

# İmmun status və onun qiymətləndirilməsi

# İmmun sistemin əsas funksiyası

- İmmun sistemin insanda əsas funksiyası – orqanizmdə genetik yad cisimcikləri və molekulları (antigenləri) tanımaq, neytrallaşdırmaq, zərərləşdirmək və xaric etməkdir. Antigen şəklində virus, bakteriya, göbələk, toksin və s. ola bilər.
- İmmun sistemin müəyyən mexanizmi (hüceyrə, humoral, qeyri-spesifik və s.) zəifləməsi və ya artıq dərəcədə aktivləşməsi zamanı orqanizmdə xəstəlik başlaya bilər. Bunun nəticəsində infeksiya, allergiya, autoimmün və şiş xəstəlikləri yarana bilər.

# İmmun status nədir?

- İmmun sistemin spesifik və qeyri-spesifik göstəricilərinin müəyyən vaxtda kəmiyyət və funksional cəhətdən kompleks şəkildə qiymətləndirilməsinə immun status deyilir.
- İmmun statusun qiymətləndirilməsi immunoqrama əsasında aparılır.

# İmmunoqramma

- İmmunoqramma insanda immün sistemin əsas göstəricilərinin təyininə və analizinə əsaslanır.
- İmmunoqramma aparıldıqda venoz qan, ağız suyu, burun ifrazatı, göz yaşı, digər selikli qişaların ifrazatları, likvor, toxuma və hüceyrə suspenziyaları və s. istifadə olunur.



# **İlkin və geniş immunoloji müayinələr**

**İlkin immunoloji analiz testləri (I-ci dərəcəli) immun sistemində kobud pozğunluqları aşkar edir.**

**Geniş immunoloji analiz testləri (II-ci dərəcəli) istiqamətli aparılır və immun sistemində aşkarlanmış pozğunluqları daha dəqiq müəyyən edir.**

# I DƏRƏCƏLİ TESTLƏR

- Periferik qanın ümumi analizi, leykosit, neytrofil, monosit, limfosit və trombositlərin nisbi və mütləq miqdarının təyini
- T-limfosit, T-h və Ts populyasiya, B-limfositlərin, NK (təbii killer) hüceyrələrin nisbi və mütləq miqdarının və immun requlyator indeksinin (İRİ) təyini
- Zərdabda İgA, İgM, İgG və İgE--nin miqdarının təyini
- Neytrofillərin faqositar aktivliyinin təyini ( NBT)
- Komplement sisteminin göstəricilərinin (C3, C4) və hemolitik aktivliyinin (CH50) təyini

**Bu testlərin nəticələri anadangəlmə immunçatışmazlıq vəziyyətlərin ilkin diaqnostikasını aparmağa imkan verir.**

# II DƏRƏCƏLİ TESTLƏR

- T- limfositlərin, B-limfositlərin və NK hüceyrələrin nisbi və mütləq miqdarının, onların əsas markerlərinin təyini
- T- və B-limfositlərin mitogenlərlə stimulyasiya testi və proliferasiya aktivliyinin təyini
- Faqositozun reseptorlarının və müxtəlif mərhələlərinin təyini
- Zərdabda və ifrazatlarda İgG, İgM, İgA, İgE və sİgA əksicismlərin, İgG subsiniflərin və spesifik autoəksicismlərin təyini
- Dövredən immun komplekslərin təyini
- Komplement sisteminin göstəricilərinin (C3, C4, C5, C1 inhibitor və hemolitik aktivliyinin - CH50) təyini
- Zərdabda və bioloji mayelərdə sitokinlərin və limfokinlərin təyini
- HLA – tipləşdirilməsi
- Genetik müayinə

**Bu testlər immun patologiyanın dəqiq diaqnostikasını aparmağa imkan verir.**

# İmmun hüceyrələrin əsas markerləri

Hüceyrələr	Markerlər
B-limfositlər	CD19+, CD20+, CD22+
Təbii killerlər (NK-hüceyrələr)	CD3-CD16+CD56+
T-limfositlər, T-helperlər, T-sitotoksik, T-killerlər	CD3+
T-killerlər	CD3+CD16+CD56+
T-helperlər	CD3+CD4+
T-sitotoksik (T-supressorlar)	CD3+CD8+
İl-2 ilə birləşən requlyator T- hüceyrələr воспалительных реакций.	CD3+CD25+

# İmmunogramma testlərin normativləri

## Стандартное исследование иммунного статуса

### Стандартное исследование иммунного статуса

Тип клеток	Результат %	Норма %	Результат $\times 10^9/\mu$	Норма $\times 10^9/\mu$
Лейкоциты			5.82	4,0 - 9,0
Лимфоциты	23.9	19 - 37	1.39	1,2 - 3,0
T-лимфоциты (CD45+ CD3+)	77.30	55,0 - 80,0	1.08	0,95 - 1,8
T-хелперы (CD45+ CD3+ CD4+)	44.20	31,0 - 51,0	0.61	0,57 - 1,1
Цитотоксические T-лимфоциты (CD45+ CD3+ CD8+)	31.10	19,0 - 35,0	<b>0.43</b>	0,45 - 0,85
NK-клетки (CD45+ CD3- CD(16+56)+)	13.00	7,0 - 20,0	0.18	0,18 - 0,42
B-лимфоциты (CD45+ CD3- CD19+)	12.20	6,0 - 19,0	0.17	0,15 - 0,4
Индекс соотношения (CD4+/CD8+)	<b>1.42</b>	1,5 - 2,0		
Фагоцитарная активность нейтрофилов (Латекс-тест)	74.0	55,0 - 95,0		

Показатель	Результат	Норма	Ед.изм.
Иммуноглобулины класса M (IgM)	2.35	0,4 - 2,3	г/л
Иммуноглобулины класса A (IgA)	2.69	0,7 - 4,0	г/л
Иммуноглобулины класса G (IgG)	10.43	7,0 - 16,0	г/л
Иммуноглобулины класса E (IgE)	4.59	1,31 - 165,3	МЕд/мл

# İmmunoloji yaddaş hüceyrələri

Некоторые показатели, отражающие формирование иммунологической памяти

Параметр	Результат	Референсные значения	Ед.Изм.
CD4/CD8	2.25	1.5 - 2.6	
%CD45+CD4+CD45RA+	12	15 - 30	
%CD45+CD4+CD45RO+	31	15 - 30	
%CD4+CD45RA+	24	25 - 55	
%CD4+CD45RO+	70	35 - 65	
Соотношение "наивных" клеток и клеток памяти	0.39	0.45 - 1.25	

**B1-клетки - участвуют в многих аутоиммунных процессах**

Параметр	Результат	Референсные значения	Ед.Изм.
CD45/CD19+CD5+, B1-клетки	1.550	0.500 - 2.100	%

# Активləşmiş T-лимфоситlərin və apoptoza uğramış лимфоситlərin markerları

Активированные Т-лимфоциты – эти показатели отражают способность Т-лимфоцитов активироваться в ответ на внедрение чужеродных агентов

CD45/CD3+/HLA-DR+	2	0 - 5	%
CD45/CD3-/HLA-DR+	10	6 - 20	%мон., В-кл.
CD45/CD8/CD38	2	5 - 15	%
CD8/CD38	12	20 - 50	%
CD45/CD3+	69	55 - 75	% все Т-лимф.

Рецептор апоптоза (запрограммированной клеточной смерти) лимфоцитов

Параметр	Результат	Референсные значения	Ед.Изм.
CD45/CD95, FAS/APO-1 АГ, опосредующий апоптоз	89	23 - 60	%
CD45/CD3+CD25+	3	0 - 5	%

# İmmunoqrammanın izahatı

■ İmmun statusun qiymətləndirilməsi həkim-immunoloq tərəfindən aparılır. Həkim xəstəyə baxış aparır, immunoqrammanın, Rentgen və USM-nin, digər laborator analizlərin nəticələrinə əsaslanaraq immun patologiyanın tipini, növünü və dərəcəsini müəyyən edir.

■ Baxış zamanı xəstənin anamnezi öyrənilir, ümumi vəziyyətinə, dəri, selikli qişalalara, limfa düyünlərinə, oynaqlara, tənəffüs sistemində və s. diqqət yetilir. İmmun göstəricilər cinsin, yaşın, yaşadığı ərazinin normativləri ilə müqaisə olunur.



# İmmunoloji analizin götürülmə qaydaları

- İmmunoqramma periferik qan analizi ilə eyni zamanda aparılır. Venadan qan səhər ac qarına götürülür. Son 24 saat ərzində alkohol və dərman qəbulu, həmçinin kəskin infeksiyalar, menziz, yüksək temperatur zamanı məsləhət deyil.

# İmmunoqrammanın təyininə əsas göstərişlər

- İldə 6 dəfədən çox uzun sürən dəri, selilli qişalar, tənəffüs infeksiyaların olması və antibakterial müalicənin effekti olmaması
- Səbəbsiz temperaturun 2 həftə davam etməsi
- Limfa düyünlərin uzun müddət böyüməsi
- Bədən çəkisinin səbəbsiz azalması
- Yorğunluq sindromu və mialgiya
- Herpes, süd ərpi, tonsillit, faringit, rinit, dermatit, sistit,
- Pielonefrit və tənəffüs infeksiyaların təkrarlanması
- Autoimmün xəstəliklər
- Allergiya

# İmmun çatışmazlığı yaradan əsas kliniki sindromlar

1. **İnfeksion sindrom** – xroniki ya təkrarlanan virus, göbələk və bakterial infeksiyalar, disbakterioz və s.
2. **Allergik sindrom** – atopik dermatit, ekzema, bronxial astma, pollinozlar, gida və dərman allergiyası vəs.
3. **Autoimmün sindrom** – autoimmün mexanizmlə gedən xəstəliklər.
4. **İmmunproliferativ sindrom** – kəskin və xroniki leykozlar, limfoqranulematozlar, limfomalar, limfosarkomalar, şiş xəstəlikləri.

# Müxtəlif immun patologiyada göstərişli müayinələr

	Göstərici	Mutlq göstərilşər	Xeyirli ola bilər
1	Zərdabda İg-rin miqdarı	Birincili və ikincili immun (BİÇ və İİÇ) çatmamazlıq, immunoqlobulinlərlə müalicə	Yenidoğulmuşların cift qanında – bətdaxili infeksiyala
2	İg-rin immun elektroforetik analizi	Miyeloma, “ağır zəncirlər” xəstəliyi, Bens-Jons proteinurisi, zərdabın yüksək qatılığı	Limfoproliferativ xəstəliklər
3	Ümumi zərdabda İgE səviyyəsi	Hiper –İgE- sindromu	İgE-asılı allergik xəstəliklər
4	Komplement sistemin komponentləri	İrsi immun çatmazlıq	İmmunkompleks xəstəliklərin müalicə effektinin olması

# Müxtəlif immun patologiyada göstərişli müayinələr(davamı)

5	<b>Toxuma probalarında immun komplekslərin təyini</b>	<b>İmmun kompleks xəstəlikləri</b>	<b>Plazmoferez və hemosorbsiya effektinin qiymətləndirilməsi</b>
6	<b>Autoəksisimlərin miqdarı (antinuklear əksisimlər)</b>	<b>Qırmızı qurd eşənəyi</b>	<b>Qarışıq autoimmun proseslər</b>
7	<b>T- və B-limfositlərin miqdarı</b>	<b>Birincili və ikincili immun çatmazlığı</b>	<b>Birincili və ikincili immun çatmazlığı</b>
8	<b>Funksional testlər: limfositlərin mitogenə cavab reaksiyası</b>	<b>Birincili immun çatmazlığı</b>	<b>İkincili immun çatmazlığı</b>

# İmmunoqrammanın qiymətləndirmə prinsipləri

1. Nəticələrin kompleksli analiz olunur
2. Göstəricilərin müqaisəli analizi aparılır
3. Regional və yaş norma göstəricilərin nəzərə alınır
4. Dinamik müşahidə aparılır
5. Klinik əlamətlərin immun pozğunluqlarla dürüst əlaqəsi olmalıdır

**Müəyyən xəstəliklərin səciyyəvi simptomları və ağır keçməsi fonunda immunoqrammada dəyişikliyin olmaması immun sistemin atipik reaksiyasının təzahürüdür, bu isə xəstəliyin ağırlaşmasına səbəb ola bilər.**

# İmmun göstəricilərin qiymətləndirməsi

- **Neytrofillərin azalması** ( $1,5 \times 10^9/l$ -dən aşağı) neytropeniya adlanır və xroniki intoksikasiya, anemiya və autoimmün proseslərdə ola bilər.
- **Eozinofillərin miqdarı** kəskin iltihab reaksiyalarda başlanqıcında – azalır, kəskin dövrdə - yüksəlir və sağalma dövründə - normaya doğru azalır
- **Bazofillərin miqdarı** gec-gec dəyişir: məsələn, miksedema, qeyri-spesifik xoralı kolit, ağır metallarla intoksikasyada və şüalanmada bazofiliya müəyyən olunur.
- **Monositlərin sayı** virus və bakterial xəstəliklərdə ya tez-tez təkrar infeksiyaya tutulan şəxslərdə azalır

# Limfositlərin funksiyonal aktivliyi

## 1. T-limfositlərin funksiyası:

- T-hüceyrələrin mitogenlərə qarşı proliferasiya testi
- aktivasiya markerlərin ( CD25- və CD71- ) və apoptoz markerı CD95 tapılması
- HLA-DR antigenlərin

## 2. B-limfositlərin funksiyası:

- əsas Aq reseptorları CD22, CD19 və CD20-dır
- Bu hüceyrələrin defisiti birincili immun çatmamazlıq üçün səciyyəvidir.



# Leykositar hüceyrələrin fenotipləşməsi

- Leykositlər morfoloji, fenotipik və funksional xüsusiyyətlərinə görə bir-birindən fərqlənirlər. Fenotipik cəhətdən hər bir hüceyrə səthində yerləşən və ona xas olan reseptorlarla-markerlərlə seçilir.
- Müayinə zamanı əsas rol xüsusi markerlərə-CD markerlərə məxsusdur (Cluster of differentiation or Cluster of designation).
- Bu markerlər üçün sistemləşdirilmiş xüsusi təsnifat işlənib hazırlanmışdır. CD-yə aid təsnifat ilk dəfə 1982-ci ildə Parisdə İnsan Leykositinin Differensasiya Antigeni haqqında keçirilən 1-ci Beynəlxalq Konfransda təklif olunmuşdur

# Fenotipləşmənin əsas məqsədi

Hüceyrələrin fenotipləşməsi hüceyrə immunitetini təyin etmək üçün son dövrlərdə istifadə olunan ən müasir üsullardan biridir. Bu zaman hüceyrə səthindəki markerləri (CD+) təyin etməklə hüceyrələri və onların hansı subpopulyasiyaya aid olmasını asanlıqla müəyyən etmək olar. Periferik qanda eritrositlərin lizisini həyata keçirərək leykosit hüceyrələrin səthi reseptorları təyin edilir.

# Axın sitometriya üsulu

- Monoklonal əkscisimlərin köməyi ilə periferik qan hüceyrələrinin müxtəlif subpopulyasiyasını ayırd etmək mümkündür. Periferik qan hüceyrələrinin fenotipləşməsini axın sitometriya üsulu ilə həyata keçirmək olar.
- Bu məqsədlə müayinələr Becton Dickinson firmasının reaktivlərindən istifadə etməklə FaxScan aparatında aparılır.

# FaxScan aparatının görünüşü



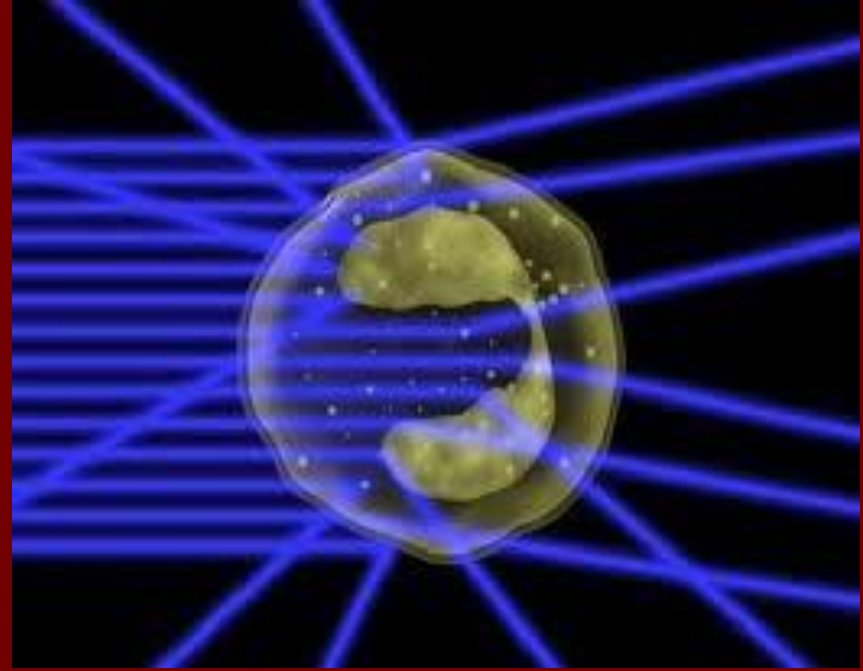
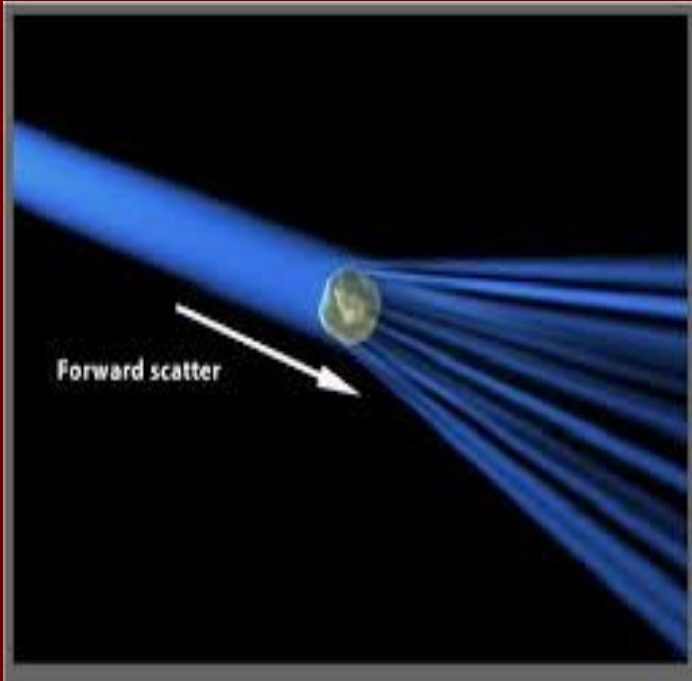
# Prinsipi:

- Proses antigen-antibody reaksiyasına əsaslanır. Hüceyrələrin spesifik antigeninə qarşı istifadə olunan əksicisimlər xüsusi flüorosemlə nişanlanır və axın sitometriya üsulu ilə təyin olunur. Belə xüsusi flüoresensiya edən əksicisimlərlə və ya flüorosemlə rəngləyicilərlə nişanlanmış hüceyrə suspenziyası maye axını şəklində, tək-tək fokuslanmış arqon tərkibli işıq topası-lazer şüasından növbə ilə keçir.

Müəyyən dalğa uzunluğuna malik olan işıq (d.u.-488 nm) flüoroxrom ilə rəqlənmiş hüceyrələri aktivləşdirir, oyadır. Axın sitimetriya üsulu zamanı iki rəngli flüotoxromdan istifadə olunur. Fluoresein izotiosiyanat ilə rəqlənmiş limfositlər 515 nm dalğa uzunluğuna malik sarıyaşıl işıq, fikoeritrin ilə rəqlənmiş limfositlər isə 580 nm d.u.-lu işıq səpələyir. Hüceyrələrin maye şəklində lazer şüasından keçməsi zamanı işığın səpilməsi baş verir. Belə işıq səpilməsinin təyini üsulun əsas prinsipidir.



# Lazer şüasının düz və səpilməmiş görüntüsü



Lazer şüasının hüceyrələrdən səpiləsini xüsusi detektorlar qeydə alır. Rəngləyicilərin səpələdiyi işıq linza və güzgünün köməyi ilə yığılır. Işıq siqnalları qeydə alınıb, elektrik impulslarına çevrilir. Bu impulslar kompüter tərəfindən işlənilib saxlanılır. Işıq dispersiyasının dərəcəsi hüceyrələrin ölçüsü və quruluşu haqqında fikir yürütməyə əsas verir.



# İşin gedişi

1. 100 mkl heparinli qan+10 mkl monoklonal əksicisimlər
2. 15 dəq. otaq temperaturunda, qaranlıqda inkubasiya
3. Eritrositləri lizisə uğratmaq üçün 2000 mkl məhlul əlavə olunur (3 saniyə vortex-qarışdırmaq)
4. 10 dəqiqə otaq temperaturunda, qaranlıqda inkubasiya
5. 5 dəqiqə 1500 dövr/dəqiqədə sentrifuqa
6. Üst maye boşaldılır
7. 2000 mkl yuyucu məhlul əlavə edilir
8. 5 dəqiqə 1500 dövr/dəqiqədə sentrifuqa
9. Üst maye boşaldılır
10. 500 mkl fiksasiyaedici məhlul əlavə edilir (3 saniyə vortex-qarışdırmaq)
11. 20 dəqiqə soyuducuda saxlamaq
12. FaxScan aparatında hüceyrələrin fenotipləşməsi

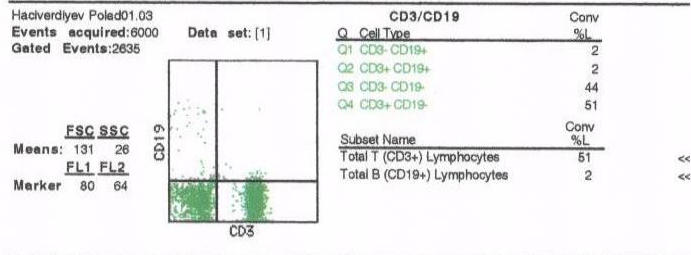
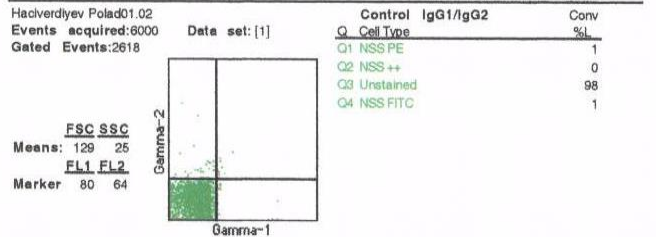
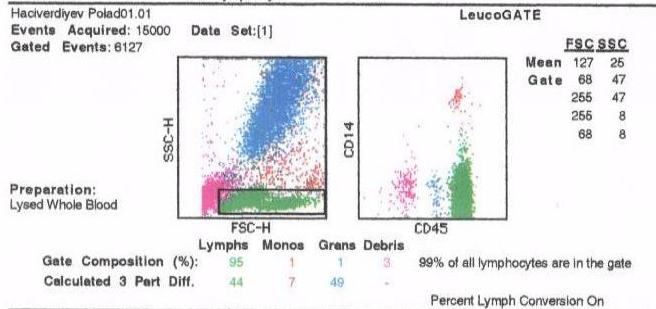
# Axin sitometriya nəticənin təsviri.

## Azerbaijan Medical University SimulSET Lab Report

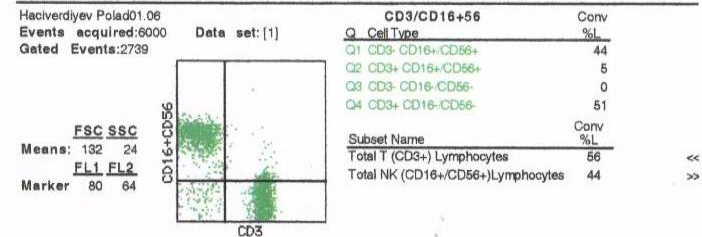
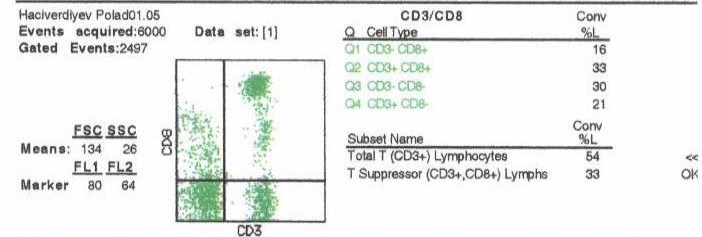
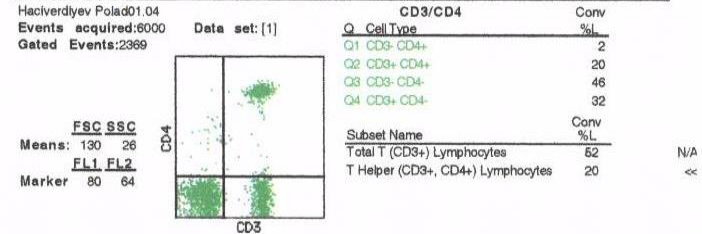
Director: Iskenderova S Cytometer: FACScan ( 81791 )  
Operator: Iskenderova S Software: SimulSET v 3.1

Patient ID: 13 yash  
Patient Name: Haciverdiyev Polad  
Date Acquired: Wed, Mar 16, 2011 11:46  
Date Analyzed: Wed, Mar 16, 2011 11:47  
Panel Name: IMK-Lymphocyte

Haciverdiyev Polad01.01  
Events acquired: 15000  
Gated Events: 6127



Patient ID: 13 yash (Continued)  
Patient Name: Haciverdiyev Polad



Tube Name/ Consistency Ck	Subset Name/ Ck Name	Conv. Percent Lymphs
Average CD3	Total T (CD3+) Lymphocytes	53
Sum of Cells	T + B + NK	99
Ratio	T Lymph H/S CD3, CD4/CD3, CD8 Ratio	0.61

# Üsulun üstünlüyü

Müasir axın sitometriya üsulu ilə hüceyrələrin immunfenotipləşməsi sürətinə və dəqiqliyinə görə digər üsullardan daha əlverişlidir. Bu üsulun köməyi ilə hüceyrə səthində olan bir neçə antigeni eyni vaxtda təyin etmək olar. Müayinə materialı kimi qan, sümük iliği, limfa toxuması və digər toxumalardan istifadə oluna bilər.

# T-limfositlərin azalması

Birincili və ikincili immun çatmamazlıqda, autoimmün, şiş və allergik xəstəliklərdə T-limfositlərin azalması müəyyən olunur. T-subpopulyasiyalarını müqaisə etmək vacibdir. Th\Ts ( CD4+\ CD8 + ) nisbəti immunrequlyator indeks adlandırılır( İRİ) və bu patologiya zamanı dəyişən göstəricidir. Normada İRİ yaşdan asılıdır və 1,0-2,7 arasında olur.

QİÇS xəstəliyində Th limfositlərin sayı  $0,05 \times 10^9/l$  olur, İRİ 1,5-1,0-dan aşağı olur. Allergik və autoimmün xəstəliklərdə bu göstərici normadan yüksək ya normada ola bilər.

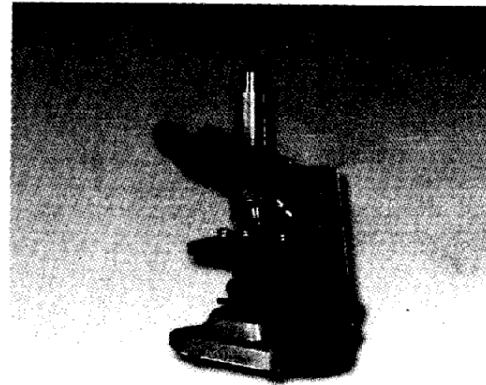
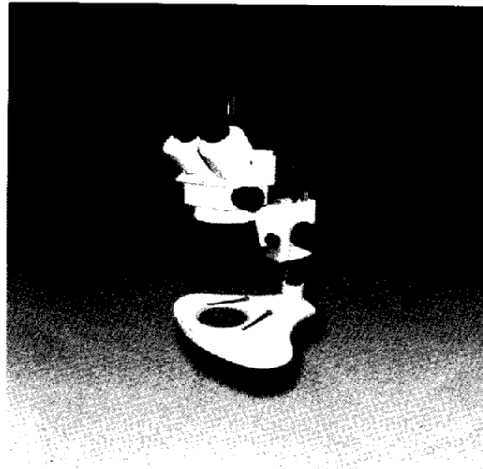
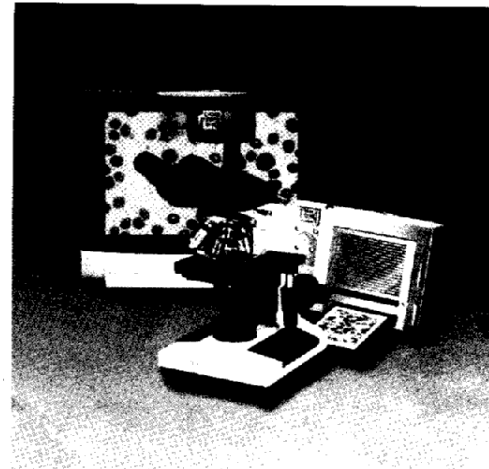
# Digər üsulu

- **İşıq mikroskopiya** – T- və B-limfositlərin, populyasiyaların təyini
- **Fluoresent mikroskopiya** - monoklonal anticismlərin vasitəsi ilə CD reseptorların təyini
- **İmmunferment analiz** – immunqlobulinlərin, hormonların təmini
- **PCR** – DNT və RNT müayinəsi



# Mikroskoplar

## МИКРОСКОПЫ



# İg-rin azalması

- Aqammaqlobulinemiya və disqammaqlobulinemiya birincili immun çatmamazlığın ayrı-ayrı formalarında rast gəlir
- İgG, İgA azalması və İgE çoxalması allergik proseslərdə
- İgG-nin azalması və İgM-ın çoxalması xroniki infeksiyalarda müşahidə edilir

# Faqositar aktivliyini təyini

- Faqositar hüceyrələrin sayı ( bir faqosit tərəfindən məhv edilmiş AQ-rin sayı)
- Faqositar indeks ( hər yüz faqositar hüceyrədən AQ-ni məhv edən faqositlərin sayı)
- Faqositlərin killing göstəricisi (hər 100 faqositoza başlamış hüceyrələrdən AQ-ni tamamilə məhv edən hüceyrələrin sayını göstərir )

Bu göstəricilər NBT(Nitro Blue Tetrazolium) test vasitəsilə öyrənilir



# Faqositar aktivliyini təyini

- Faqositar sistemi aşağıdakı üsullarla da əlavə qiymətləndirmək olar:
- Neytrofillərin neylona adgeziya dərəcəsinə görə;
- Neytrofillərin miqrasiyasının tormozlanması reaksiyası;
- Neytrofillərin immunofenotipləşməsi.

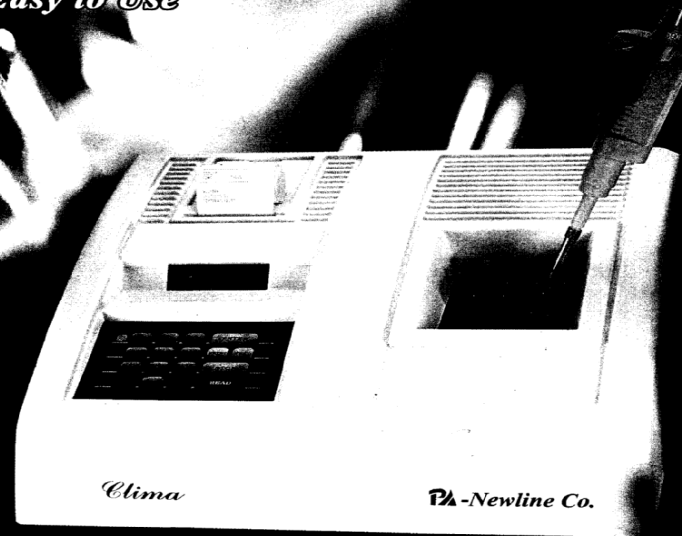
# Qeyri-spesifik humoral immunitetin öyrənilməsi

- İmmunferment və radioimmun analiz yolu ilə aparılır:
- lizosim
- laktoferrin
- sİgA
- sitokinlərdən İNF, İL-1, İL-2, İL-4 və başqaları

# Immunoferment analyzer

## *A Logical Solution for your Clinical Laboratory*

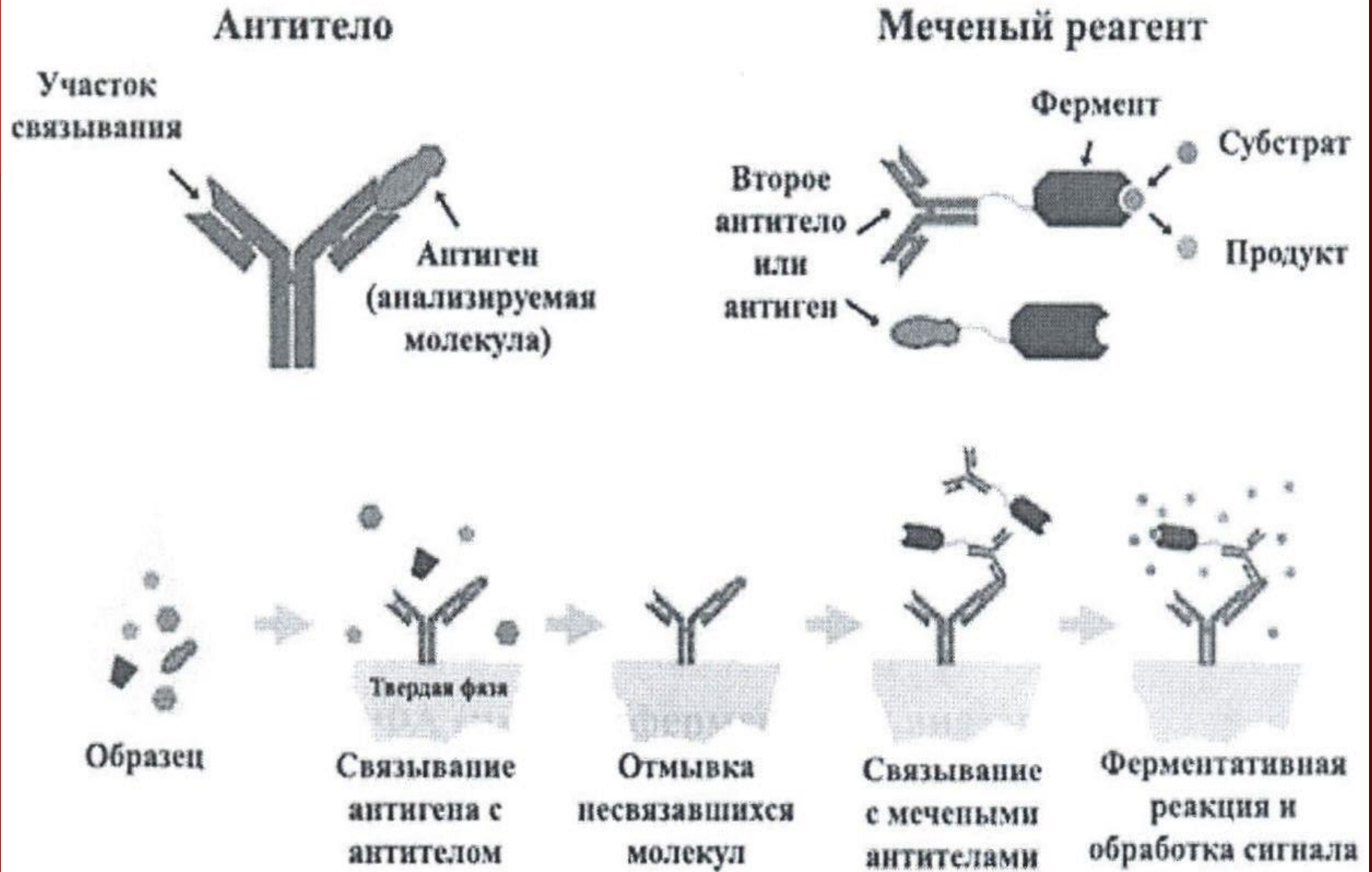
- *Compact Unit (Analyser+Thermostat+Printer)*
- *Programmable upto 100 Methods*
- *Connectable to a laboratory Program (RS232C)*
- *Excellent Stability and Precision*
- *Easy to Use*



# İFA

- İmmunofərment analiz-İFA (ingilis- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) — antigenlərin, əksicisimlərin və hormonların miqdarının təyini üçün istifadə olunur.
- İFA üsulu yüksək həssaslığa və spesifikliyə malik olan laborator üsuludur, dəqiqliyi 90% üstündür.
- Bu üsulla bir çox infeksiyalar müəyyən edilə bilər, o cümlədən QİÇS, virus hepatitlər, sitomeqalovirus, herpes, toksoplazma və s.

# ИФА (иммуноферментный анализ)



Фиг.2

# İFA reaksiyanın iki mərhələsi

- İFA üsulunun iki mərhələsi var – immun reaksiya və fermentativ reaksiya. İmmun reaksiyada nəzərə tutulan hüceyrə, molekul və ya mikrob təyin edilir.
- Fermentativ reaksiya vasitəsi ilə immunoloji reaksiyanın nəticələrini aşkar edib onu qiymətləndirmək mümkündür.



# İFA

- İFA reaksiyada əsasən peroksidaza, qələvi fosfataza, avidin istifadə olunur. İFA reaksiyasının iki növü var : birbaşa və dolayi.
- Hal-hazırda daha yüksək dəqiqliyi və həssaslığı ilə fərqlənən dolayi İFA üsulu çox istifadə olunur.



# Birbaşa İFA üsulu

- Birbaşa İFA üsulunda müəyyən olunan AG-nə qarşı əkscisimlər spesifik nişanla birgə formadadır. Bu nişanlar fermentativ reaksiyanı həyata keçirir.

①  
↓



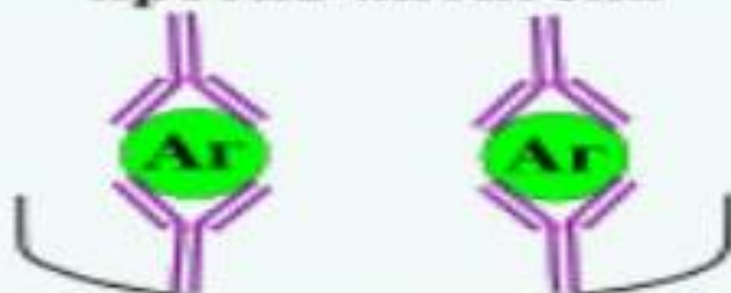
+ сыворотка  
больного

②  
↓



+ диагностическая сыворотка  
против антигена

③  
↓



+ антитела, меченные  $\Phi$   
(против диагностической  
сыворотки)



④  
↓



⑤

+ субстрат/хромоген



# Birbaşa İFA aparılma taktikası

- Götürülən bioloji material (qan, yaxma və s.) xüsusi yuvalara tökülür və 15-30 dəqiqə saxlanılır. Bu müddətdə antigenlər yuvaların səthinə adheziya olunur. Sonra yuvalara yoxlanılan AG-nə qarşı əksicisimlər əlavə olunur, məsələn sifilisə müayinə aparıldıqda bu törədiciyə qarşı nişanlanmış əksicisimlər istifadə edilir. Yuvalar 30 dəqiqədən 4-5 saata qədər inkubasiya edilir, bu zaman AG+əC reaksiyası gedir. AG nə qədər çox olsa, bir o qədər əC onlarla reaksiyaya girir.

# «Artıq» ƏC-in çaxarılması

- Nişanlanmış əksisimlər çox olduğundan, onların bir hissəsi AG birləşir, «artıq» ƏC isə sərbəst qalır. Müayinə materialında həmin AG yoxdursa, reaksiya getməyəcək. Sonra yuvalardan maye xaric edilir, bununla da «artıq» ƏC atılır, yalnız AG-lə birləşmiş ƏC yuva səthində fiksə olunmuş halda qalır. Yuvalar bir neçə dəfə xüsusi məhlul ilə yuyulur və «artıq» ƏC-dən azad olunur.

# Fermentativ reaksiya mərhələsi

- İFA-nın ikinci mərhələsində fermentativ reaksiyası baş verir. Yuyulmuş yuvalara ferment məhlulu əlavə olunur və 30-60 dəqiqə saxlanılır. Bu ferment yuvalarda olan nişanla reaksiyaya girərək rəngli maddəyə çevrilir. Kolorimetriya üsulu ilə rəngli maddənin konsentrasiyası müəyyən olunur. Bu konsentrasiya həm analiz olunan mikrobun, həm də ona qarşı spesifik ƏC-rin miqdarını əks etdirir.



# Dolayî İFA reaksiyasının I mərhələsi

- Götürülən bioloji material (qan, yaxma və s.) xüsusi yuvalara tökülür və 15-30 dəqiqə saxlanılır. Bu müddətdə antigenlər yuvaların səthinə adheziya olunur. Sonra yuvalara yoxlanılan AG-nə qarşı əkscisimlər əlavə olunur, məsələn sifilisə müayinə aparıldıqda bu törədiciyə qarşı spesifik nişan daşımayan əkscisimlər istifadə edilir. Yuvalar 1-5 saata qədər inkubasiya edilir, bu zaman AG+ƏC reaksiyası gedir. Daha sonra «artıq ƏC» yuvalardan bir neçə dəfə yumaq yolu ilə xaric olunur.



# Dolayî İFA reaksiyasının II mərhələsi

- Bu mərhələdə birinci ƏC-lərə xüsusi nişanlanmış əksicisimlər əlavə olunur. Bunlar adətən keçi əksicisimləri olur. Nişanlanmış keçi ƏC-ri 15-30 dəqiqə ərzində bundan əvvəl yaranmış immun kompleksin ƏC ilə birləşir. Beləliklə yuvalarda ƏC+AG+ nişanlanmış ƏC kompleksi yaranır. Bu dəfə nişanlanmış «artıq ƏC» yümaq yolu ilə xaric edilir. Reaksiyanın sonunda ferment əlavə edib, 5-30 dəqiqə sonra nişanların rənginin dəyişməsi müşahidə edilir və kolorimetriya yolu ilə reaksiya qiymətləndirilir.





# Dolayi İFA reaksiyasının üstünlüyü

■ Bu reaksiyada iki müxtəlif əkcisimlərin istifadəsi onun spesifikliyinin və həssaslığının daha yüksək olmasını təmin edir. Reaksiya müddətinin uzanmasına baxmayaraq daha dəqiq nəticə almaq mümkündür. Hal-hazırda dolayi İFA daha geniş istifadə olunur.

# İFA üsulu istifadə olunan göstəricilər

İnfeksiya əkscisimləri	Əkscisimlər
Toksoplazma	İgG (İgG1,2,3,4)
	İgM
CMV	İgA
	İgE
Herpes tip I	İgD
	sİgA
Herpes tip II	
	İgM

# İFA üsulu istifadə olunan xəstəliklər

Hormonlar	AutoƏkscisimlər
T3	Anti TPO
Sərbəsr T3	Anti TG
T4	Anti TSH
Sərbəst T4	İAA
TSH	GAD
Xorionik Qonadotyropin XH	ANA
Folikul Stimuləedici hormon FSH	AMA

# İFA üsulu istifadə olunan göstəricilər

Onkomarkerlar	Sitokinlər
PCA	İNF- $\gamma$
CA-125	TNF-a
CA-19.9	İL-1,İL-2 ....
M-12 (CA-15.3)	RANTES
CYFRA	
K – zəncir	
$\Lambda$ -zəncir	

# İmmunfluorensensiya reaksiyası (İFR)

- İmmunoglobulinlər (əkscisimlər) öz spesiflik və antigenlə birləşmək qabiliyyətini itirmədən bəzi kimyəvi maddələrlə geri dönməyən (nişanlanmış) birləşmələr əmələ gətirmək xüsusiyyətinə malikdir.
- Bu xüsusiyyətdən istifadə edərək A. Kuns 1950-ci ildə **İmmunfluorensensiya reaksiyasını (İFR)** təklif etmişdir.
- Prosesi həmçinin **Fluorensensiya edən əkscisimlər (FƏÜ)** üsulu kimi də adlandırmaq olar.

# Üsulun əhəmiyyəti

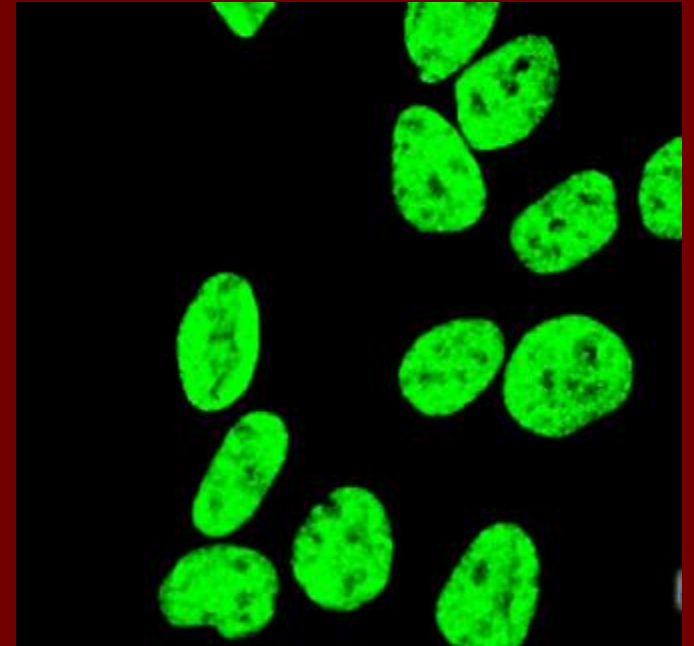
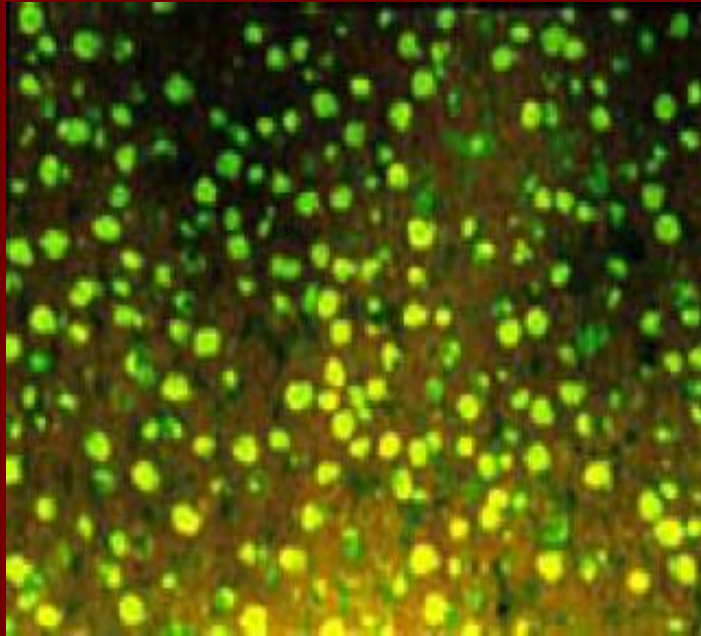
- İmmunfluoresensiya reaksiyasının köməyi ilə lüminisent mikroskopda antigen-əkscisim kompleksinin fluoressensiya effektinə əsasən hətta çox kiçik miqdarda olan bakterial və virus mənşəli antigenləri belə təyin etmək, flouoxromla nişanlanmış monoklonal əkscisimlərin köməyi ilə leykositar hüceyrələrin fenotipləşməsini aparmaq mümkündür.





# Fluorescent nişanlayıcılar:

Əksisimləri nişanlamaq məqsədilə qısa dalğalı işıqla (ultrabənövşəyi, bənövşəyi, göy işıqlar) şüalandırıldıqda fluorensensiya edən rəngləyicilərdən istifadə olunur. Məsələn fluoresein izotiosianatla parlaq yaşıl və ya yaşılımtıl-sarı rənglənmə alınır.

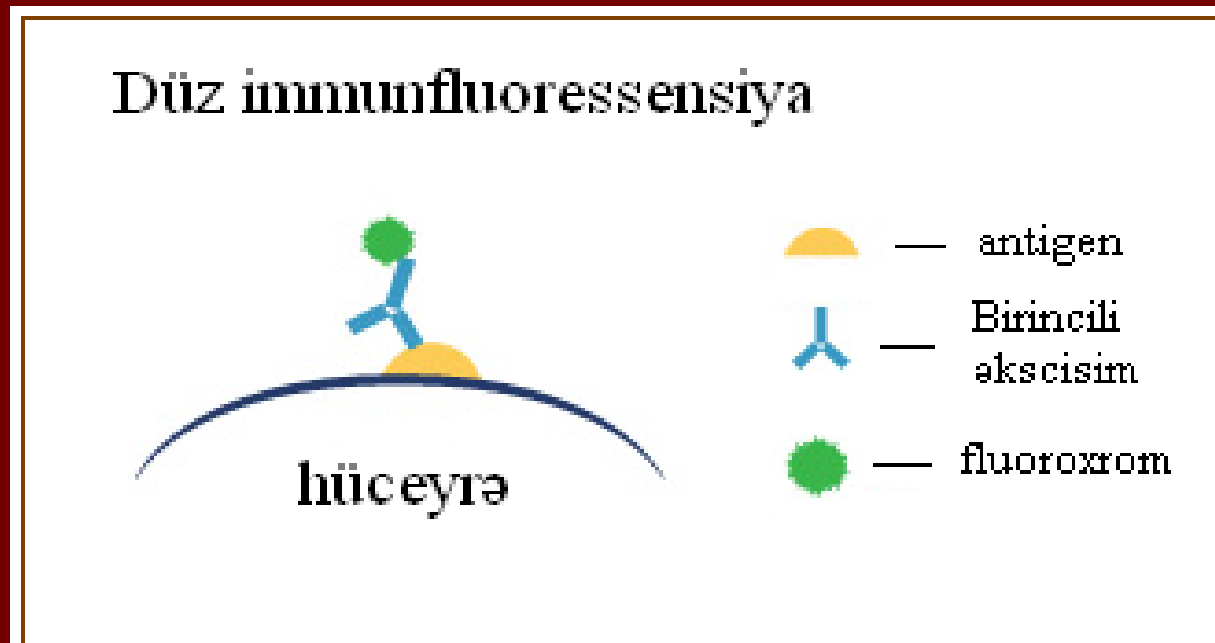


# İmmunfluoresensiya reaksiyasının 2 növü var:

- **Düz (birbaşa) İmmunfluoresensiya**
  - **Qeyri-düz (dolayı)  
İmmunfluoresensiya**

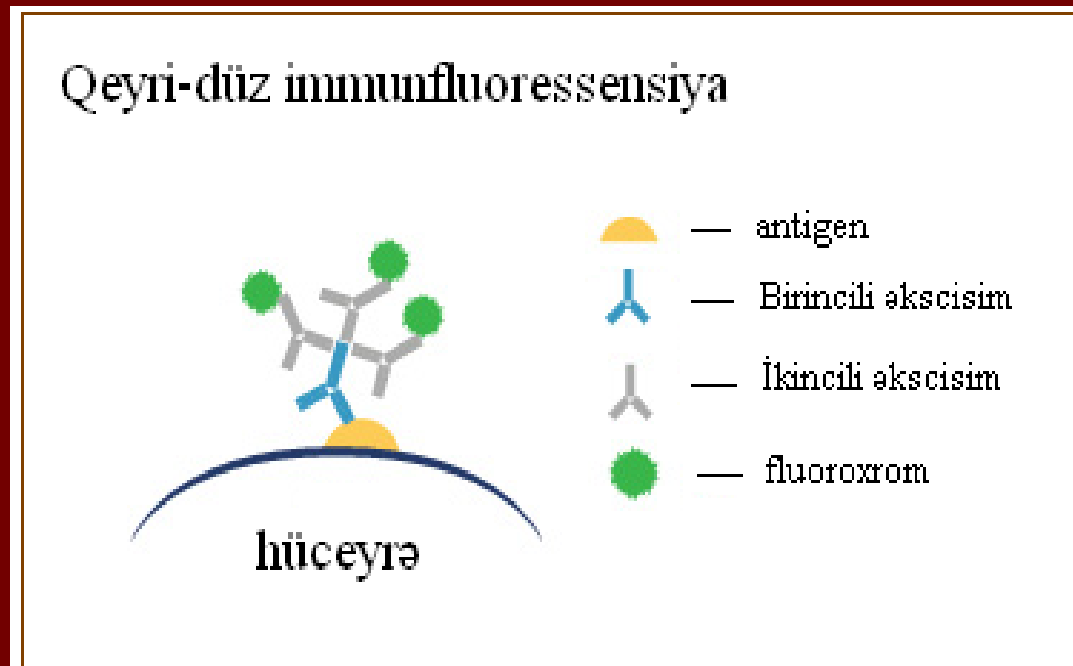
# Düz (birbaşa) İmmunfluorensensiya

- Bu zaman nişanlanmış əksicisimlər birbaşa tədqiq olunan antigenlərlə reaksiyaya girir. Əşya şüşəsi üzərinə fiksasiya olunmuş mikrobun üzərinə fluoroxromla nişanlanmış əksicisimlər əlavə olunur. Alınan kompleks lüminisent mikroskopda tədqiq edilir.



# Qeyri-düz (dolayı) İmmunfluorensensiya

- Bu zaman tədqiq olunan antigen əvvəlcə spesifik əksicisimlə birləşir. Daha sonra spesifik əksicisimlərə qarşı fluoroxromla nişanlanmış xüsusi əksicisimlər birləşdirilir. Alınan kompleks lüminisent mikroskopda tədqiq edilir.



# Düz və Qeyri-düz fluoressensiyanın fərqi

Əlamət	Düz fluoressensiya	Qeyri-düz fluoressensiya
Müddəti	Bir mərhələ olduğundan daha qısadır.	İkinci əksisimlə konyuqasiya olduğundan proses daha uzundur.
Qiyməti	Nişanlanmış birincili (spesifik) əksisimlər bahadır.	Nişanlanmış ikincili əksisimlər daha ucuz başa gəlir. Bu əksisimləri müxtəlif birincili əksisimlərlə birləşmədə istifadə etmək olar.
Həssaslıq	Nişanlanmış birincili (spesifik) əksisimlər zəif işıqlanır.	Nişanlanmış ikincili əksisimlər daha güclü, parlaq işıqlanma verir.
Çarpaz reaksiya	Nişanlanmış birincili əksisimlər antigenə spesifik olduğundan çarpaz reaksiya vermir.	Nişanlanmış ikincili əksisimlər digər əksisimlərlə çarpaz reaksiya verə bilər.

# Qeyri-düz immunfluoresensiyada işin gedişi

- Poli-L-lizidlə 30-40 dəqiqə otaq temperaturunda inkubasiya olunan, fosfat buferində yuyulmuş 30 mkl,  $5 \times 10^4$  hüceyrə əşya şüşəsi üzərinə əlavə edilir.
- Mayenin artıq miqdarı götürülür və 20 mkl monoklonal əkcisimlər əlavə edilir.
- 30 dəqiqə, otaq temperaturunda inkubasiya olunur.
- Fosfat buferi ilə 1 dəfə yuyulur.
- Ağ siçanın immunoqloblinlərinə qarşı fluoressein izotiosianatla nişanlanmış 20 mkl dovşanın antizərdabı əlavə edilir.
- 30 dəqiqə,  $4^{\circ}\text{C}$ -də inkubasiya olunur.
- Tərkibində 1%-li formalin, 0,1%-li Na azot olan fosfat buferi ilə 2 dəfə yuyulur.
- 60%-li qliserin əlavə edilir və örtük şüşəsi ilə örtülür.
- Preparat lüminisent mikroskopda tədqiq edilir.

# Zəncir polimeraza reaksiyası



# Metodun əsas elementləri

Bu metod müasir molekulyar- bioloji metoddur. Bu üsul *in vitro* DNT-in spesifik regionunun çoxaldılması üçün işlədilir

**”Praymer”**- kiçik nukleotid seqmentləri olub reaksiyada çoxaldılan DNT hissəsinə komplementardır.

**TAG DNT polimeraza- *Thermus aquaticus*** adlı bakteriyadan alınmış polimerazadır.

Reaksiyada DNT zəncirinin uzanmasını həyata keçirir.

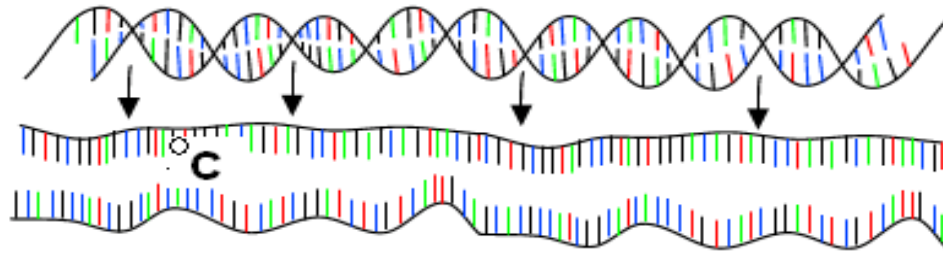
**Nukleotidlər** – dATP, dCTP, dGTP, dTTP

# Bu metodla DNT-in çoxaldılması üç mərhələdə həyata keçirilir

1. **Denaturasiya:** bu mərhələdə DNT denaturasiyaya uğrayır.
2. **Birləşmə:** ön və arxa praymerlərin DNT-in tək zəncirlərinə birləşir.
3. **Uzanma:** polimeraza vasitəsilə yeni əmələ gəlmiş DNT zəncirləri uzanır.

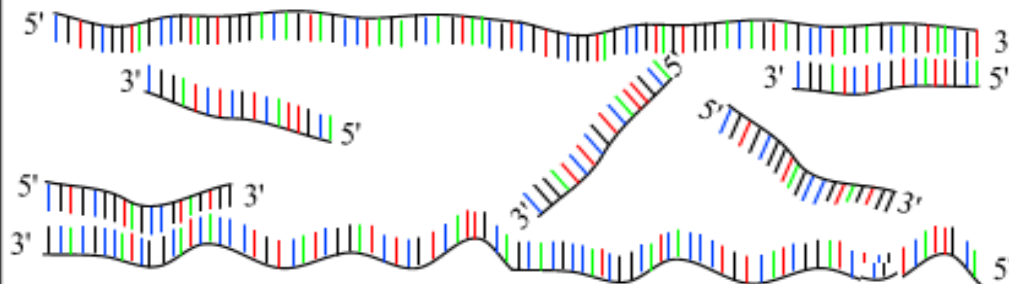
# ZPR

3 mərhələdə 30-40 tsikl



I mərhələ:  
denaturasiya

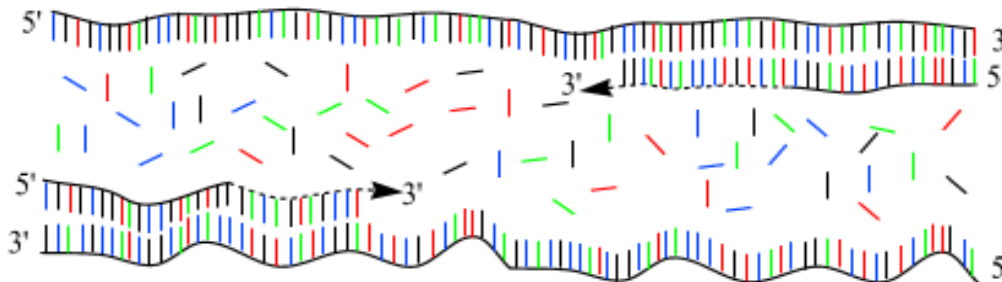
1 dəqiqə 94°C



II mərhələ:  
birləşmə

45 saniyə 54°C

ön və arxa praymerlər

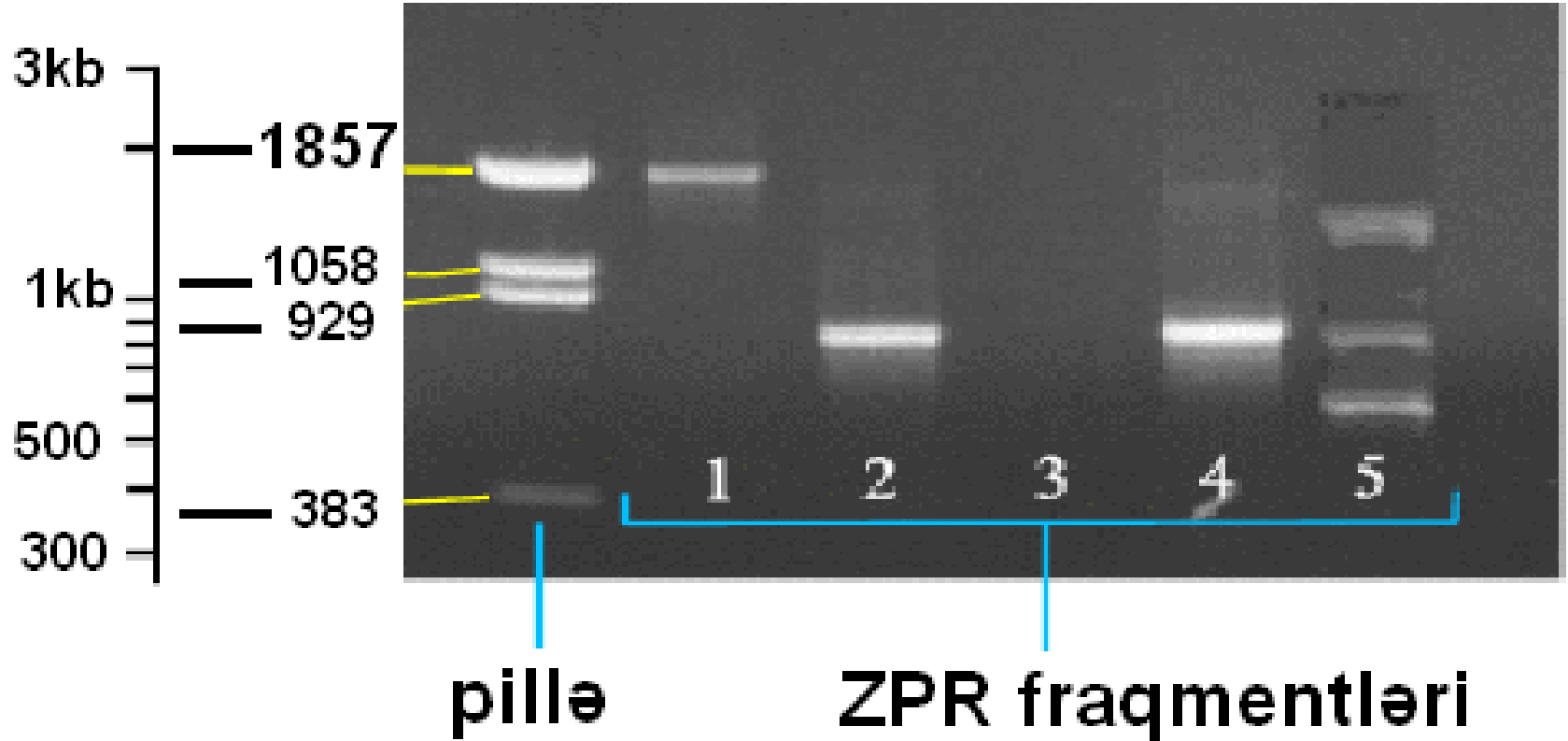


III mərhələ:  
zəncirin uzanması

2 dəqiqə 72°C

# Gel elektroforez

Aqaroza gelində ZPR məhsulunun aşkar olunması



# ZPR-in tətbiq sahələri

- Yoluxucu xəstəliklərin aşkar olunmasında.
- Genlərdə baş verən mutasiyaların müəyyən olunmasında.
- Məhkəmə təbabətində.