

Применение иммунологических реакций в медицинской практике



-
- Реакции иммунитета – это реакции между антигеном и антителом или между антигеном и сенсibilизированными лимфоцитами, которые происходят в живом организме и могут быть воспроизведены в лабораторных условиях.
-

-
- Реакции антигена с антителом называются серологическими (от лат. serum – сыворотка) или гуморальными (от лат. humor – жидкость), потому что участвующие в них антитела (иммуноглобулины) всегда находятся в сыворотке крови.
 - Реакции антигена с сенсibilизированными лимфоцитами называются клеточными.
-

Реакции иммунитета используют:

- при диагностике и иммунологических исследованиях у больных и здоровых людей;
 - для серодиагностики – выявления антител в сыворотке больного;
 - для сероидентификации – определения вида или типа антигена.
-

Иммунологические (серологические) реакции протекают в две фазы

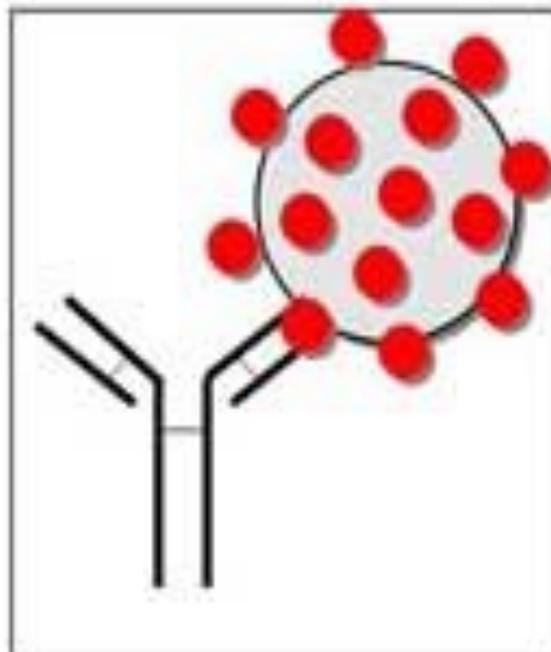
- **1-я фаза – специфическая**

Образование комплекса антигена и соответствующего ему антитела.

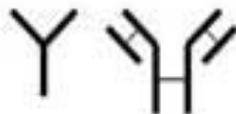
Видимого изменения в этой фазе не происходит, но образовавшийся комплекс становится чувствительным к неспецифическим факторам, находящимся в среде (электролиты, комплемент, фагоцит).

1-я фаза

Специфическая фаза



- антиген;



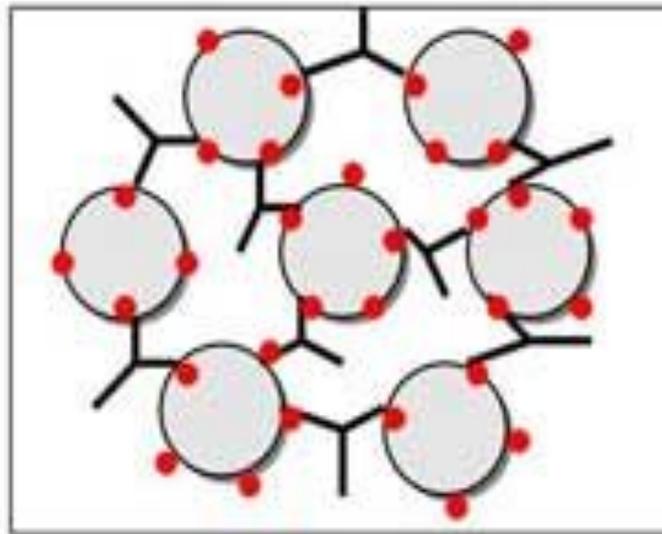
- антитела.

2-я фаза – неспецифическая

- В этой фазе специфический комплекс антиген-антитело взаимодействует с неспецифическими факторами среды, в которой происходит реакция.
 - Результаты их взаимодействия видны невооруженным глазом (растворение, склеивание и т.д.).
-

2-я фаза

Неспецифическая фаза

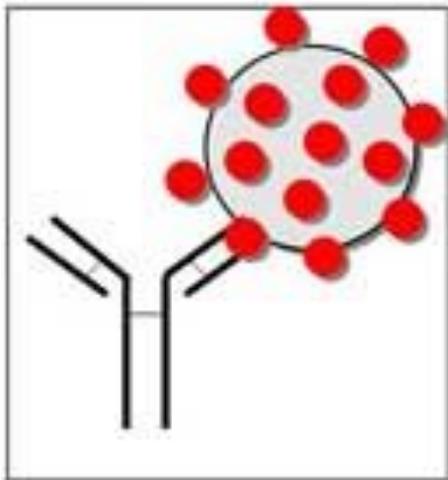


● - антиген;

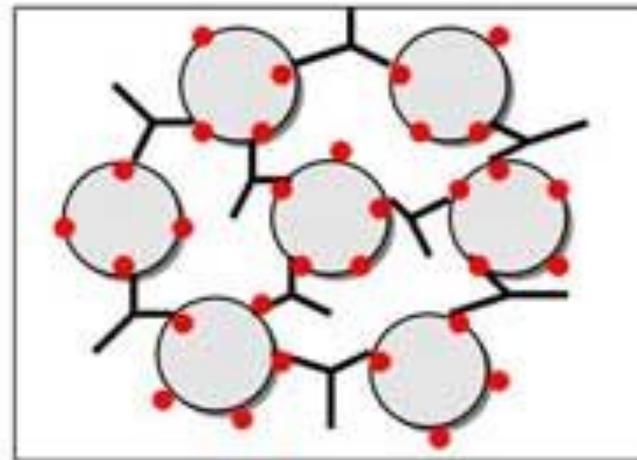
Y - антитела.

Схема взаимодействия антигена с антителом

Специфическая фаза



Неспецифическая фаза



● - антиген;

Y - антитела.

-
- Кровь для серологических реакций берут с конца 1-й начала 2-й недели заболевания.
 - Чаще берут из вены 3-5 мл в стерильную пробирку натощак или не раньше, чем через 6 часов после еды, иначе сыворотка будет мутной (хилезной), т.е. содержать капельки жира.
 - При взятии крови следует соблюдать стерильность и асептику.
-

-
- Из крови готовят сыворотку и определяют титр антител, т.е. наибольшее разведение, в котором она реагирует с соответствующим антигеном в определенных условиях опыта.
 - Реакцию ставят в динамике, т.е. повторяют через 7-10 дней.
-

Реакция агглютинации (РА)

- РА – это склеивание и выпадение в осадок микробов и других клеток под действием антител в присутствии электролита (изотонического раствора NaCl или ФР).
- Образовавшийся осадок называется агглютинатом.

РА применяют

- для определения антител в сыворотке крови больных при брюшном тифе и паратифах (реакция Видаля), туляремии, бруцеллезе (реакция Райта) и др.
-

Компоненты РА:

- Антитела (агглютинины) – находятся в сыворотке крови или иммунной сыворотке;
- Антиген – взвесь живых или убитых микроорганизмов;
- Изотонический раствор NaCl (ФР).

РА на стекле (ориентировочная реакция)

- На обезжиренное предметное стекло пастеровской пипеткой наносят 2 капли специфической (адсорбированной) сыворотки и каплю ФР, отмечают где какая капля.
- Культуру петлей тщательно растирают на стекле, а затем вносят в каплю ФР и в одну из капель сыворотки, размешивая в каждой до образования гомогенной взвеси.
- Капля сыворотки, в которую не внесена культура – контроль сыворотки (КС).

-
- **Внимание!** Нельзя переносить культуру из сыворотки в каплю ФР, которая является контролем антигена (КА).
 - Реакция протекает при комнатной температуре в течение 1-3 мин.
 - Результаты: КС должен оставаться прозрачным, КА – равномерно мутный, при положительной реакции – осадок в виде хлопьев, при отрицательной – равномерно мутный.
-

Схема реакции агглютинации на стекле



1 - контроль; 2 – агглютинат (хлопья) положительная реакция.

Развернутая реакция агглютинации

- В пробирках готовят двукратные разведения сыворотки от 1:50 до 1: 1600.
 - На каждой пробирке указывают степень разведения.
 - Во все разведения добавляют 2 капли антигена.
 - Ставят КС и КА.
 - Пробирки помещают в термостат на 2 часа при температуре 37С и выдают предварительный результат.
-

-
- Окончательный результат – через 18-20 часов (выдерживая при комнатной температуре).
 - Результат: КС должен оставаться прозрачным, КА – равномерно мутный, при положительной реакции – осадок в виде хлопьев, при отрицательной – равномерно мутный.
-

Реакция агглютинации



Реакция Видаля

- Применяют для диагностики брюшного тифа и паратифов А и В.
- Ставят со 2-й недели заболевания.
- Для реакции используют:
 - АТ - сыворотку больного;
 - АГ – убитые культуры сальмонелл (диагностикумы);
 - физиологический раствор.

- Реакцию ставят с двумя диагностикумами О и Н.
- О-антитела появляются первыми и исчезают довольно быстро, Н-антитела сохраняются долго.
- Реакция может быть положительной у больных, переболевших и привитых.
- У больных диагностический титр антител 1:200 и выше и при повторении реакции увеличиваются, у переболевших и привитых – 1: 100 и при повторении реакции не изменяются.

Реакция Видала

Диагностикумы из сальмонелл	Разведения сыворотки			
	1:100	1:200	1:400	1:800
Брюшной тиф О	++++	++++	+++	+++
Брюшной тиф Н	++++	++++	+++	+++
Паратиф А О	++	+	-	-
Паратиф А Н	+	+	-	-
Паратиф В О	+	-	-	-
Паратиф В Н	+	-	-	-

Реакция гемагглютинации (РГА)

Первая РГА относится к серологическим.

- В этой реакции эритроциты агглютинируются при взаимодействии с соответствующими антителами (гемагглютинаинами).
- Используют для определения группы крови.

РГА

Исследуемый донор по стандартности группы			Исследуемая кровь принадлежит к группе
Oαβ(I)	Aβ(II)	Bα(III)	
 	 	 	O(I)
 	 	 	A(II)
 	 	 	B(III)
 	 	 	AB(IV)
Контроль с сывороткой группы AB(IV)			
			

Стандартные сыворотки

Oαβ(I)	Aβ(II)	Bα(III)
 	 	 
Стандартные эритроциты		
O(I)	A(II)	B(III)

Исследуемая кровь группы Oαβ(I)

Стандартные сыворотки

Oαβ(I)	Aβ(II)	Bα(III)
 	 	 
Стандартные эритроциты		
O(I)	A(II)	B(III)

Исследуемая кровь группы Aβ(II)

Стандартные сыворотки

Oαβ(I)	Aβ(II)	Bα(III)
 	 	 
Стандартные эритроциты		
O(I)	A(II)	B(III)

Исследуемая кровь группы Bα(III)

Стандартные сыворотки

Oαβ(I)	Aβ(II)	Bα(III)
 	 	 
Контроль с сывороткой группы AB(IV)		
		
Стандартные эритроциты		
O(I)	A(II)	B(III)

Исследуемая кровь группы AB(IV)

 Реакция отрицательная
  Реакция положительная

РГА

Вторая РГА не является серологической.

- В ней склеивание эритроцитов вызывают не антитела, а особые вещества, образуемые вирусами.
 - Используют для диагностики вирусных заболеваний.
-

РГА

Типоидентификация противостригущих сыворотка	Разведение сыворотки					Контроль		
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	Сыворотки	Вируса	Эритро- цитов
HN1								

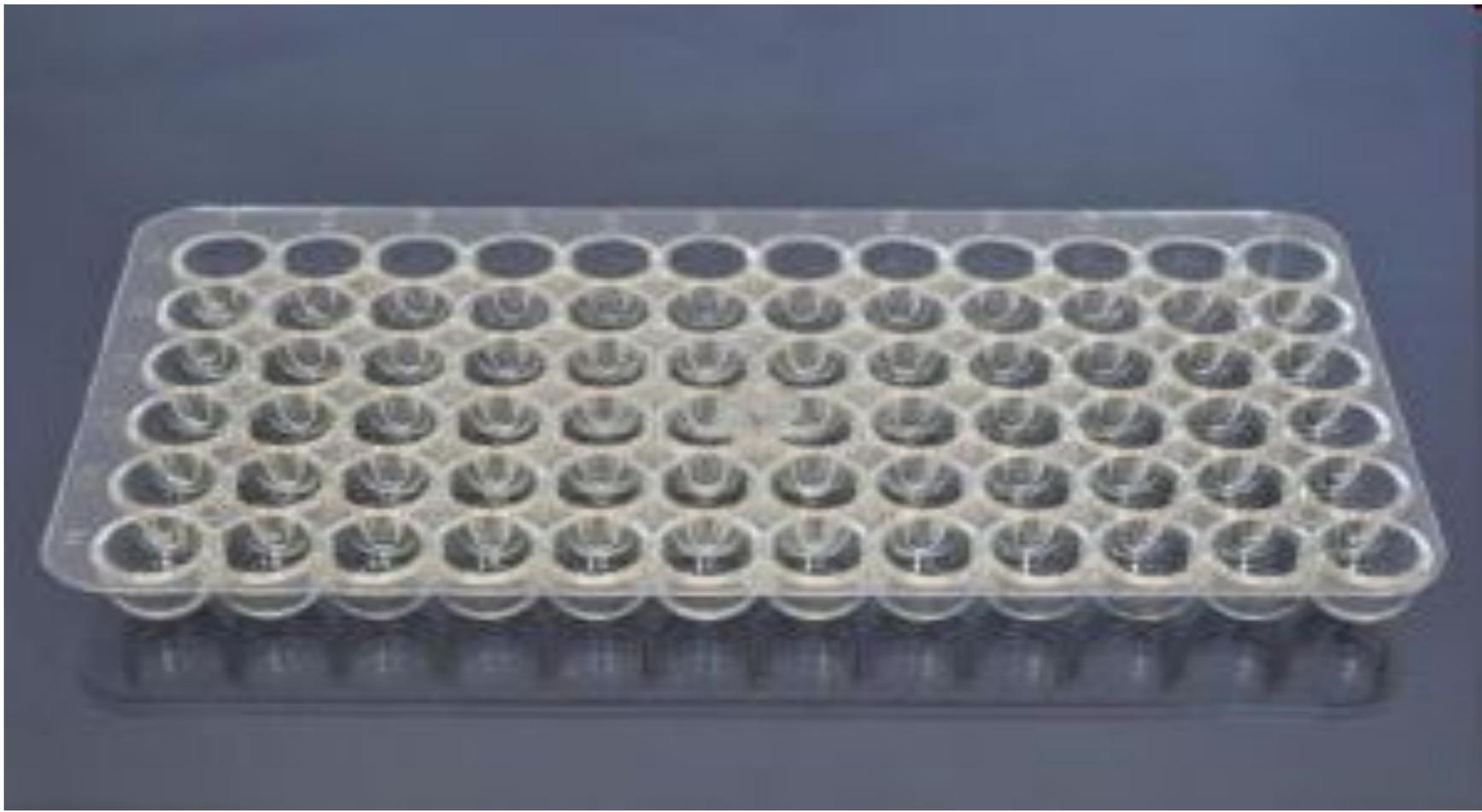
Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

- РНГА основана на том, что эритроциты, если на их поверхности адсорбировать растворимый антиген, приобретают способность агглютинироваться при взаимодействии с антителами к адсорбированному антигену.
 - РНГА широко применяют для диагностики ряда инфекций.
-

Компоненты РНГА

- Антитела (сыворотка больного);
- антиген (эритроцитарный диагностикум);
- ФР

РНГА ставят в пластинах с лунками



Постановка РНГА

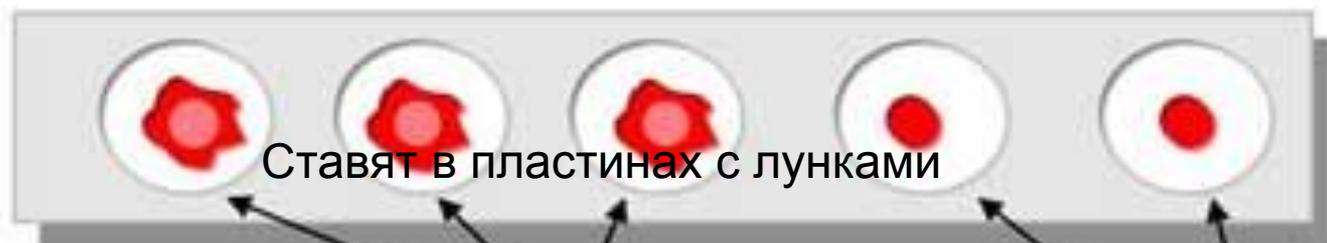
- В пластинах с лунками делают двукратные разведения сыворотки (1:10 – 1:1280).
- Во все разведения добавляют 2 капли эритроцитарного диагностикума.
- Ставят КА и КС.
- Помещают в термостат на 2 часа при температуре 37С.

Учет РНГА

- положительная реакция – осадок в виде «зонтика»;
- отрицательная реакция – осадок в виде «пуговики»;
- КС – прозрачный;
- КА – «пуговка»

Учет РНГА

Результат РНГА (РПГА)



Положительный («зонтик»)

Отрицательный («пуговка»)

PHGA



Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

- Основана на способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать вирусы, которые в результате этого процесса теряют свойство агглютинировать эритроциты.
 - Применяют в диагностике вирусных заболеваний.
-

Учет РТГА

- положительная реакция – осадок в виде «пуговки»;
- отрицательная реакция – осадок в виде «зонтика»;
- КС и КЭ – «пуговка», нет агглютинирующего эритроциты фактора;
- КА – «зонтик», вирус вызвал агглютинацию эритроцитов.

РТГА

Типостандартизирана противотрипанска сыворотка	Разведение сыворотки					Контроль		
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	Сыворотки	Вируса	Эритроцитов
H1N1								
H1N1								
H3N2								

РСК – реакция связывания комплемента

- РСК основана на том, что специфический комплекс антиген-антитело всегда адсорбирует на себе комплемент.
 - Применяют для диагностики заболеваний вызванных вирусами, спирохетами (RW), риккетсиями и др.
-

РСК

- В РСК участвуют 2 системы: основная и гемолитическая иначе результаты не оценить.

Основная система

- Антиген – лизат, экстракт, гаптен; реже взвесь микроорганизмов;
 - Антитело – сыворотка пациента;
 - Комплемент – сыворотка морских свинок.
-

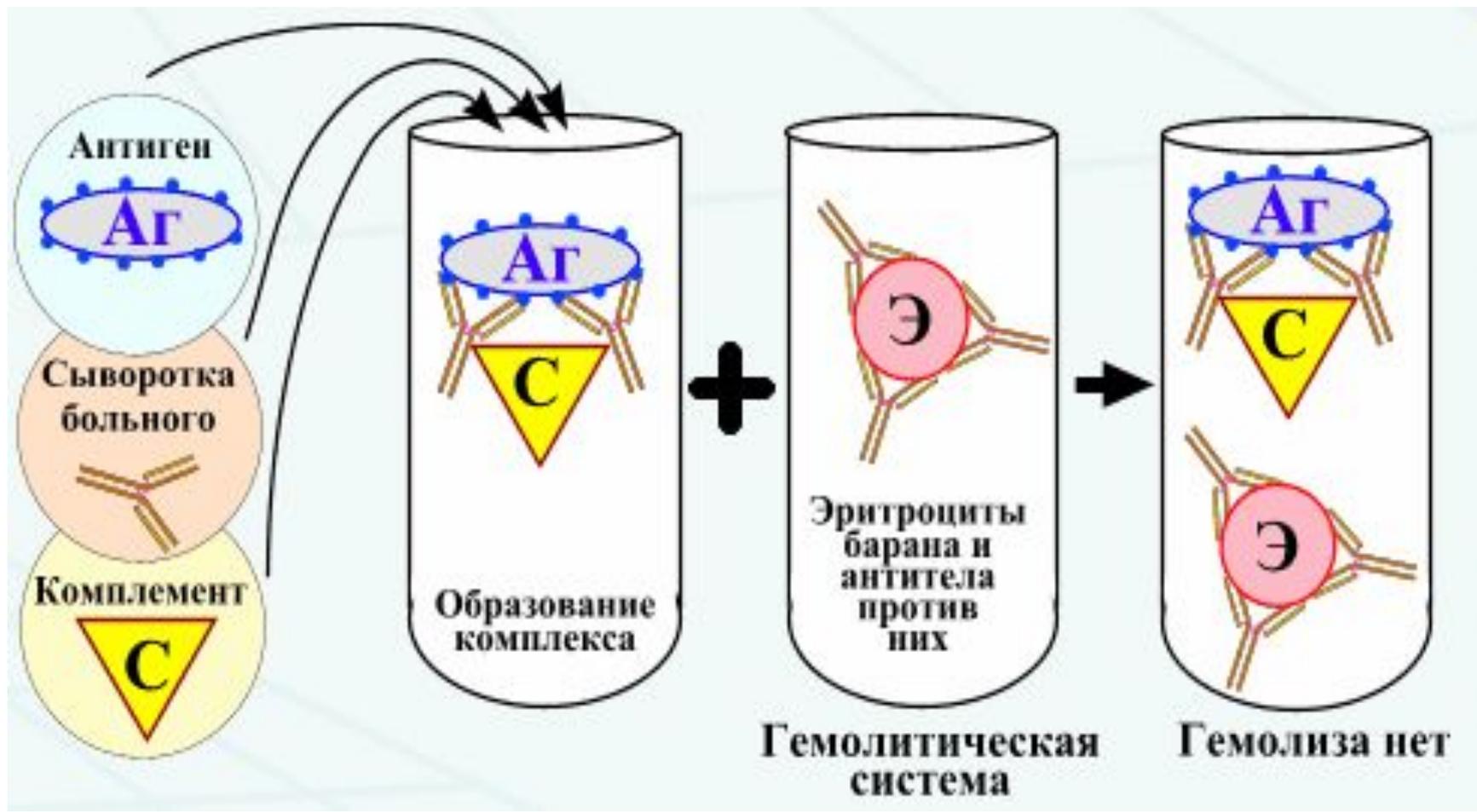
Гемолитическая система

- Антиген – эритроциты барана;
- Антитело – гемолизин к эритроцитам барана.

Результат

- Если в крови человека есть антитела, они свяжутся с антигеном; на них осядет комплемент и при добавлении гемолитической системы гемолиз не произойдет.
- Реакция положительная, человек болен.
- В пробирке осадок и прозрачная или мутноватая надосадочная жидкость.

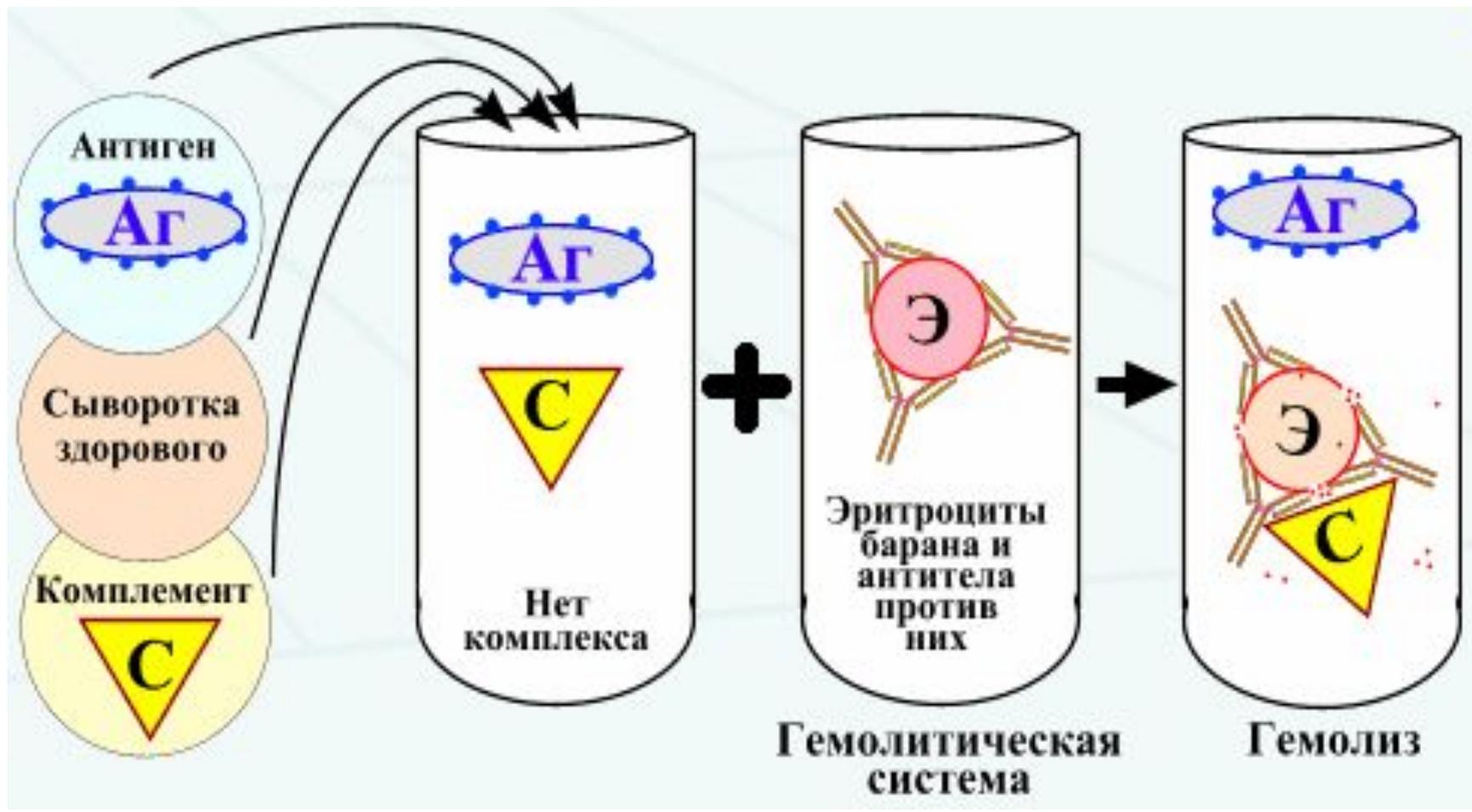
Схема РСК с сывороткой больного человека



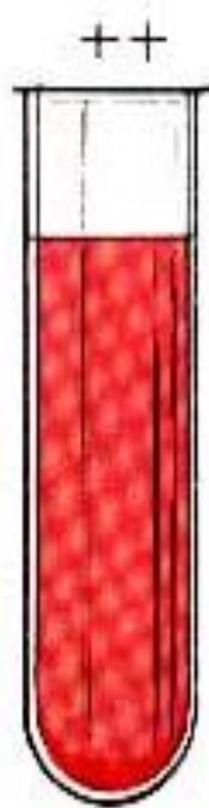
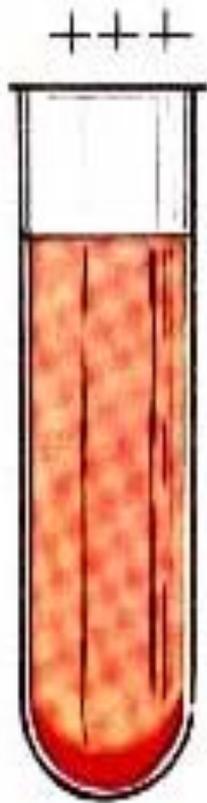
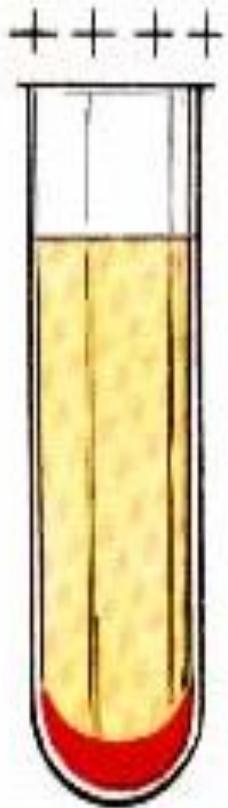
Результат

- Если в крови человека нет антител, антиген и комплемент остаются свободными и при добавлении гемолитической системы произойдет гемолиз.
 - Результат РСК отрицательный.
 - В пробирке «лаковая кровь»
-

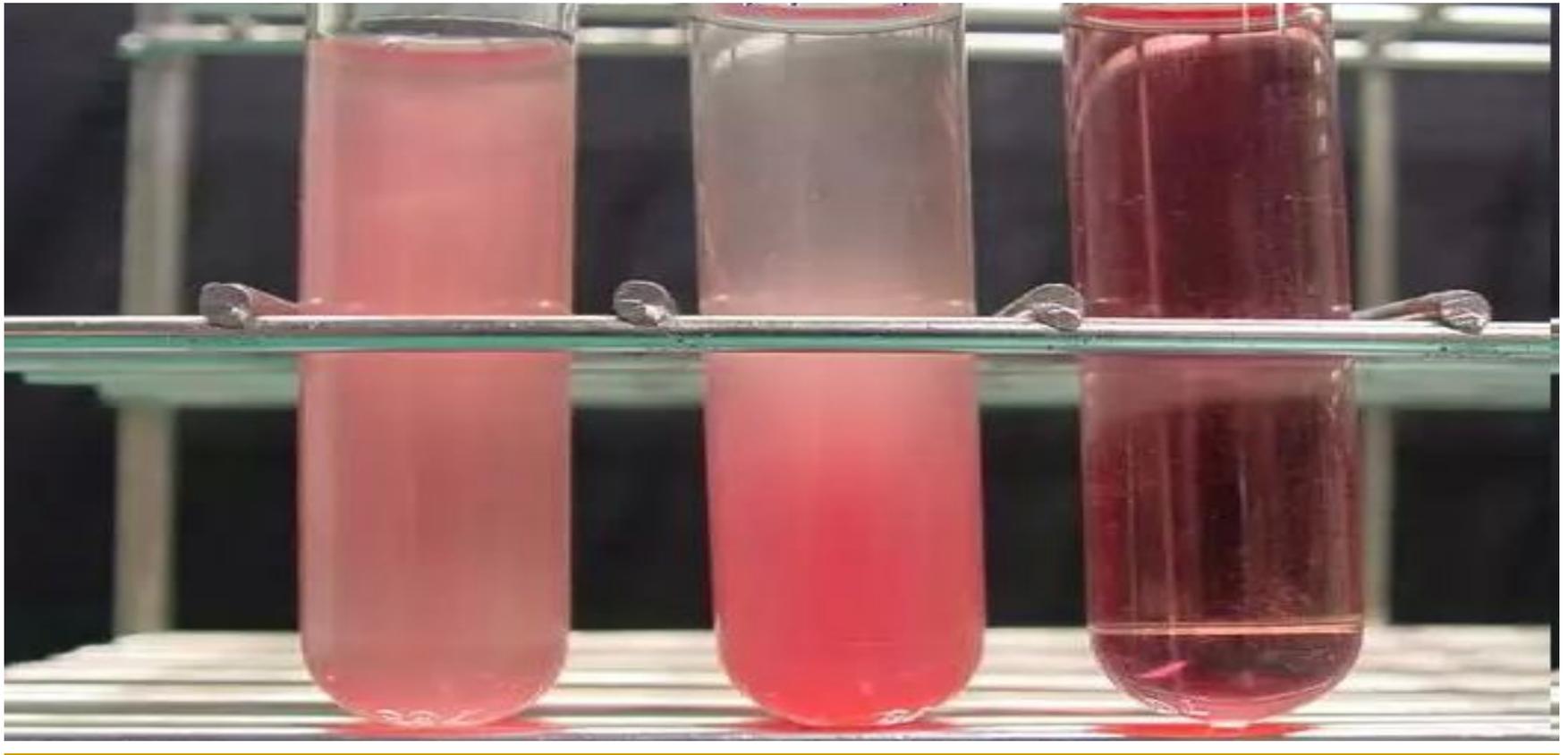
Схема РСК с сывороткой здорового человека



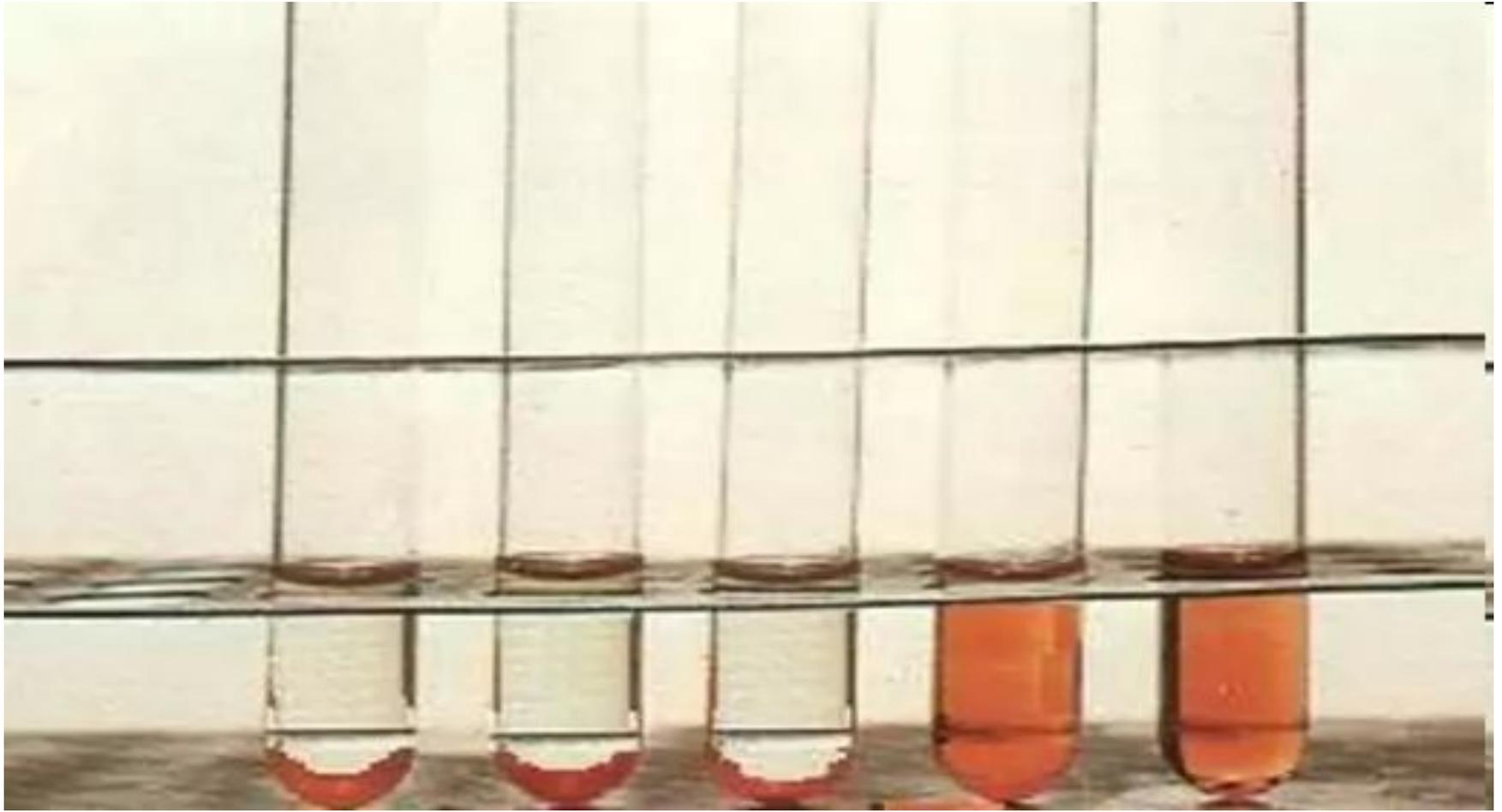
Результаты РСК



PCK



PCK



Реакция преципитации (РП)

- Применяют для определения антигена при диагностике ряда инфекций (сибирская язва и др.);
- Для определения токсигенности культуры;
- В санитарно-гигиенических исследованиях – при установлении фальсификации продуктов;
- В судебной медицине – для определения видовой принадлежности крови, спермы и др.

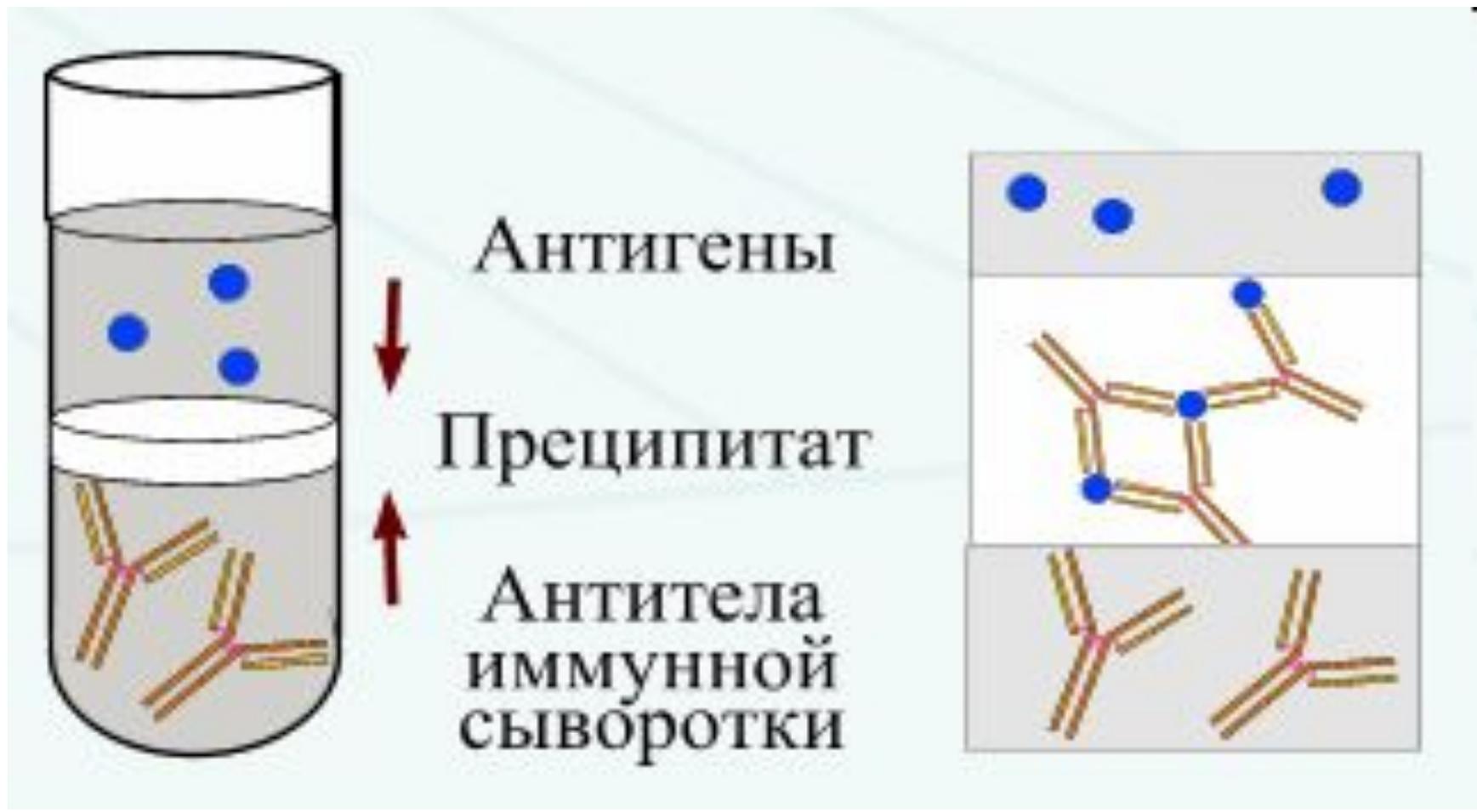
Реакция кольцепреципитации

- В преципитационную пробирку с помощью пастеровской пипетки вносят 0,2-0,3 мл (5-6 капель) сыворотки (сыворотка не должна попадать на стенки пробирки);
- На сыворотку осторожно наслаивают антиген в таком же объеме, наливая его пастеровской пипеткой по стенкам пробирки.

Реакция кольцепреципитации

- Пробирку при этом держат в наклонном положении;
 - При правильном наслаивании между сывороткой и антигеном должна получиться четкая граница.
 - Ставят ряд контролей.
 - Учет результатов производят через 5-30 мин.
-

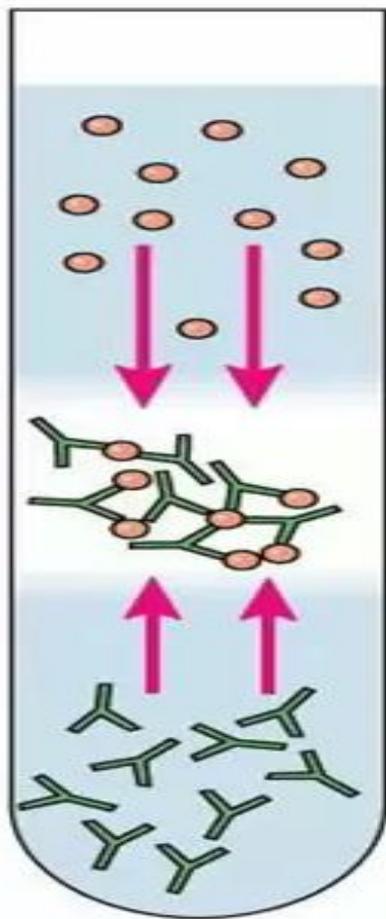
Реакция кольцепреципитации



Реакция кольцепреципитации



Механизм и положительный результат реакции кольцепреципитации



Антиген

Зона
ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Антитела



Реакция преципитации в агаре

- Применяют для определения токсигенности культуры, например при дифтерии.
 - В чашку Петри с питательной средой помещают полоску стерильной фильтровальной бумаги, смоченную антитоксической сывороткой.
 - Испытуемую культуру засевают «бляшками» петлей. Диаметр бляшек 0,8-1,0 см.
-

-
- Расстояние бляшек от края полосок бумаги 0,5-0,7 см. Между двумя бляшками испытуемой культуры засевают бляшки заведомо токсигенного штамма.
 - Ставят в термостат на 24-48 часов и учитывают результат: культура токсигенная – линии преципитации соединяются; культура нетоксигенная – линии преципитации перекрещиваются.
-

Реакция преципитации в агаре.



Реакция нейтрализации (РН)

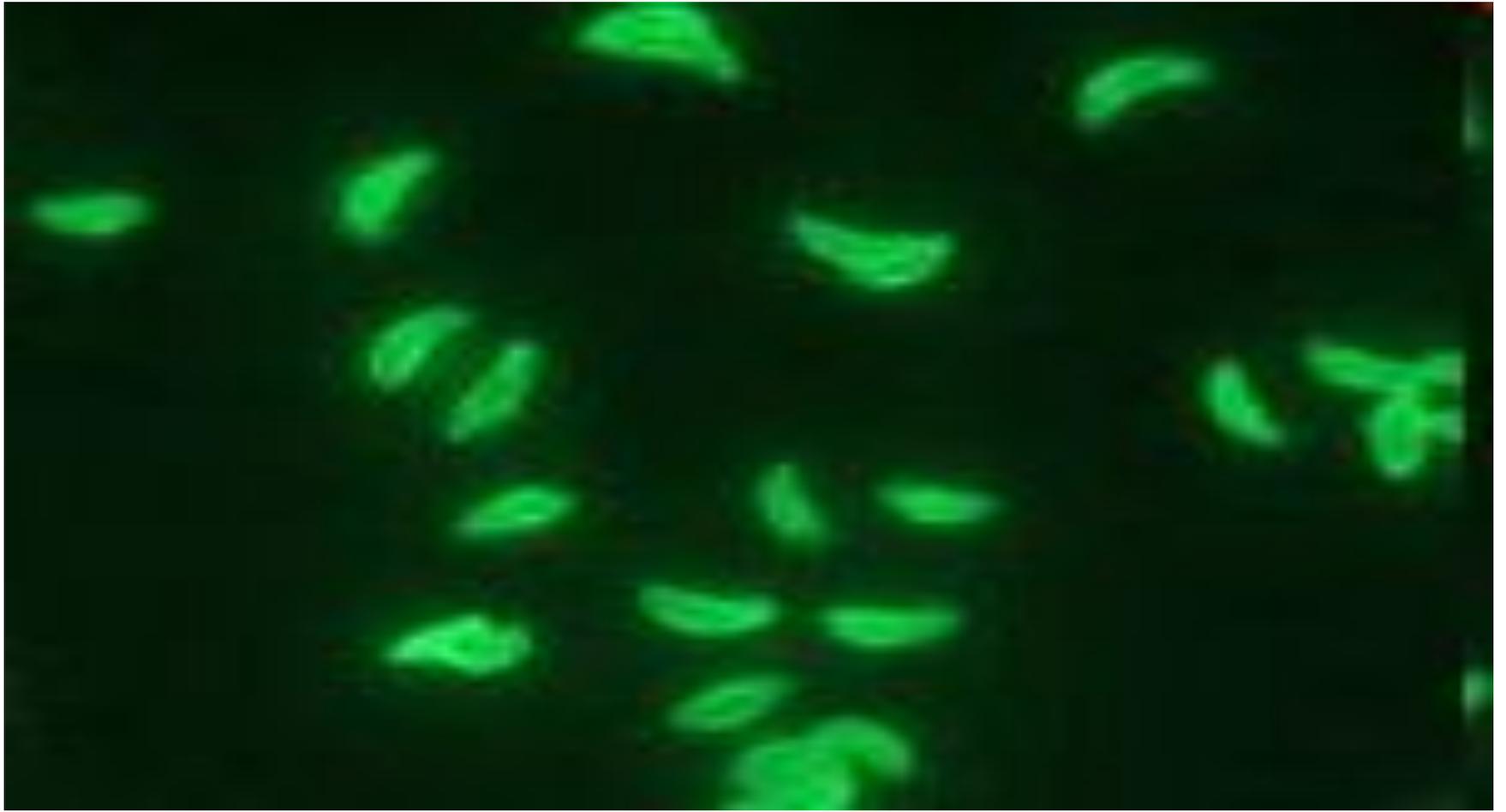
- Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие микроорганизмов или их токсинов на чувствительные клетки ткани.
- Это связано с блокадой микробных антигенов антителами, т.е. их нейтрализацией.

-
- При постановке реакции смесь а/г – а/т, полученную *in vitro* вводят животным или вносят в культуру клеток.
 - При отсутствии повреждающего действия микроорганизмов или их антигенов и токсинов говорят о нейтрализующем действии иммунной сыворотки и, следовательно, специфичности взаимодействия комплекса антиген-антитело.
-

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

- Основана на том, что иммунные сыворотки, к которым химическим путем присоединены флюорохромы (люминесцирующие сыворотки), при взаимодействии с соответствующими антигенами образуют специфический светящийся комплекс, видимый в люминесцентном микроскопе.

Токсоплазмы



Пневмококки



Иммуноферментный анализ (ИФА)

- ИФА – выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой.
 - После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат-хромоген.
 - Субстрат расщепляется ферментом и изменяется цвет продукта реакции – интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.
-

ИФА

- ИФА применяют для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней, в частности для диагностики ВИЧ-инфекций, гепатита В и др., а также определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ, содержащихся в исследуемом материале.
-

ИФА

Прямой твердофазный ИФА (схема)

1. Сыворотку инкубируют с Ag, фиксированным на твердом субстрате (пластиковая микропланшетка)

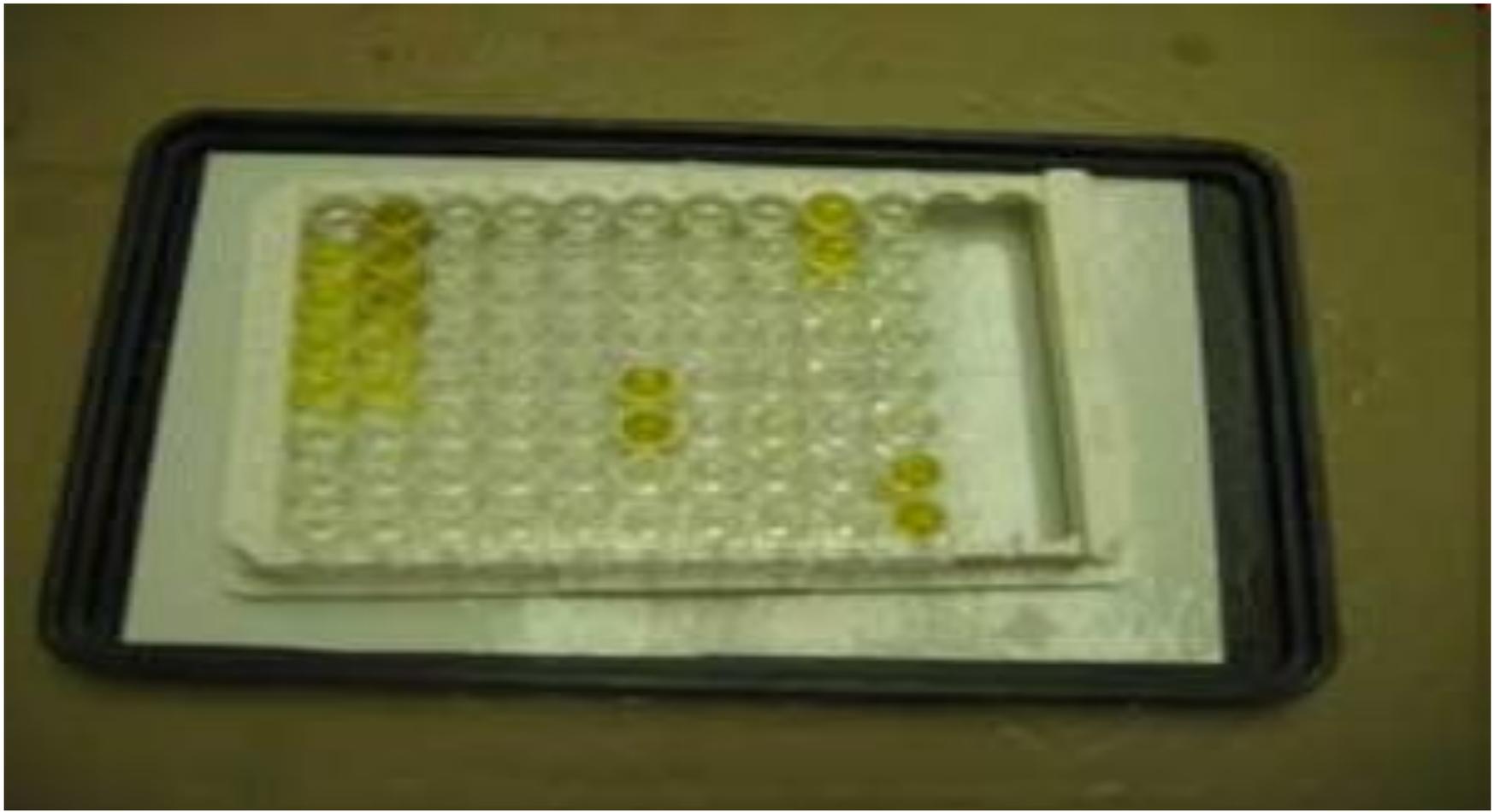
2. АТ, не связавшие Ag, удаляют многократным промыванием

3. Вносят меченную ферментом антисыворотку к АТ, связавшим Ag

4. Определяют количество фермента-маркера, связавшегося с АТ



Результат ИФА. Желтый цвет раствора в лунке является положительным результатом



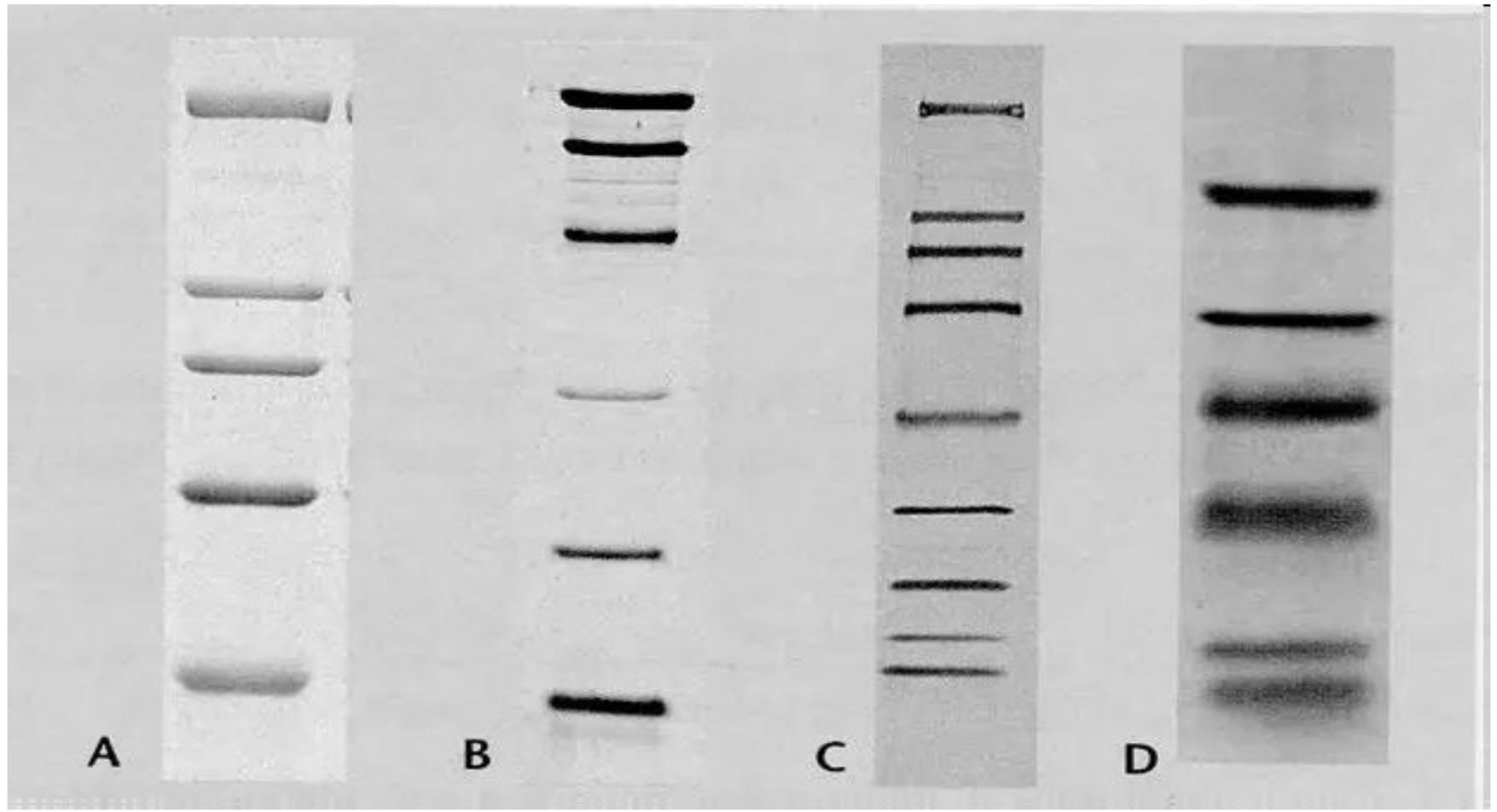
Иммуноблоттинг

- Определение антигенов или антител с помощью известных сывороток или антигенов.
 - Метод основан на выделении антигена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, последующем переносе выделенного антигена из геля на активированную бумагу или нитроцеллюлозу (блот-пятно) и выявлении на подложке искомого антигена с помощью ИФА.
-

Иммуноблотинг



Иммуноблоттинг



Радиоиммунологический анализ (РИА)

- РИА – количественное определение антител или антигенов, меченных радионуклидом, с применением аналогичных антител или антигенов: например, искомого антигена с применением иммунной сыворотки и аналогичного антигена, меченного радионуклидом.
-

Радиоиммунологический анализ

- После их взаимодействия отделяю образовавшийся радиоактивный комплекс антиген-антитело и определяют его радиоактивность по счетчику импульсов: количество меченого антигена, связавшегося с антителами, обратно пропорционально количеству искомого антигена.
-

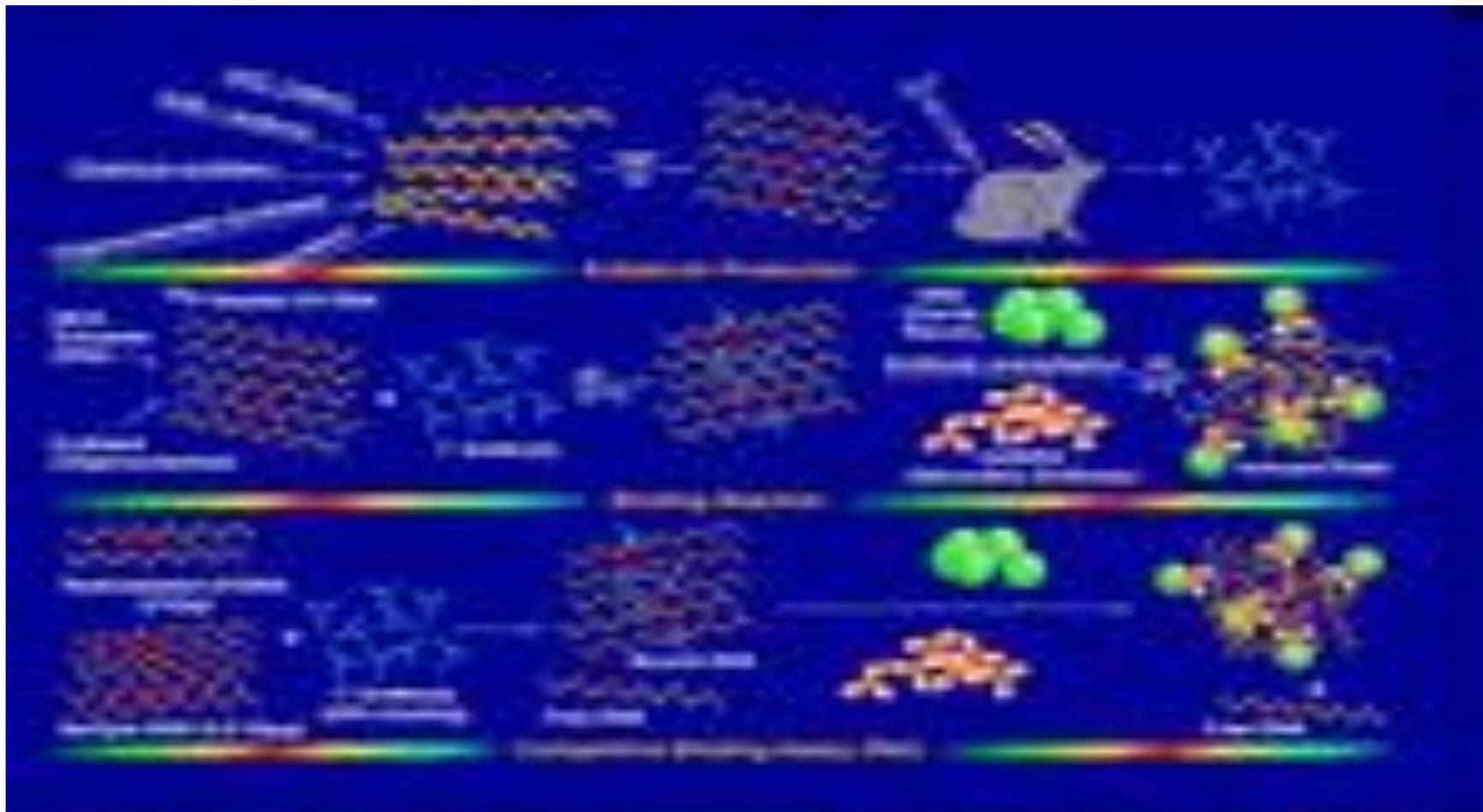
РИА

- Широкое распространение получили так называемый прямой и непрямой варианты твердофазного радиоиммунологического метода, при которых используют полистироловые плашки с адсорбированными антигенами или антителами.
- Метод применяют для выявления антигенов микроорганизмов, определения гормонов, ферментов, лекарственных веществ и иммуноглобулинов.

Радиоиммунный анализ (РИА)



Радиоиммунный анализ (РИА)



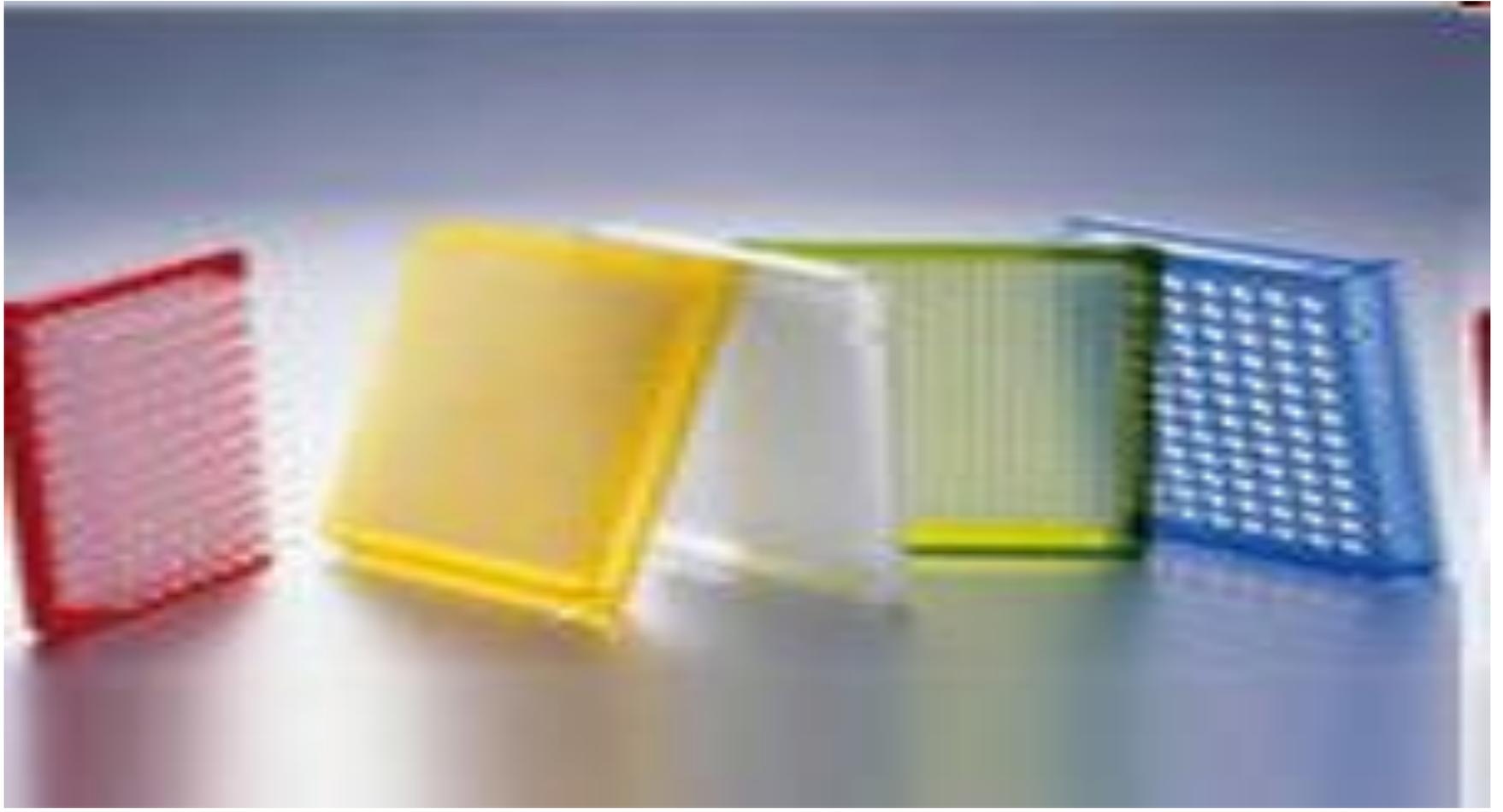
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР позволяет идентифицировать микроорганизмы по ДНК без выделения его в виде чистой культуры.

ПЦР применяют:

- для диагностики вирусных и бактериальных инфекций;
- в иммунологии;
- в урогинекологической практике;
- в неопатологии;
- в практике службы крови;
- в пульмонологии и фтизиатрии;
- в онкологии и др.

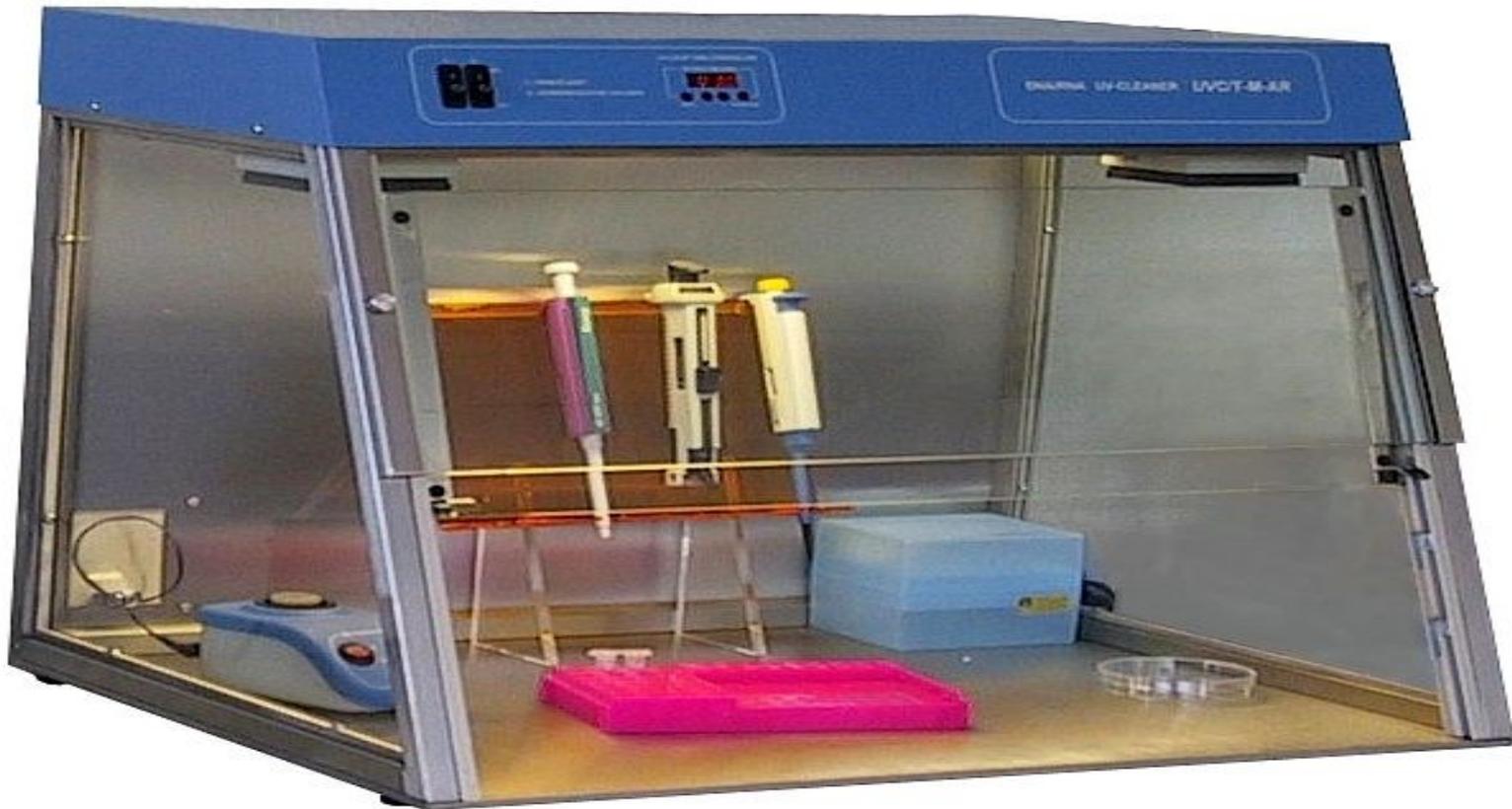
ПЦР



ПЦР



Бокс для ПЦР работ



ПЦР



Реакция агглютинации латекса (РАЛ)

- Для постановки РАЛ используют сенсibilизованные частицы полистиролового латекса диаметром 0,5-1,2 мкм, которые в присутствии гомологичного иммунологического реагента (антигена или антитела) склеиваются.
- Эта реакция происходит достаточно быстро – на протяжении 2-7 мин, что позволяет ее применять как экспресс-метод выявления антигенов и антител.
- Нагруженные антителами частицы латекса широко используются для выявления антигенов вирусов и бактерий.

Реакция агглютинации латекса (РАЛ)

- Нагружая латекс антигенами, можно определять наличие антител в сыворотке больного.
 - Такую модификацию РАЛ используют для выявления противогриппозных, противокраснушных, протикоревых антител и т.д.
-

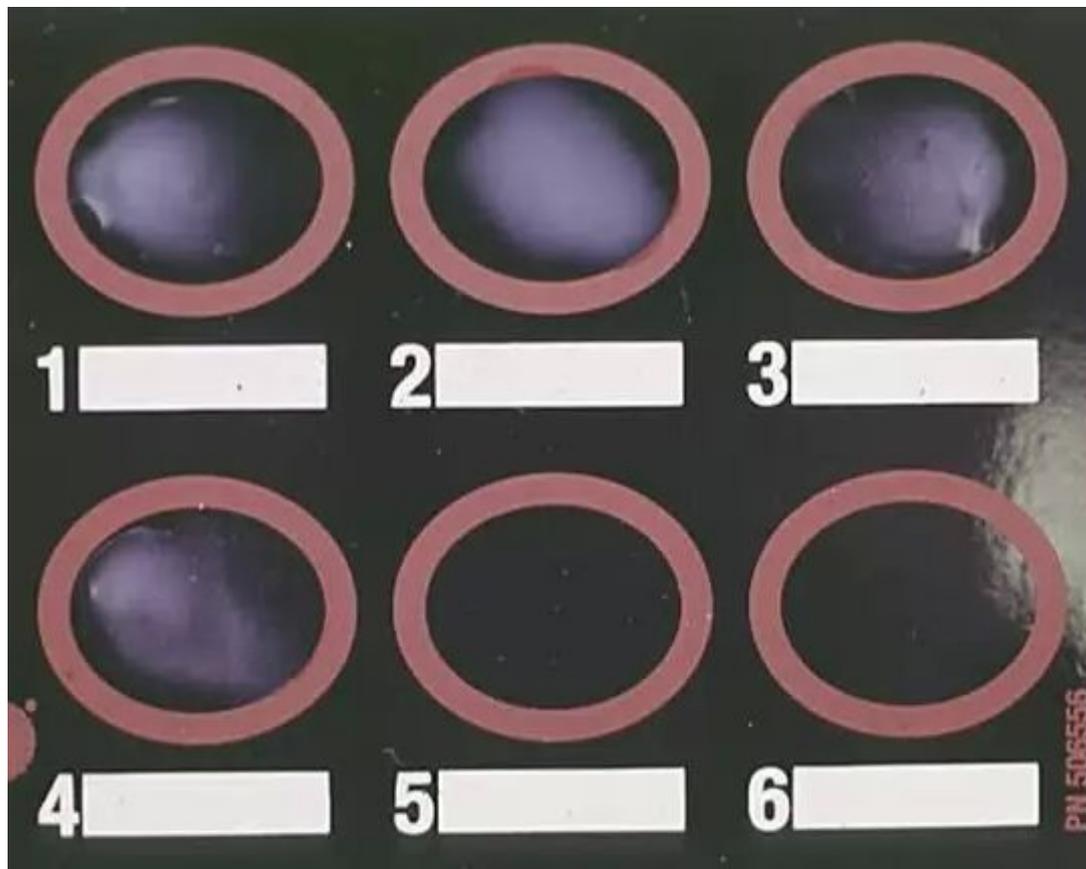
Проведение реакции латекс-агглютинации



Проведение реакции латекс-агглютинации



Учет реакции латекс-агглютинации



Благодарю за внимание

