопероксидаза, катионные белки, неспецифическая эстераза, кислая фосфатаза, 5-нуклеотидаза).

7. Оценка миграции лейкоцитов *in vivo* (в кожные окна или на слизистые оболочки).

8. Оценка хемотаксической активности (спонтанной и направленной).

9. Ответ на лимфокины (фактор подавления миграции, макрофаг активирующий фактор и др.).

10. Характеристика фенотипа: рецепторы (CD13, CD14, CD11/CD18, HLA-DR, CD71), к C3-комplementу, к иммуноглобулинам (Fc), к соматотропину, к эритроцитам (барана, мыши).

11. Оценка прилипаемости (адгезии), спонтанной и с антигенами.

12. Уровень секреции моно- и цитокинов (ИЛ1, ФНО, простагландинов и др.).

13. Активность в АЗКЦ.

14. Оценка хемоллюминесценции (обычной и стимулированной).

Все показатели МНФ, как и лимфоцитов могут быть нормальными, сниженными (при ИД) и повышенными.

Показатели системы гранулоцитов

Для характеристики системы гранулоцитов используют такие же показатели как и МНФ, и дополнительно:

1. Подсчет процента и абсолютного количества в крови и биологических жидкостях нейтрофилов, эозинофилов, базофилов.

2. Определение резервной функции костного мозга при нейтропении (в норме при подкожном введении 1 мг адреналина число лейкоцитов увеличивается в 2 раза через 30 минут).

3. Выявление характерных для миелоцитов и гранулоцитов CD-антигенов, Fc- (CD16, CD32, CD64) и других рецепторов, а также алло-антигенов.

4. Определение взаимодействия с антигенами и аллергенами через антитела, связанные Fc-рецепторами (реакция повреждения, выброса ионов кальция).

5. Оценка фагоцитарной активности (поглотительной и переваривающей).

6. Лейкопенические тесты с аллергенами.

7. Продукция цитокинов.

8. Определение кальпротектина в лейкоцитах и плазме крови.

Показатели тромбоцитов

Для характеристики тромбоцитов используют:

1. Подсчет количества в крови.

2. Характеристику рецепторов (CD29, CD46, CD61 и др.).

3. Оценку способности к агрегации под влиянием антигенов-аллергенов (наличие сорбированных антител) и неспецифических агентов (АДФ и др.).

4. Тромбоцитопенический тест (введение аллергена в организм).

5. Оценку выделения медиаторов (гистамин и др.).

6. Характеристику аллоантигенов (НРА-1-4 и др.).

Характеристика системы комплемента (СК)

Для оценки состояния СК применяют:

1. Определение общей гемолитической активности сыворотки крови в системе “эритроциты барана + инактивированная сыворотка” по 50% гемолизу (не менее 35 CH50 Е\мл);

2. Определение ингибитора С1-эстеразы.

3. Количественное определение компонентов СК.

4. Выявление продуктов активации С4а, С3а, С5а и др.

5. Выявление отложений комплемента в составе иммунных комплексов в биоптатах тканей.

6. Определение комплементсвязывающих рецепторов на лейкоцитах.

Имеются три основных группы антигеннеспецифических методов:

1. Количественная характеристика популяций и субпопуляций лимфоцитов и других лейкоцитов методами иммунофенотипирования клеток по рецепторам, CD-антигенам и другим маркерам.

2. Анализ функций клеток СИ (т.е. лейкоцитов) – пролиферативной, секреторной, цитокиновой, цитотоксической.

3. Определение медиаторов и цитокинов, продуцируемых клетками, в биологических жидкостях.

Количество методов, необходимых для полноценной характеристики состояния системы иммунитета, быстро увеличивается параллельно сложности их выполнения. Приведенные выше перечни основных показателей, характеризующих СИ в целом, показывают, как велик должен быть объем исследований, чтобы достаточно точно и полно выявить возможные дефекты в том или ином звене. Поэтому применение тестов I и даже II уровня [5, 6, 8, 9] для оценки иммунного статуса недостаточно адекватно. Концепция иммунологического образа болезни [2,5], обосновывающая существование для каждого заболевания и его вариантов своих измененных параметров, а также ориентировка на вид и вариант иммунного статуса, позволяет использовать небольшую группу главных диагностических показателей в каждом конкретном случае.

Попытки отбора наиболее простых информативных методов вступают в противоречие с точностью анализа. Так, например, если попытаться проанализировать только весь цитокиновый профиль сыворотки крови больного, то возникает необходимость выполнения нескольких десятков анализов. Выходом из такой ситуации может быть анализ эффектов интеграционного пула медиаторов и цитокинов сыворотки крови как *in vitro*, так *in vivo* [4,5]. Кроме того, возможен анализ ключевых диагностически значимых цитокинов экспресс-методами. Ряд методов для этого разработан нами ранее [2-5]: капиллярный метод ингибиции и стимуляции миграции лейкоцитов, метод оценки хемотаксиса “на плоту”, тест оценки ингибиции и стимуляции адгезии лейкоцитов, тест подавления миграции лейкоцитов лимфокинами [5-9].

Метод проточной цитометрии является высокоточным и эффективным для анализа популяций и субпопуляций любых лейкоцитов, в том числе по двум и трем маркерам с помощью МАТ мече-

ных флюоресцентными метками, однако не может широко использоваться в клинической практике из-за дороговизны анализов.

Для анализа популяций и субпопуляций лимфоцитов помимо методов иммунофлюоресценции с суспензией лимфоцитов можно использовать разработанные нами стабильные иммунодиагностикумы на основе моноклональных антител с обычной лейкосуспензией. Мы применили [6] два варианта методов для выявления CD-антигенов. При прямом методе отмытые активированные эритроциты обрабатывали мАТ предварительно активированными или неактивированными теми же реагентами. Полученные в итоге диагностикумы оказались малоспецифичными. По-видимому, даже при мягкой сорбции мАТ активированными эритроцитами связывались и блокировались Fab-фрагменты. При активации же самих мАТ происходила их агрегация и потеря активности. Поэтому в дальнейшей работе применяли непрямые методы.

Первый вариант непрямого метода включал обработку суспензии лимфоцитов мАТ и последующую инкубацию отмытой суспензии с эритроцитами, покрытыми антителами против мышинных иммуноглобулинов. Эритроциты, покрытые мАТ, связывались с лимфоцитами, несущими CD-антиген и образовывали розетки, которые подсчитывались на окрашенных мазках. Применяя такой метод, оказалось возможным выявлять популяции и субпопуляции лимфоцитов. Однако метод был, как и иммунофлюоресцентный, двухэтапным, требовал одинакового с ним количества антител и отличался значительным уровнем (до 10%) неспецифического связывания эритроцитов, покрытых антимышиными иммуноглобулинами.

В связи с этим, в дальнейшем применили основной оригинальный комбинированный метод (патент 1999 года): эритроциты обрабатывали антителами против иммуноглобулинов мыши и сорбировали на них мАТ. В итоге получили стабильный диагностикум, который использовали в прямой реакции розеткообразования с суспензией неочищенных лейкоцитов. Сравнение метода с проточной цитометрией позволило установить полную корреляцию по CD3, CD4, CD8- антигенам. Однако CD25 – диагностикум выявлял больше активированных лимфоцитов[7].

Клинические испытания этого метода показали [7], что при иммунодефицитных вариантах бронхолегочных и инфекционно-воспалительных

заболеваний, как правило, снижен иммунорегуляторный индекс CD4/CD8. Одновременно отмечалось усиление экспрессии рецепторов активации — CD25, CD71.

Перспективным интеграционным показателем состояния рецепторного аппарата лимфоцитов может служить определение их липополисахарид-связывающих рецепторов [7]. При иммунодефицитах количество лимфоцитов, несущих эти рецепторы, как правило, уменьшалось даже при нормальном уровне CD3Т-лимфоцитов и иммунорегуляторного индекса [7].

II. ДИАГНОСТИКА ИММУНОПАТОЛОГИИ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Антигенспецифические методы широко используются для диагностики инфекций, аутоиммунных заболеваний, патологии репродукции, реакций отторжения трансплантатов, опухолей.

Проблемы определения антител

При всех перечисленных заболеваниях, как правило, выявляют или антитела, характерные для данного вида патологии, или антигены, имеющиеся в сыворотке крови. На этом основано применение различных серологических реакций: реакций агглютинации, преципитации, иммуноферментного и радиоиммунного метода. Однако, антитела и антигены хорошо выявляются, если они имеются в достаточном количестве и не связаны друг с другом, т.е. не находятся в виде иммунных комплексов. Ряд антииммуноглобулиновых ИФА-систем, ориентирован на определение IgG-антитела, что не позволяет выявлять антитела другого, не IgG-изотипа. Это анти-ВИЧ и другие антивирусные и антибактериальные тест-системы.

Гетерогенность спектра антител, их изотипической, субклассовой структуры, не позволяет определить их в стандартных тестах, а запаздывание появления, особенно при первичном иммунном ответе по отношению к патологическому процессу, нередко снижает информационную ценность таких анализов.

Важной противоинойфекционной и противоаллергической системой являются антитела секретов слизистых. Это секреторные IgA, IgE. Если первые обуславливают защиту от бактерий и вирусов, то вторые участвуют в развитии аллергических реакций слизистых оболочек. Однако, ис-

следуются они редко, хотя слюна и мокрота — доступный материал для исследования.

С другой стороны, все лейкоциты (гранулоциты, моноциты, лимфоциты), а также тромбоциты и клетки эндотелия имеют Fc-рецепторы, которые связывают иммуноглобулины-антитела, так что их концентрация в сыворотке крови снижается [5].

Между тем, для выявления антител-иммуноглобулинов, связанных с лейкоцитами больного, в настоящее время используются лишь прямой тест дегрануляции базофилов и реакция повреждения гранулоцитов (РПГ) антигенами-аллергенами, апробированная для диагностики аллергии и сенсибилизации к онкоантигенам [3,5]. Высокоэффективна для выявления антител на лейкоцитах реакция выброса ионов калия [2,5], более простая и не менее информативная, чем реакция освобождения гистамина из лейкоцитов. Ее апробация при лекарственной аллергии (данный журнал) и других видах сенсибилизации указывает на то, что она выявляет весь пул гранулоцитов, связанных антитела. Она перспективна для использования в диагностике инфекций, аутоиммунных заболеваний и опухолей.

Следовательно, при отсутствии антител любых изотипов (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD) в сыворотке крови, не исключено, что они имеются на лейкоцитах или тромбоцитах, или в секретах.

Т-клеточная сенсибилизация

В практической иммунодиагностике реакции, выявляющие Т-клеточную сенсибилизацию, не используются.

К настоящему времени разработано несколько типов таких реакций. Наиболее ранней была реакция бласттрансформации лимфоцитов под влиянием антигенов — тест достаточно сложный. Заменой ему может служить разработанный нами тест индукции экспрессии рецепторов к ИЛ-2 под влиянием антигена, позволяющий оценивать результат уже через сутки [5]. Другой — тест изменение Е-активного розеткообразования под влиянием антигенов опухоли, — позволил выявить у больных раком специфическую противоопухолевую сенсибилизацию [3]. По-прежнему достаточно информативна реакция подавления миграции лейкоцитов под влиянием антигенов, особенно в нашем варианте исполнения [2,5]. Правда, в ней могут участвовать антитела, связанные лейкоцитами.

Следовательно, если не выявлены антитела, это вовсе не значит, что нет иммунного ответа Т-кле-

точного типа. Наоборот, вероятность его при отсутствии антител и наличии индуктора-антигена или аллергена, увеличивается. Нельзя говорить об отсутствии контакта организма с антигеном без определения иммунных Т-клеток, несущих Т-клеточный рецептор.

Поэтому для точной иммунодиагностики должна использоваться совокупность антигенспецифических тестов, характеризующая все параметры иммунного ответа.

Для диагностики инфекций (инфекционный, иммунодефицитный статус) необходимо определение:

- возбудителя, его антигенов и генов в крови, секретах и клетках;
- всех изотипов антител в сыворотке крови (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD);
- основных изотипов антител в секретах: секреторного IgA и др., особенно при патологии слизистых оболочек;
- антител (IgG и др.), связанных с лейкоцитами и тромбоцитами;
- Т-клеточной сенсибилизации (не менее чем в двух тестах).

Для диагностики аллергии определяют такие же показатели иммунной реакции, кроме первого (табл.2). Причем, особенно важно выявление алергенспецифических IgE-антител в сыворотке крови и фиксированных на базофилах при немедленных аллергических реакциях. Однако, в острый период аллергического заболевания они могут не выявляться. Не менее важно определение IgG антител, особенно их некоторых субклассов (IgG4 и др.) как свободных, так и связанных с лейкоцитами и тромбоцитами, при отсроченных аллергических реакциях. Алергенспецифические Т-лимфоциты имеются не только при ПЧЗТ, но и при немедленных реакциях даже в острый период. Это делает необходимым их определение для точной лабораторной диагностики аллергии.

Сходная с аллергией ситуация наблюдается при *аутоиммунных* (аутоаллергических) заболеваниях, при которых доминирует диагностическое определение антител только IgG изотипа против нуклеиновых кислот, цитоплазматических и ядерных структур, иммуноглобулинов. Почти не используются методы определения антител, связанных с клетками (исключение — непрямая проба Кумбса), не применяются тесты оценки Т-клеточной сенсибилизации к органо- и тканеспецифическим антигенам, хотя доказано ее наличие при многих заболеваниях [2-5].

Рекомендуемый перечень методов лабораторной аллергодиагностики

- 1) **IgE – специфический.** Определяется в сыворотке крови методом РАСТ, ИФА и в непрямых тестах дегрануляции базофилов. Наличие специфических антител подтверждает сенсibilизацию к аллергену по I типу аллергических реакций (IgE-опосредуемый механизм). В то же время отсутствие специфических антител в сыворотке крови не исключает сенсibilизации по IgE-зависимому механизму, так как она может быть обусловлена связыванием IgE-антител с аллергеном и базофилами.
- 2) **IgE – специфический, связанный на базофилах.** Определяется в реакциях дегрануляции базофилов и выброса ионов калия.
- 3) **IgG – антитела в сыворотке крови.** Обнаружение специфического IgG говорит о сенсibilизации по III типу аллергических реакций и возможности развития иммунокомплексной патологии с васкулитами.
- 4) **IgG на нейтрофилах.** Выявляются в реакциях повреждения гранулоцитов, выброса ионов калия и др. Наличие специфического IgG, связанного нейтрофилами, указывает на сенсibilизацию по II типу (цитотоксическому) аллергических реакций.
- 5) **IgG, IgE на тромбоцитах** – выявляется в тестах агрегации и дегрануляции тромбоцитов. Особый тип немедленной аллергической реакции, может сопровождаться различными клиническими проявлениями с тромбоцитопениями.
- 6) **T-лимфоцитарная сенсibilизация.** Выявляется: по пролиферативной активности - в реакциях стимуляции аллергеном рецепторов к ИЛ-2; по наличию специфических рецептор-несущих T-клеток - в реакции аллергенспецифического розеткообразования. Характеризует замедленный IV тип аллергической реакции, часто встречается при хронических рецидивирующих процессах.
- 7) **Ингибция прилипаемости лейкоцитов аллергенами.** Тест отражает изменение адгезивной способности лейкоцитов под влиянием аллергенов. Характеризует замедленные и отсроченные аллергические реакции.
- 8) **РИМЛ (реакция ингибции миграции лимфоцитов под влиянием аллергенов).** Отражает выделение цитокинов лимфоцитами под влиянием аллергенов при замедленной аллергической реакции (24-48 ч), но может зависеть и от IgG-антител.

Таким образом, обоснованное применение антигеннеспецифических и антигенспецифических методов — залог успешной диагностики заболеваний. При инфекциях, аллергических и аутоиммунных за-

болеваниях в первую очередь должны использоваться антигенспецифические методы, а при иммунодефицитах — неспецифические, характеризующие состояние различных звеньев системы иммунитета.

Литература

1. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. - М.- Наука –1990.
2. Новиков Д.К. Справочник по клинической иммунологии и аллергологии. – Мн. – Беларусь – 1987.
3. Новиков Д.К. Противоопухолевые реакции лейкоцитов. – Мн. – Наука и техника – 1988.
4. Новиков Д.К., Новикова В.И. Клеточные методы иммунодиагностики. - Мн. – Беларусь – 1979.
5. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. – М. -Витебск – 1996.
6. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Фролова А.В. Стабильные иммунодиагностикумы на основе моноклональных антител для оценки иммунного статуса. // Иммунодиагностика и иммунотерапия. Труды 1-й Международной конф. - Витебск – 1995 – с. 116-118.
7. Новиков П.Д. Клиническое значение изменений иммунного статуса при бронхитах у детей. Дисс. ..канд. мед. наук. – Смоленск – 1998.
8. Петров В.В., Лопухин Ю.М., Чередеев А.Н. и др. Оценка иммунного статуса человека. // Метод. рекомендации МЗ СССР. – М. – 1984.
9. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Чередеев А.Н. Оценка иммунной системы человека: современное состояние вопроса, сложности и достижения. // Иммунология.- 6 – 1998 – с. 8-10.