

Справочные материалы

Клетки микроорганизмов можно изучать как в живом состоянии (метод раздавленной капли и метод висячей капли), так и в фиксированном и окрашенном состоянии.

Метод раздавленной капли.

На поверхность обезжиренного предметного стекла наносят каплю исследуемого материала или суспензию бактерий и покрывают ее покровным стеклом. Капля не должна выходить за края покровного стекла.

Микроскопируют препарат с объективом $\times 40$. Метод раздавленной капли удобен для исследования подвижности бактериальных клеток, а также для изучения крупных микроорганизмов - плесневых грибов, дрожжей.

Метод висячей капли.

Препарат готовят на покровном стекле, в центр которого наносят каплю бактериальной суспензии. Затем специальное предметное стекло с лункой, края которой предварительно смазаны вазелином, прижимают к покровному стеклу так, чтобы капля находилась в центре лунки. Препарат переворачивают покровным стеклом вверх. В правильно приготовленном препарате капля должна свободно висеть над лункой, не касаясь ее дна или краев. Для микроскопии используют вначале сухой объектив $\times 8$, под увеличением которого находят края капли, а затем устанавливают объектив $\times 40$ и исследуют препарат.

Приготовление фиксированных препаратов.

Для приготовления препарата на обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды или изотонического раствора хлорида натрия, в которую бактериологической петлей вносят исследуемый материал и круговыми движениями петли распределяют его таким образом, чтобы получить тонкий и равномерный мазок диаметром 1-1,5 см.

Если исследуют жидкий материал, то его наносят на предметное стекло непосредственно петлей и готовят мазок. Мазки высушивают на воздухе. Для фиксации используют физические и химические методы. Для фиксации мазка физическим методом предметное стекло медленно проводят 3 раза через пламя горелки. Мазки крови, мазки-отпечатки органов и тканей фиксируют химическим методом путем погружения их на 5-20 минут в метиловый или этиловый спирт, смесь Никифорова и другие фиксирующие жидкости.

Для окрашивания микробов используют простые и сложные методы.

При простом методе фиксированный мазок окрашивают каким-либо одним красителем, например, водным раствором фуксина (1-2 минуты) или метиленовым синим (3-5 минут), промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Сложные методы окрашивания включают последовательное использование нескольких красителей. Это позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать одни виды микроорганизмов от других.

Техника микроскопирования с иммерсионной системой

Для бактериоскопического исследования микроорганизмов наиболее часто применяют иммерсионные объективы. В отличие от сухих объективов, при работе с которыми между препаратом и линзой объектива находится воздух, при использовании иммерсионных объективов между линзой объектива и препаратом помещают жидкость, имеющую показатель преломления, близкий показателю преломления стекла. Роль такой жидкости выполняет иммерсионное масло, чаще всего - кедровое масло. Лучи света, проходя через однородную оптическую среду (стекло и масло), не меняют своего направления. Это позволяет существенно повысить четкость изображения. Иммерсионные объективы отличаются от сухих объективов по своему устройству (подвижная фронтальная линза) и по внешнему виду: на их оправе имеется черная круговая нарезка и выгравировано обозначение МИ (масляная иммерсия).

Для микроскопии с иммерсионным объективом требуется хорошее освещение объекта. Для этого используется дополнительная система линз, расположенная под предметным столиком – конденсор. При подготовке микроскопа к работе конденсор с помощью специального винта перемещают вверх до упора.

На окрашенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и помещают стекло на предметный столик. Под визуальным контролем сбоку опускают объектив до соприкосновения с каплей. После погружения объектива в каплю масла вращением макрометрического винта определяют контуры объекта, а затем с помощью микрометрического винта устанавливают четкое изображение объекта.

После окончания микроскопии иммерсионный объектив поднимают, препарат убирают, а фронтальную линзу объектива протирают от остатков масла мягкой салфеткой. Затем объектив переводят на малое увеличение или в нейтральное положение и опускают конденсор.

Скрининговые методы:

- определение процента и абсолютного количества В-лимфоцитов - CD20+ или CD 19+
- определение уровней неспецифических иммуноглобулинов А,М,Г,Е в сыворотке крови;
- определение циркулирующих в крови иммунных комплексов;
- исследование ответа в РБТЛ на В-клеточный митоген.

Уточняющие методы:

- определение специфических иммуноглобулинов
- определение продукции ИЛ-6 in vivo, in vitro;
- определение секреторного иммуноглобулина А.

Система фагоцитов (нейтрофилов)

Скрининговые методы:

- оценка абсолютного числа нейтрофилов;
- исследование интенсивности поглощения микробов фагоцитами (процент клеток фагоцитов и средняя способность каждого фагоцита к поглощению);
- бактерицидность фагоцитов по НСТ тесту.

Уточняющие тесты:

- интенсивность хемотаксиса (миграции) фагоцитов;
- исследование адгезионной способности нейтрофилов к пластику и оценка числа клеток с адгезионными молекулами CD11/CD18 на мембране.

Дифференцировочные антигены Т-лимфоцитов выделяют с помощью метода проточной цитометрии, непрямой иммунофлюоресценции, лимфотоксического теста. Для выполнения этих методов необходимы моноклональные антитела к дифференцировочным антигенам Т-лимфоцитов. С помощью поверхностных антигенных маркеров можно определить популяцию и субпопуляцию клеток, стадию их дифференцировки и активации. Наиболее доступный метод иммунофлюоресценции основан на способности моноантител фиксироваться на поверхности жизнеспособных клеток. Он позволяет выявить специфические антигенные детерминанты: CD3, CD4, CD8 и др. после дополнительной обработки лимфоцитов антииммуноглобулинами, мечеными ФИТЦ. Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) позволяет определить способность этих клеток отвечать

трансформацией в бласты в присутствии митогенов. Бласттрансформация наблюдается в тканях в результате антигенной стимуляции, образующиеся бласты способны к дальнейшей пролиферации и дифференцировке.

Реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) характеризует функциональное состояние Т-системы иммунитета. Метод основан на способности сенсibilизированных Т-лимфоцитов в реакциях с антигеном выделять лимфокины, в том числе и факторы, ингибирующие миграцию лейкоцитов. Феномен РТМЛ наблюдается при внесении в культуру клеток митогенов: ФГА, КонА, и др. В норме у здоровых людей процент миграции в присутствии специфического митогена в зависимости от его вида составляет от 20 до 80. Учет миграции клеток позволяет судить о потенциальной способности лимфоцитов продуцировать цитокины. Для выявления цитокинов применяются также иммуноферментный, радиоиммунный и другие методы.

Реакция торможения адгезии лейкоцитов характеризует функциональное состояние Т-системы иммунитета. Реакция основана на способности лейкоцитов выделять фактор, тормозящий адгезию клеток к пластику в присутствии антигена. Определение количества В-лимфоцитов. В основе методик лежит тот факт, что на поверхности В-лимфоцитов имеются рецепторы для Fc-фрагмента иммуноглобулинов, для третьего компонента (C3), для мышинных эритроцитов и иммуноглобулиновые детерминанты. Наиболее значимыми поверхностными маркерами В-лимфоцитов являются рецепторы CD19, CD20, CD22, определяемые с помощью МАТ методом проточной цитометрии. Определение В-клеток и степени их зрелости важно при первичных гуморальных иммунодефицитах, когда необходимо осуществить дифференциацию между агаммоглобулинемией с В-клетками и без них.

Количественное определение иммуноглобулинов. Наибольшее распространение получил метод Manchini et al (1970), в основе которого используется радиальная иммунодиффузия в геле, содержащем моноспецифическую сыворотку против иммуноглобулинов, затем в лунки вносят стандартный антиген, измеряют кольцо преципитации и по калибровочному графику определяют концентрацию иммуноглобулинов с точностью до 0,003 г\л.

Твердофазный иммуноферментный анализ также нашел широкое распространение, который в силу высокой чувствительности используется для определения в сыворотке минорных иммуноглобулинов IgD и IgE, а также для определения классов и субклассов других иммуноглобулинов.

Получила распространение нефелометрия, основанная на регистрации светового потока, который рассеивается комплексом АГ-АТ, взвешенным в оптически прозрачной среде.

Определение уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке. ЦИКи являются результатом компенсаторной реакции антителообразования, направленной на элиминацию антигенов. Образование растворимых комплексов АГ-АТ провоцирует ряд патологических состояний: ревматизм, системная красная волчанка, артрит и др. Комплексы АГ-АТ-С вызывают повреждения тканей различной степени тяжести: от локальных до некрозо-гемморагических. Определение комплексов производят методом спектрофотометрии сыворотки крови, обработанной полиэтиленгликолем. Метод прост, доступен, в норме уровень ЦИК составляет 90-95%, при увеличении их количества процент пропускания снижается.

Оценка фагоцитоза периферической крови. Предлагается система комплексного исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток периферической крови позволяющая тестировать параметры, изменение которых может свидетельствовать о нарушении толерантности к инфекции. Начальным этапом взаимодействия фагоцита с антигеном является движение фагоцитов, стимулом для которого служат хемоаттрактанты. Затем наступает этап адгезии, за который отвечают поверхностные рецепторы: селектины и интегрины (CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD62L, CD62E), которые определяются с помощью МАТ методом иммунофлюоресценции.

Определение следующей стадии поглощения должно входить в оценку фагоцитарного индекса. Для изучения поглощения используют дрожжи, латексные частицы, *St.aureus*, *E.coli* или *Candida albicans*. Подсчет в окрашенных препаратах числа частиц, поглощенных нейтрофилами, осуществляется с помощью светового, люминесцентного микроскопа, проточного цитометра. Поглонительную способность оценивают по фагоцитарной активности и фагоцитарному индексу. Поглонительная способность нарушается при ряде острых и хронических инфекционных заболеваниях, аутоиммунных процессах. Врожденные изменения этой стадии неизвестны. Стадия киллинга и расщепления осуществляется с помощью кислородзависимых и кислороднезависимых механизмов. В первом случае происходит окисление кислорода НАДФ-Н-оксидазной системой, в результате чего образуются активные формы кислорода, обладающие сильным микробицидным действием и их идентификация представляет важное звено функциональной активности фагоцитарных клеток.

Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) основан на способности восстановления поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции. Наиболее доступен и прост цитохимический вариант теста (по Маянскому А.Н., 1993). Другим методом оценки респираторного взрыва в фагоцитах является измерение спонтанной и индуцированной хемоллюминесценции. НСТ-тест может быть также измерен с помощью проточного цитометра. Показатели НСТ-теста значительно повышаются в начальном периоде заболевания при многих острых и бактериальных инфекциях; при подостром и хроническом течении они чаще бывают снижены.

Лизосомально-катионный тест (ЛКТ) характеризует степень активности кислороднезависимых микробицидных систем фагоцита, которые активируются при образовании фаголизосомы, при этом и происходит разрушение захваченной частицы за счет лизоцима, разнообразных гидролаз, лактоферрина. Принцип метода основан на выявлении неферментных лизосомальных катионных белков (модификация Пигаревского В.Е.), при этом вычисляют средний цитохимический коэффициент (СЦК). При наличии в лаборатории проточного цитометра рекомендуется метод Buchman, Winter (1989).

Оценка системы комплемента производится, как правило, методом иммунного гемолиза. Определение СЗ компонента комплемента проводят при помощи стандартной преципитирующей моноспецифической антисыворотки. В периферической крови содержатся так называемые нулевые лимфоциты — это клетки, не имеющие признаков Т- и В-лимфоцитов, поскольку лишены антигенных рецепторов, либо с заблокированными рецепторами. Вероятно, это незрелые лимфоциты, либо старые клетки, утратившие рецепторы, или клетки, поврежденные токсинами, иммунодепрессантами. 70% людей имеют 8-25% нулевых лимфоцитов. При ряде заболеваний число таких клеток растет либо в случае повреждения клеток, либо за счет выброса незрелых или дефектных клеток. Определение их числа производят; вычитая Т- и В-лимфоциты из общего содержания лимфоцитов.

Определение активности естественных киллеров (NK) проводят с помощью капиллярного теста, информативность которого возрастает при одновременном учете количества лимфоцитов с CD16 маркером. Принцип метода заключается в сокультивировании исследуемых клеток и клеток мишеней в плоском капилляре с трипановым синим. После инкубации учитываются окрашенные клетки-мишени, что соответствует проценту

спонтанной цитотоксичности. Показатель активности НК-клеток у доноров составляет 15%, хотя коэффициент вариации колеблется от 10 до 23%.

В систему определения иммунного статуса может быть включено определение HLA-антигенов лимфоцитов, поскольку многие из них отражают риск развития тех или иных заболеваний. Определение производят с помощью МАТ методом проточной цитометрии или иммунофлюоресценции. Для клинической иммунологии имеет значение связь ряда антигенных маркеров человека с развитием тех или иных заболеваний. Антигенные маркеры рассматриваются как показатели риска развития или неблагоприятного течения заболевания. Выявлено, что здоровые лица, обладающие HLA-антигеном DR3, отличаются пониженной активностью клеток макрофагальной системы: сниженной способностью к продукции интерлейкина-1, замедленной деградацией антигенов, замедленным выведением из организма комплексов АГ-АТ, снижением способности лимфоцитов к стимуляции митогенами.

Объектом иммунологического исследования могут служить периферическая кровь, ликвор, слюна и другие биологические жидкости. Нормы показателей иммунной системы изложены в разделах «Основные показатели иммунного статуса у здоровых лиц» и «Иммунодефициты».

Цитокины

Интерфероны

Интерфероны обладают множеством биологических активностей, которые проявляются в противовирусном, противоопухолевом и иммуностимулирующем действии. Они

блокируют внутриклеточную репликацию вируса, подавляют клеточное деление, стимулируют активность естественных киллеров, повышают фагоцитарную активность макрофагов, активность поверхностных антигенов гистосовместимости и в то же время тормозят созревание моноцитов в макрофаги.

Семейство интерферонов состоит из 15 молекул, отличающихся между собой структурой, молекулярным весом. Описаны 3 типа интерферонов (ИФН), которые классифицируются по принципу клеток – источников. ИФН-альфа продуцируется макрофагами и лейкоцитами в ответ на вирусы, клетки, инфицированные вирусом, злокачественные

клетки и митогены. ИФН-бета синтезируется фибробластами эпителиальными клетками

под действием вирусных антигенов и самого вируса. ИФН-гамма продуцируется активированными Т-лимфоцитами в результате действия индукторов (Т-клеточные митогены,

антигены). Для продукции ИФН-гамма требуются аксессуарные клетки (макрофаги, моноциты, дендритические клетки).

Интерфероны делятся на две группы, основанные на различии в структуре и противовирусной активности. В первую группу входят ИФН-альфа и ИФН-бета, во вторую –

ИФН-гамма.

Интерфероны первого типа обладают более сильной противовирусной активностью, чем второго. С другой стороны, большей иммуномодулирующей активностью обладают интерфероны 2 группы в сравнении с 1 группой. Эти различия связаны с тем, что

интерфероны альфа и бета при противовирусном действии активируют фермент олигоаденилатсинтазу, которая способствует деградации мРНК при репликации вируса. ИФНгамма не активирует этот фермент и как результат – сниженная противовирусная активность. Однако в сравнении с другими интерферонами ИФН-гамма является мощным иммуностимулятором и индуктором неспецифической защиты организма.

Индукторы интерферона

Важнейшее свойство индукторов ИФН — их универсально широкий диапазон противовирусной активности. Индукторы ИФН обладают неспецифическим действием, которое заключается в ингибировании роста клеток, модуляции их дифференцировки и образовании рецепторов мембран. Помимо неспецифических, индукторы ИФН могут модулировать и специфические иммунные ответы организма. Непрямое воздействие индукторов

ИФН на клетки-мишени заключается в активации макрофагов, цитотоксических Тлимфоцитов, антителообразующих В-клеток и натуральных киллеров.

Одним из свойств индукторов ИФН является формирование стойкой неспецифической резистентности в организме на продолжительный период после их введения, который

может длиться иногда неделями. Сформировавшаяся резистентность не может быть объяснена только действием эндогенного ИФН, синтезированного в ответ на введение индуктора, так как этот ИФН выводится из организма гораздо раньше. Резистентность, повидимому, является следствием непосредственного влияния индукторов ИФН на клеточный и гуморальный иммунитет.

Индукторы ИФН стимулируют синтез разных антигенных типов ИФН в разных

пропорциях. Индукторы отличаются друг от друга рядом свойств, так как в синтезе ИФН,

индуцированного разными по своей химической структуре индукторами, принимают участие различные популяции иммуноцитов. Более того, динамика синтеза индуцированных

ИФН и их антигенный состав также зависят от химической структуры индуктора, способа

его применения и популяций стимулированных клеток-мишеней.

В настоящее время индукторы ИФН органично дополняют препараты ИФН. Введение их в организм («эндогенная интерферонизация») имеет следующие преимущества

перед введением препаратов экзогенного ИФН:

- выработка собственного ИФН, который, в отличие от рекомбинантных ИФН, не обладает антигенной активностью;
- принимая участие в иммунных реакциях организма, ИФН стимулируют неспецифическую цитотоксичность иммуноцитов и, кроме того, вызывают экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости в тех популяциях клеток, которые обычно не экспрессируют эти антигены. Это в свою очередь может явиться причиной усугубления аутоиммунного ответа организма, а также демаскировать латентные процессы, происходящие в нем. При введении индукторов ИФН такой опасности нет: синтез ИФН сбалансирован и подвергается контрольным механизмам, обеспечивающим защиту организма от перенасыщения ИФН;
- однократное введение индукторов интерферона обеспечивает относительно длительную циркуляцию ИФН на терапевтическом уровне;

