

**Сложные реакции иммунитета.
Серодиагностика ИФА, ИХА
Иммуноиндикация. ИФА, РИФ, РПГА,
реакция латекс агглютинации,
коаглютинации**



Все реакции иммунитета:

- 1) высокоспецифичны, т.к. антитела могут взаимодействовать (соединяться) только со строго определенными (соответствующими) антигенами, которые и вызвали синтез данных антител. И это взаимодействие происходит по типу замка и ключа.
- 2) высокочувствительны, т.к. позволяют обнаружить единичные молекулы либо антигена, либо антитела.
- 3) Все реакции иммунитета можно выразить следующей формулой:

$$\text{АГ} + \text{АТ} = \text{РЕЗУЛЬТАТ}$$

Правая часть этого равенства регистрируется и поэтому всегда известна. Зная результат и один из компонентов, можно обнаружить другой неизвестный компонент (антиген или антитело).

Положительный результат будет в случае, когда антиген соответствует антителу. Отрицательный, когда антиген не соответствует антителу, поэтому зная результат и один из компонентов реакции, можно обнаружить другой неизвестный компонент. В

связи с этим все реакции иммунитета делят на две группы:

$\text{АГ} + \text{хАТ} = \text{Результат}$ – реакции по обнаружению неизвестных антител;

$\text{хАГ} + \text{АТ} = \text{Результат}$ – реакции по обнаружению неизвестных антигенов.

Цель серодиагностики – обнаружение инфекционных антител в сыворотке крови больного человека.

Титр антител – это наибольшее разведение сыворотки, в котором еще обнаруживаются антитела. Таким образом, титр инфекционных антител нарастает. Следовательно, диагностические реакции иммунитета необходимо повторять в ходе заболевания. С этой целью применяют метод парных сывороток. **Парные сыворотки больного – сыворотки одного и того же больного, взятые в разные сроки болезни.**

Первый раз забор осуществляют на 5-8-й день от начала заболевания, второй раз – на 10-16-й (в этот срок их количество в сыворотке, как правило, максимально). Нормальные, постинфекционные и поствакцинальные АТ такой динамики не обнаруживают и остаются по мере развития заболевания на более или менее постоянном уровне.

К каждому разведению сыворотки добавляют строго определенное равное количество известного антигена, в качестве которого используют стандартные антигенные диагностические препараты – диагностикумы, содержащие взвесь убитых микроорганизмов (бактерий, вирусов, хламидий, риккетсий) или их отдельные антигены.

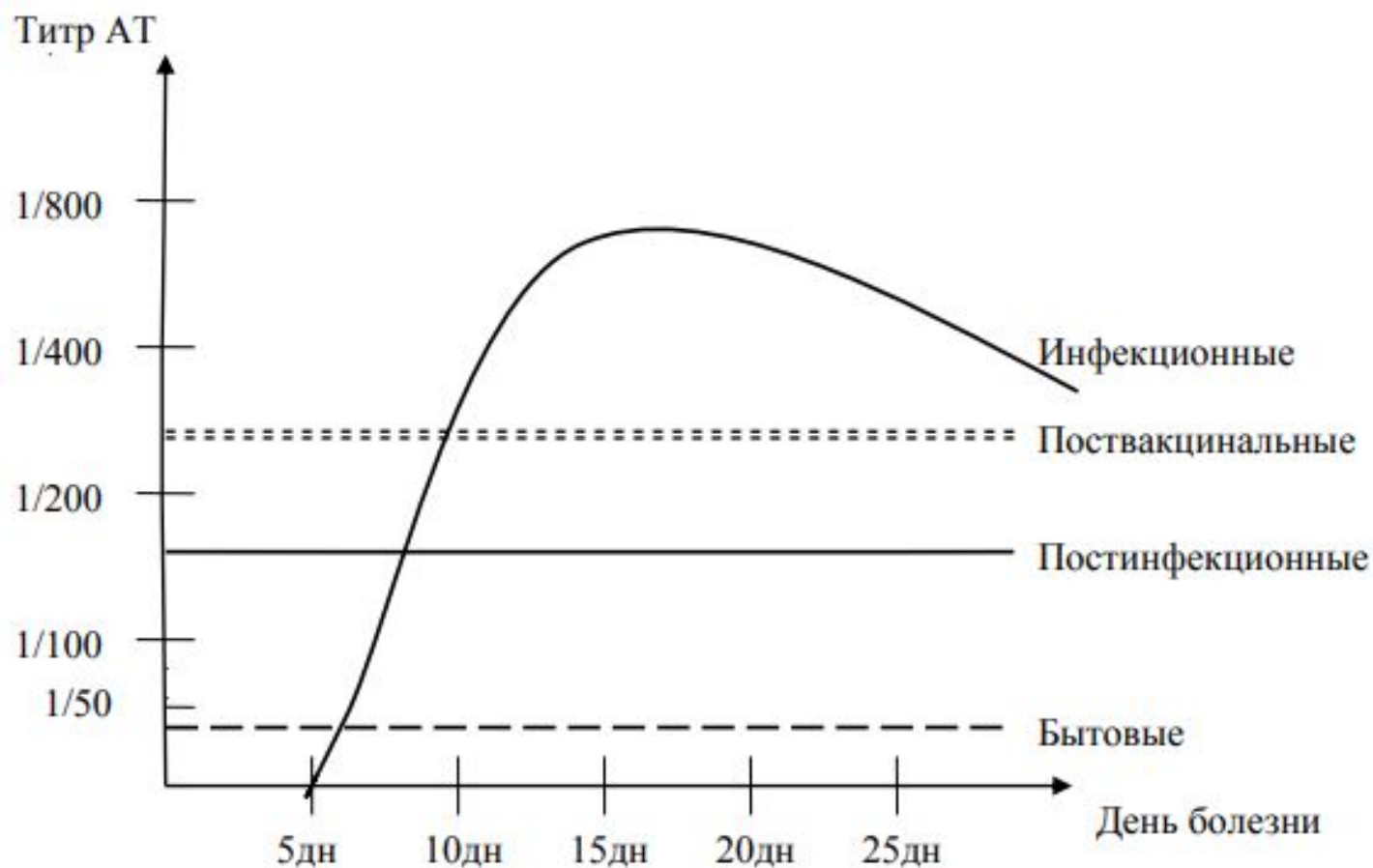


Рис. 1. Динамика нарастания титра антител.

Иммуноиндикация – обнаружение неизвестного антигена в исследуемом материале (фекалии, кровь, ликвор, объекты внешней среды и др.)

Иммуноидентификация

Важное место занимают реакции по обнаружению антигена при реализации основного метода микробиологической диагностики – бактериологического исследования. Такие реакцию проводят с целью изучения антигенного строения неизвестной чистой культуры, выделенной в ходе бактериологического исследования, т.е. для ее серологической идентификации. Это дает возможность определять не только вид, но и серогруппу или серовар. Такие реакции иммунитета носят название реакции по идентификации, с этой целью используется только одна реакция – реакция агглютинации, соответственно она будет называться реакция агглютинации по идентификации.

Реакция латекс-агглютинации

Данная реакция используется только с целью иммуноиндикации. Антитела сорбируют на частицах полистирольного латекса. При образовании комплекса АГ+АТ, происходит склеивание латексных частиц. Частицы латекса являются как бы искусственными эритроцитами, но более устойчивыми к внешним воздействиям.

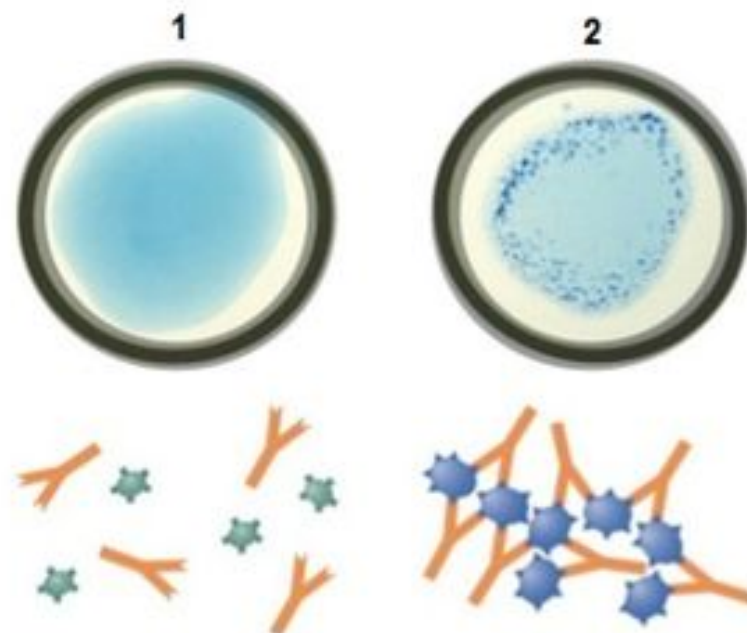
Компоненты реакции:

- 1) исследуемый материал (хАГ);
- 2) латексный диагностикум — частицы латекса с адсорбированными на них известными антителами.

Реакция ставится на предметном стекле. К исследуемому материалу добавляют латексный диагностикум. Учет результата проводят сразу после постановки реакции. При положительном результате на стекле образуются мелкие, но хорошо видимые невооруженным глазом хлопья агглютинации.



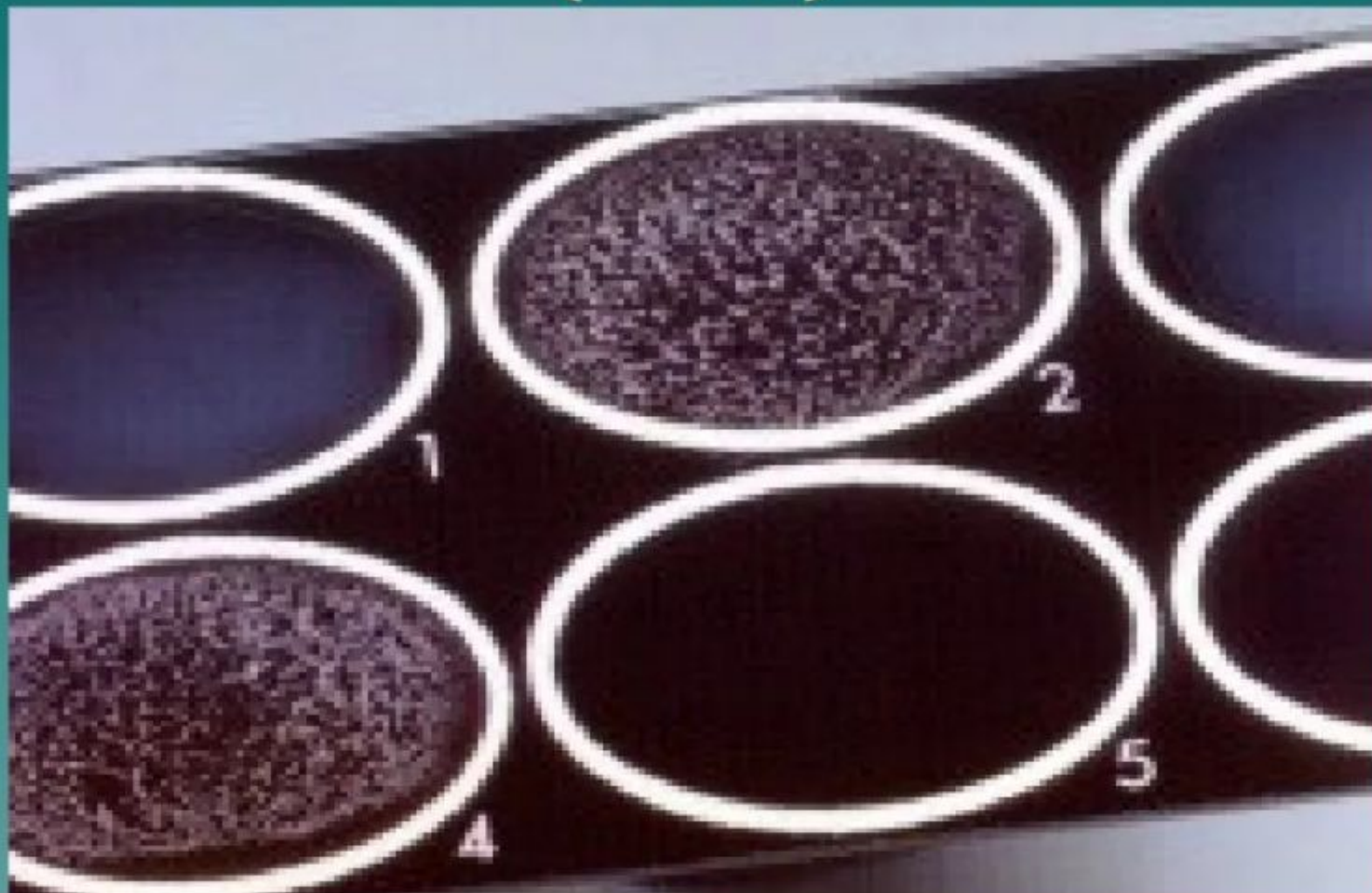
Набор реагентов для проведения реакции латекс агглютинации



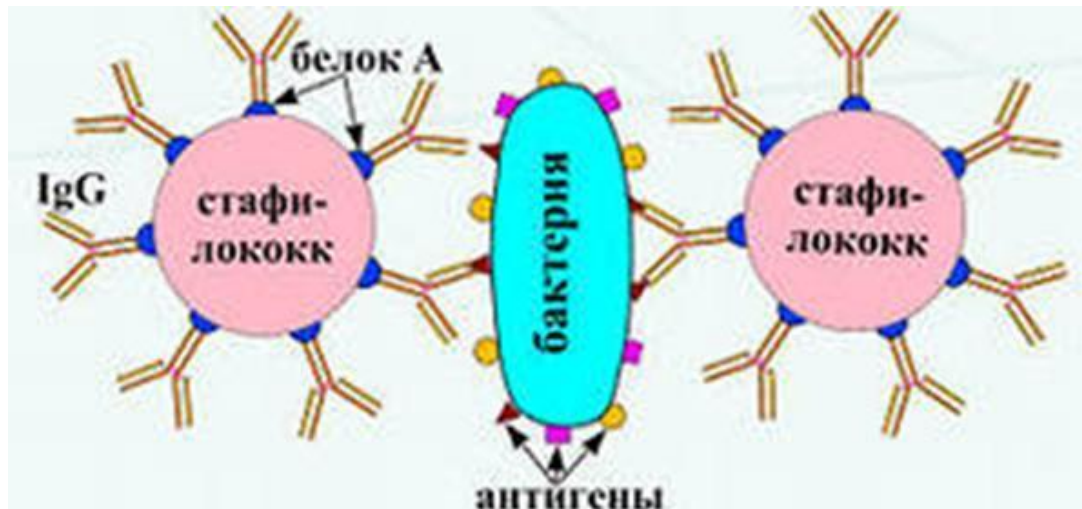
Реакция латекс агглютинации на стекле.

1 – отрицательный результат;
2 – положительный результат.

Латексная агглютинация (РАЛ)



Реакция коагглютинации (РКоА) основана на способности белка А стафилококков присоединять специфические АТ (иммуноглобулины). Это метод экспресс-диагностики — служит для выявления растворимых термостабильных антигенов в секретах человека. Реакцию ставят на стеклянных пластинках, смешивая одинаковые объемы (1-2 капли) исследуемого материала (кровь, моча, слюна, фильтраты фекалий и др.) и стафилококкового диагностикума. Смесь тщательно перемешивают и через 2-5 мин. на тёмном фоне учитывают результаты. На тёмном фоне должна четко просматриваться мелкозернистая агглютинация стафилококков.



Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).

Различают прямую и непрямую РИФ.

Реакция непрямой иммунофлюоресценции применяется для серодиагностики.

Компоненты реакции:

- 1) эталонный штамм (АГ);
- 2) исследуемая сыворотка (хАТ);
- 3) меченая антиглобулиновая сыворотка

Из эталонного штамма возбудителя на предметном стекле готовят мазки как для обычной микроскопии. Препарат фиксируют метиловым спиртом или другим химическим фиксатором. На поверхность фиксированного мазка наносят исследуемую сыворотку от больного в разных разведениях. Если в сыворотке присутствуют искомые антитела, то образуется комплекс АГ+АТ, прочно связанный с предметным стеклом. При промывании буферным раствором антитела остаются в образовавшемся комплексе. Затем препарат обрабатывают меченой сывороткой против иммуноглобулинов человека, содержащей антитела к антителам человека, меченные флюоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ). Меченное флюорохромом антитело образует с инфекционными антителами иммунный комплекс и после повторной отмывки остается в системе. Учет результатов реакции осуществляется с помощью люминесцентного микроскопа. При положительном результате (в сыворотке найдены АТ) наблюдается специфическое свечение (рис.3) . Интенсивность свечения зависит от количества образовавшихся иммунных комплексов, а, следовательно, от количества антител в сыворотке обследуемого. При отрицательном результате свечение отсутствует. Метод нашел применение в серодиагностике герпеса, цитомегалии, лихорадки Ласса. Основной недостаток метода – это его субъективность, так как он основан на микроскопии и визуальном наблюдении.

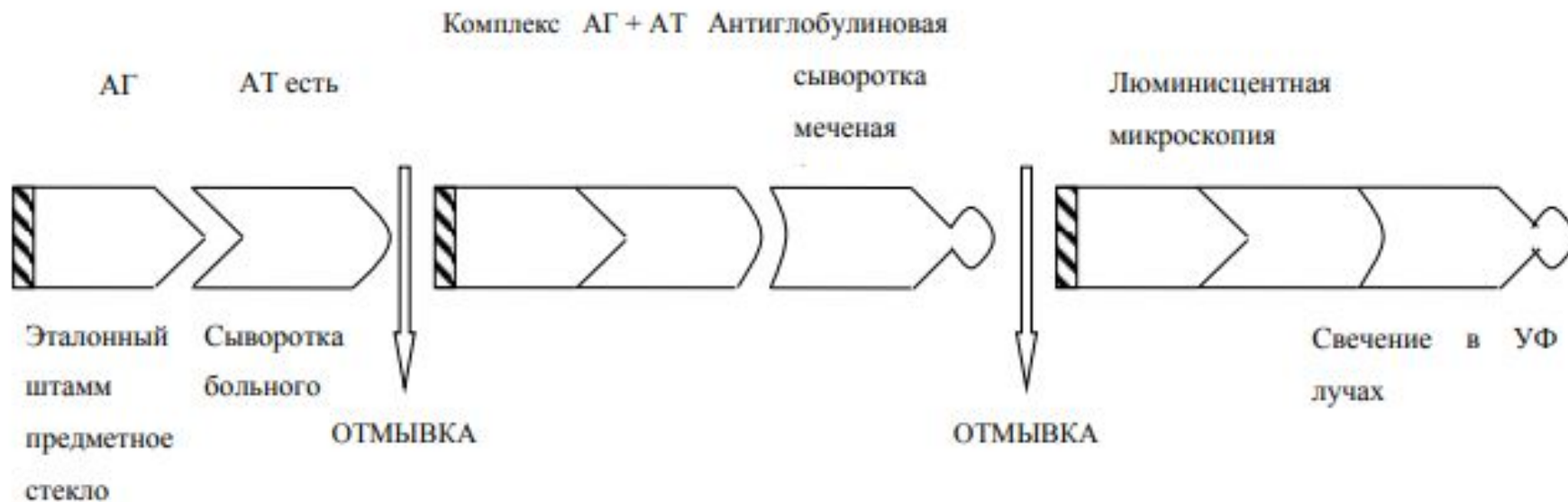


Схема положительной серодиагностической непрямой РИФ.

Реакция прямой иммунофлюоресценции в основном применяется для иммуноиндикации. Чаще всего прямую РИФ используют для быстрого обнаружения АГ возбудителя в патологическом материале.

Компоненты реакции:

- 1) исследуемый материал от больного (хАГ);
- 2) диагностическая сыворотка меченная флюорохромом (АГ)

Из исследуемого материала готовят мазок на предметном стекле как для обычной микроскопии. Препарат фиксируют. На поверхность фиксированного мазка наносят меченые ФИТЦ сыворотки или моноклональные антитела. Меченые флюорохромом антитела образуют с антигенами исследуемого материала иммунные комплексы, и после отмывки остаются в системе. Результат учитывают по интенсивности свечения комплексов АГ+АГ при люминисцентной микроскопии препарата.

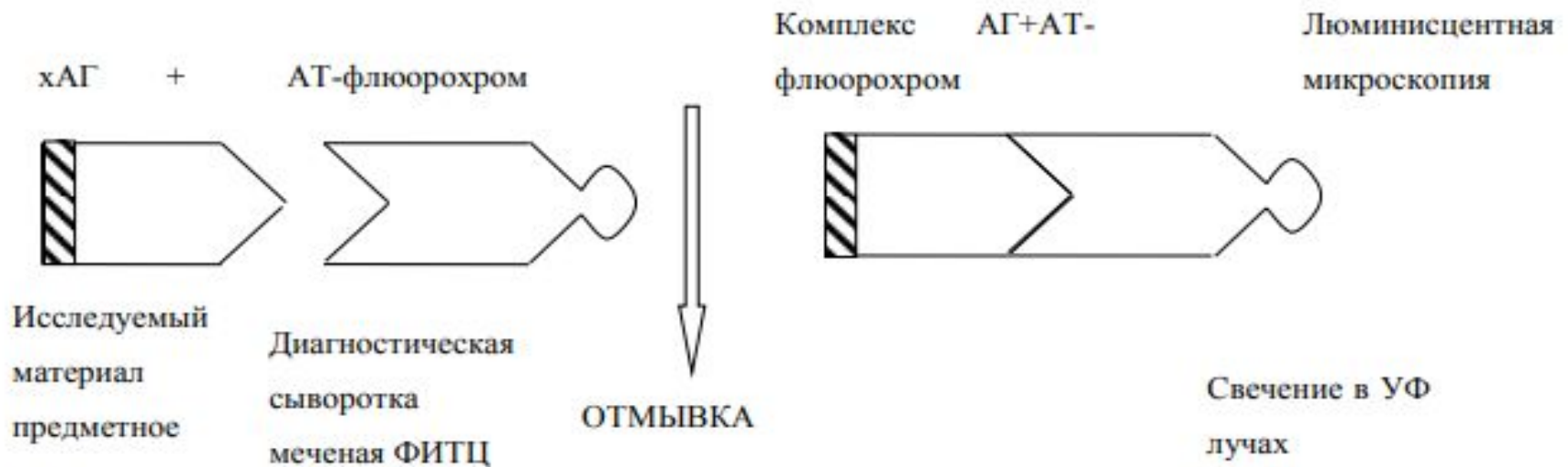
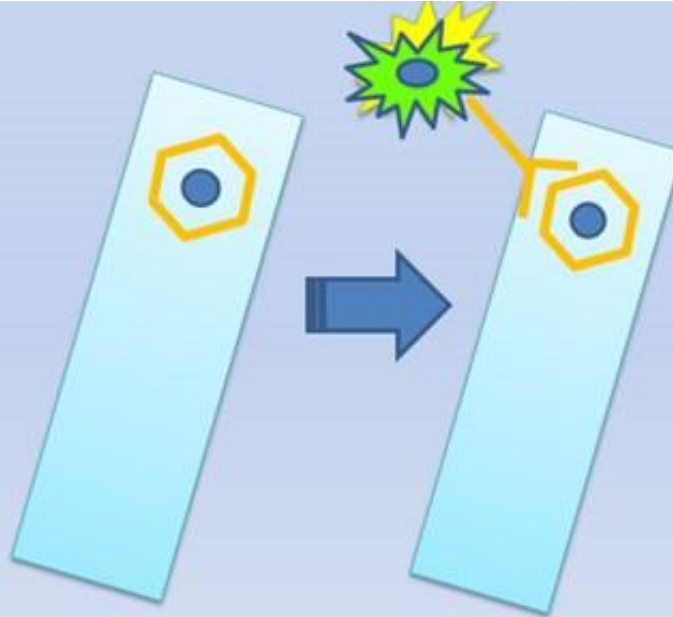
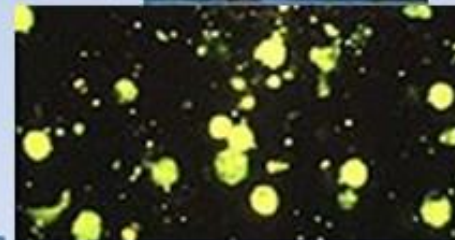


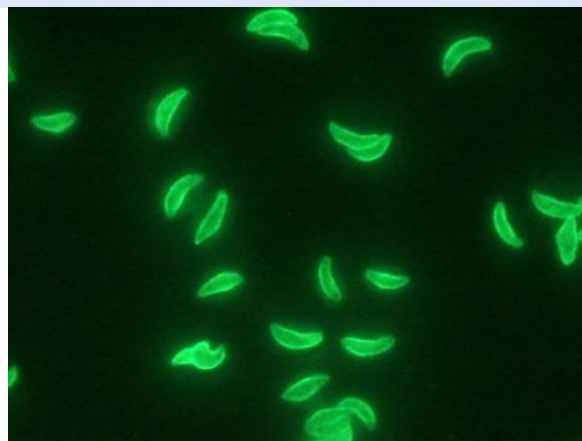
Схема положительной прямой РИФ



флюоресцентный
конъюгат



мазок -отпечаток анализируемой пробы органа
высокая чувствительность при острых формах болезни
40% чувствительность при подострых и хронических
формах болезни



ИФ токсоплазм

Иммуноферментный анализ = реакция иммуноферментного анализа

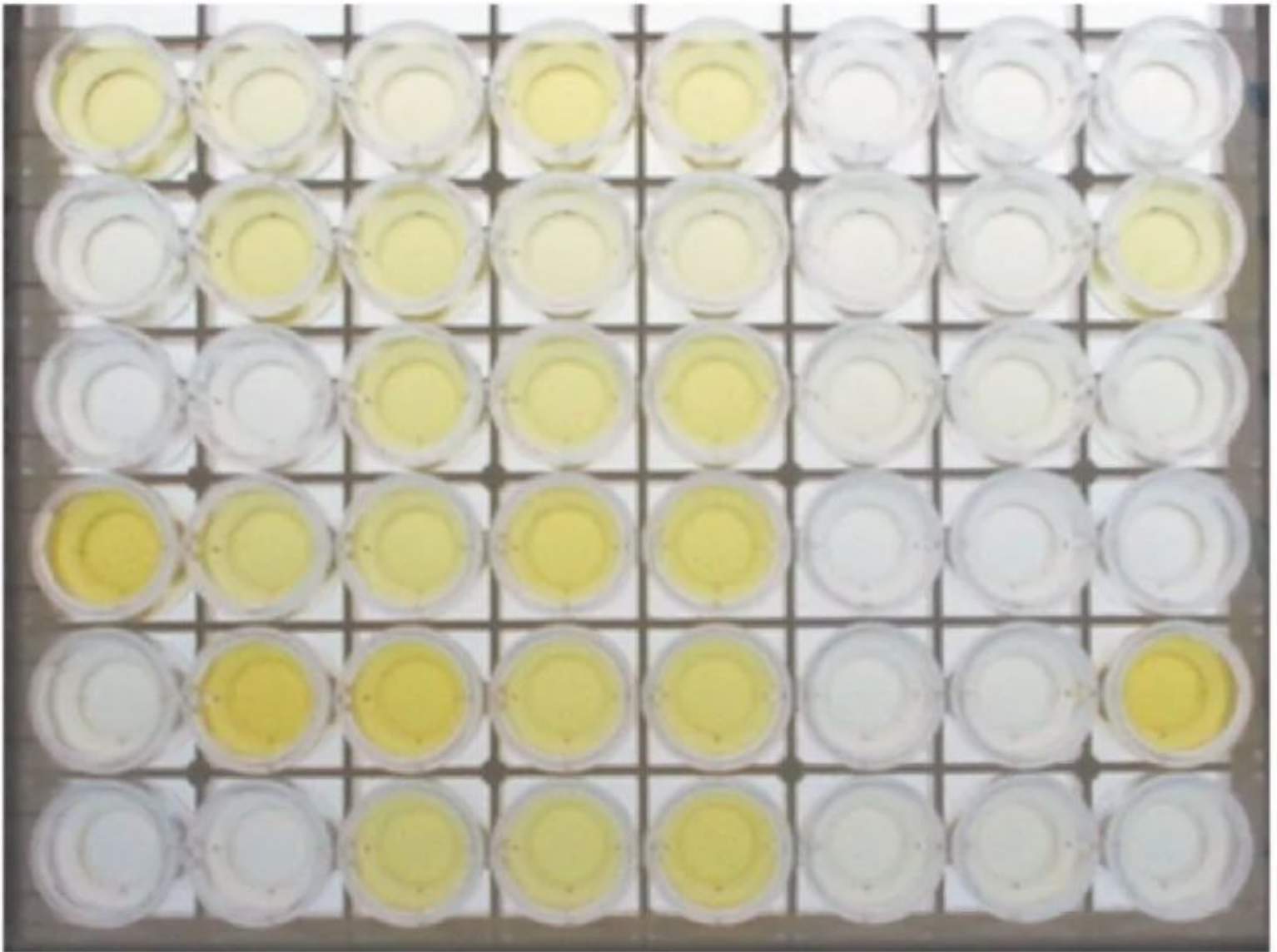
Для иммуноферментного анализа (ИФА) характерна высокая специфичность, высокая чувствительность и простота учета результата.

В основе этого метода лежит расщепление субстрата под действием фермента, которое выявляется изменением окраски индикатора в случае положительного результата. Количество расщепленного субстрата (интенсивность окраски) будет пропорциональна количеству связавшейся меченной антиглобулиновой сыворотки, т.е. количеству искомого компонента. В настоящее время предложены десятки вариантов реакций, основанных на указанном принципе. Так, прежде всего, различают гомогенный и гетерогенный ИФА. Гетерогенный (твердофазный) ИФА, в свою очередь бывает конкурентный и неконкурентный; прямой и непрямой.

Наиболее широкое распространение в диагностике инфекционных заболеваний получил твердофазный гетерогенный иммуноферментный анализ – ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Данная реакция иммунитета широко применяется как для серодиагностики, так и для иммуноиндикации. В данном варианте ИФА, известные АГ или АТ фиксируются на твердой фазе (полистирол, полиакриламид, агароза и др.). Наиболее часто используют 96-луночные полистирольные планшеты, так как на полистироле можно легко адсорбировать антитела, а с помощью специальной обработки и различные антигены. Конечный результат анализа оценивают визуально и/или реакции с помощью специальных спектрофотометров или ИФА-ридеров по оптической плотности окрашенных продуктов.



Наиболее часто используют 96-луночные полистирольные планшеты, так как на полистироле можно легко адсорбировать антитела, а с помощью специальной обработки и различные антигены. Конечный результат анализа оценивают визуально и/или реакции с помощью специальных спектрофотометров или ИФА-ридеров по оптической плотности окрашенных продуктов.



ELISA

Приборы для ИФА



Реакция иммуноферментного анализа по обнаружению антител (серодиагностическая ИФА).

Компоненты реакции:

- 1) эталонный антиген;
- 2) исследуемая сыворотка (хАТ);
- 3) антиглобулиновая сыворотка, меченная ферментом;
- 4) субстрат к ферменту, которым мечена антиглобулиновая сыворотка;
- 5) индикатор.

В лунки полистиролового планшета адсорбируется известный антиген. Исследуемая сыворотка (хАТ) вносится в лунку планшета. При наличии в сыворотке соответствующих антигену антител, образуется комплекс АГ-АТ, прочно связанный с планшетом. Затем в лунки вносят антиглобулиновую сыворотку меченую ферментом. При образовании комплекса АГ-АТ, антитела антиглобулиновой сыворотки, меченной ферментом, взаимодействуют с антителами этого комплекса и образуется новый комплекс АГ+АТ+меченная ферментом антиглобулиновая сыворотка. Чтобы выявить этот комплекс, к нему добавляют субстрат для фермента и индикатор. Реакция фермент-субстрат ведет к изменению окраски индикатора. Если же в исследуемой сыворотке нет АТ к известному АГ, то комплекс АГ-АТ не образуется. Соответственно, не образуется комплекс АГ+АТ+меченная ферментом антиглобулиновая сыворотка и при добавлении субстрата не будет реакции фермент-субстрат и цвет реакционной смеси не изменится.

Для определения в образцах АГ (иммуноиндикация) широко применяется «сэндвич» вариант ИФА. Свое название данный метод получил из-за того, что первый и последний (третий) компоненты одинаковые – это АТ к искомому АГ, а между ними расположен АГ-компонент. Это напоминает бутерброд-сэндвич.

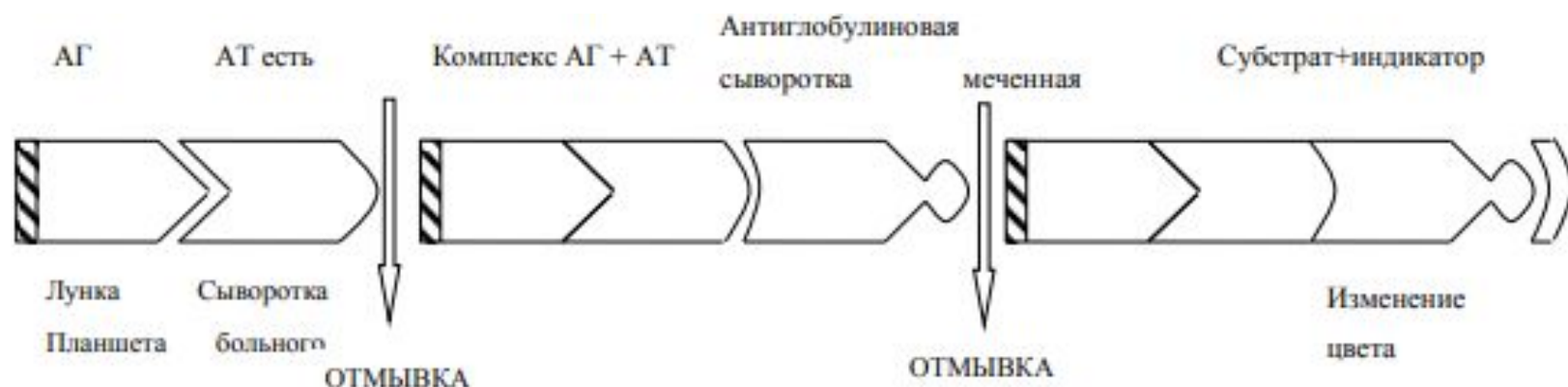


Схема положительной серодиагностической реакции ИФА.

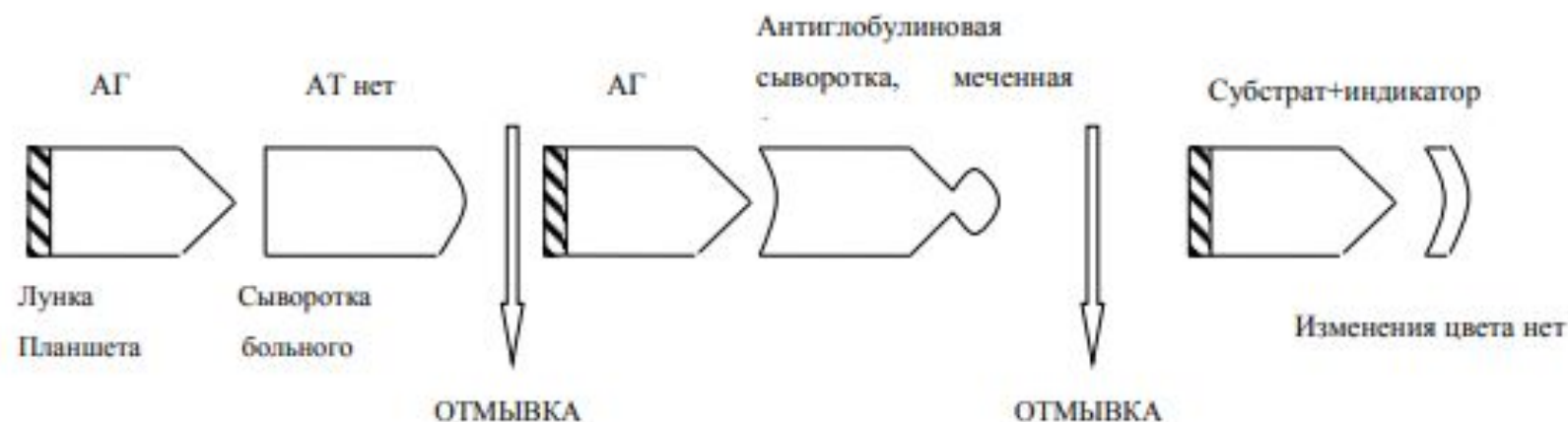


Схема отрицательной серодиагностической реакции ИФА.

Реакция иммуноферментного анализа по обнаружению антигенов.

АТ адсорбируют на твердую фазу и в лунки вносят исследуемый материал (хАГ). После инкубации и отмывания в лунки вносят меченые ферментом антитела к искомому АГ. Снова инкубируют и отмывают, вносят субстрат. При изменении цвета говорят о положительной реакции. Если цвет среды в лунке не изменился, это указывает на то, что при последней отмывке меченая ферментом сыворотка удалась из системы, поэтому разложения субстрата не произошло, а это возможно при отсутствии в исследуемом материале искомого АГ.

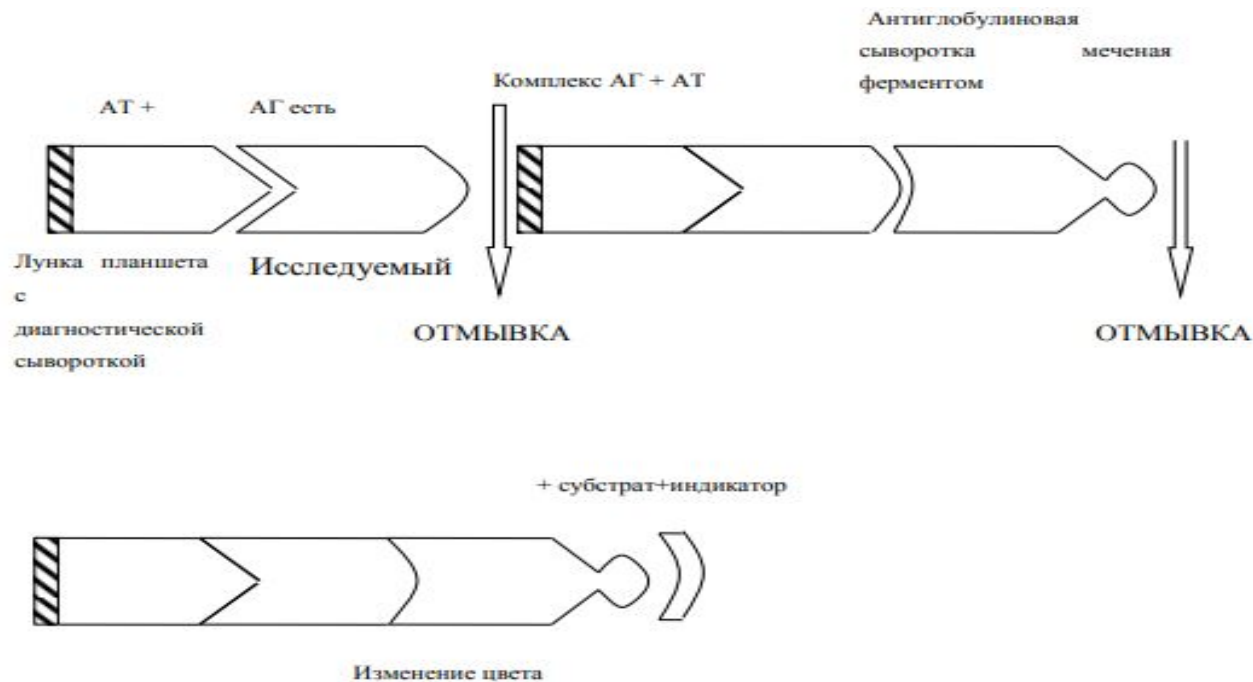


Схема непрямой положительной реакции ИФА (сэндвич-вариант)

Схема непрямой положительной реакции ИФА (сэндвичвариант). В данной разновидности иммунодиагностической РИФА, берутся 2 диагностические сыворотки, содержащие АТ к искомому АГ, но полученные путем иммунизации двух разных животных - барана и кролика. Важно, чтобы на первом этапе использовалась баранья сыворотка, а на втором – кроличья, т.к. на третьем этапе добавляется меченая сыворотка, содержащая АТ против иммуноглобулинов кролика. Независимо от вида искомого АГ, используемая меченная сыворотка одного типа, что позволяет снизить стоимость данного диагностического метода.

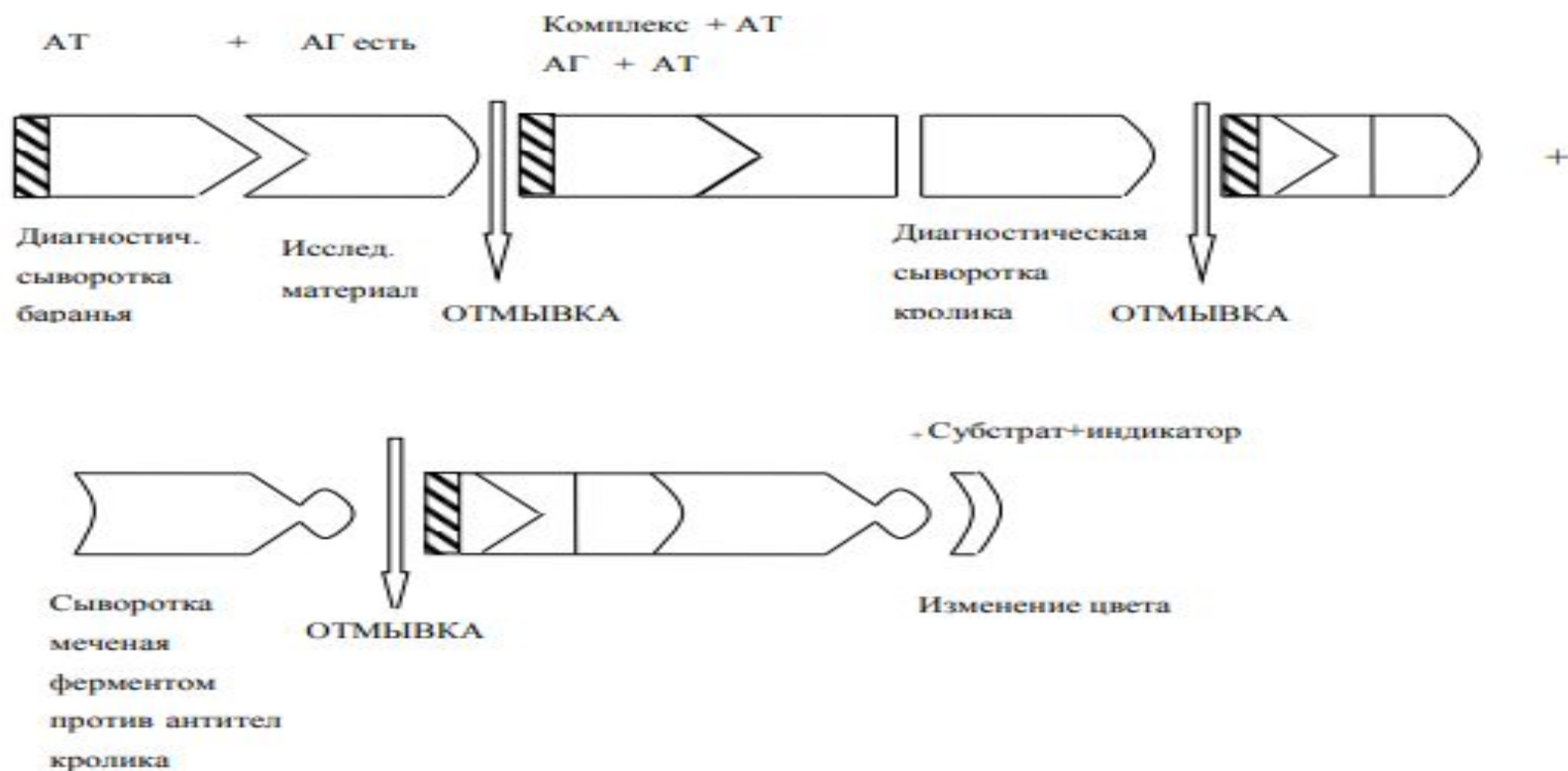


Схема непрямой положительной реакции ИФА

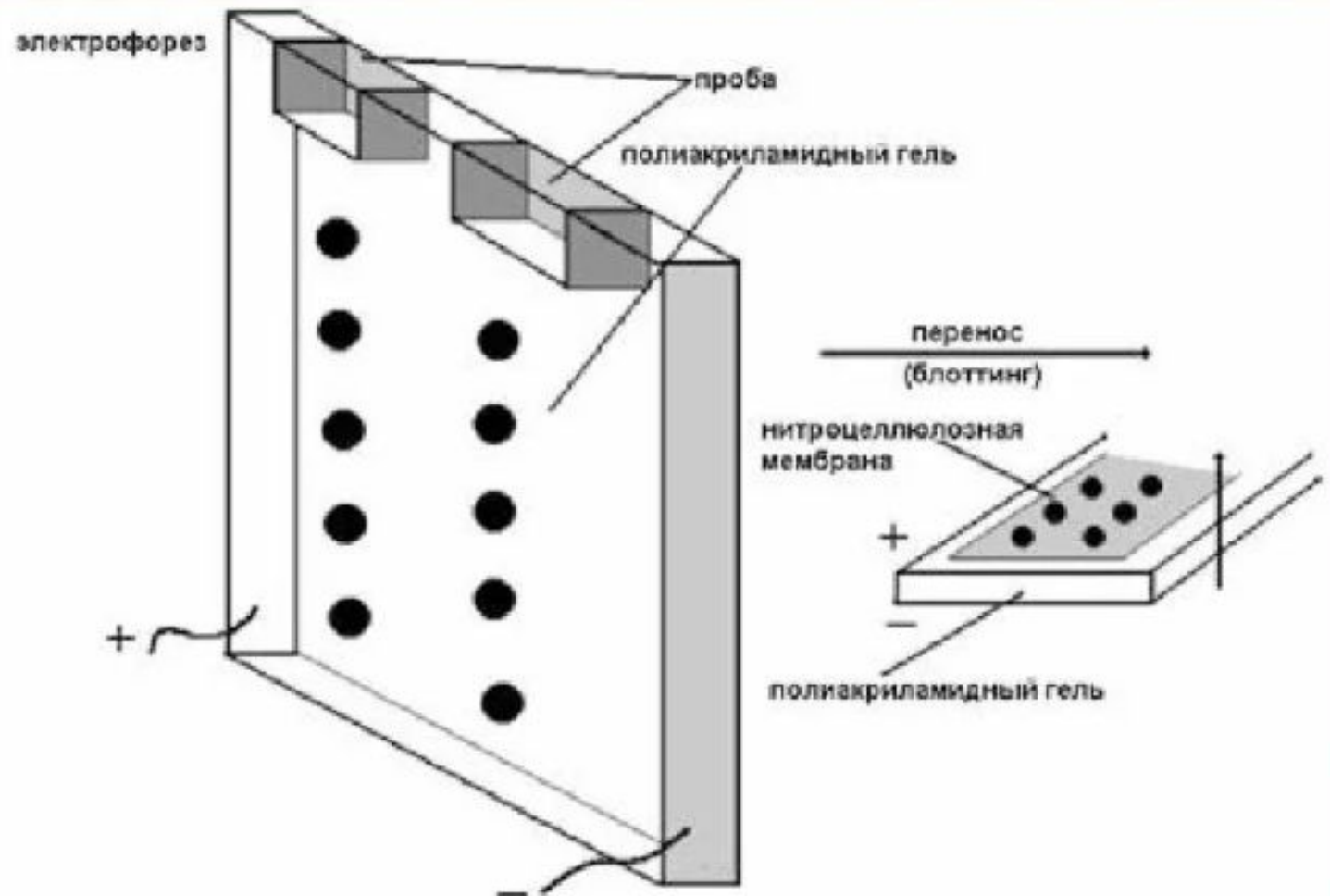
Иммуноблотинг.

В основе иммуноблотинга, как разновидности твердофазного иммуноферментного анализа, лежит тот же принцип.

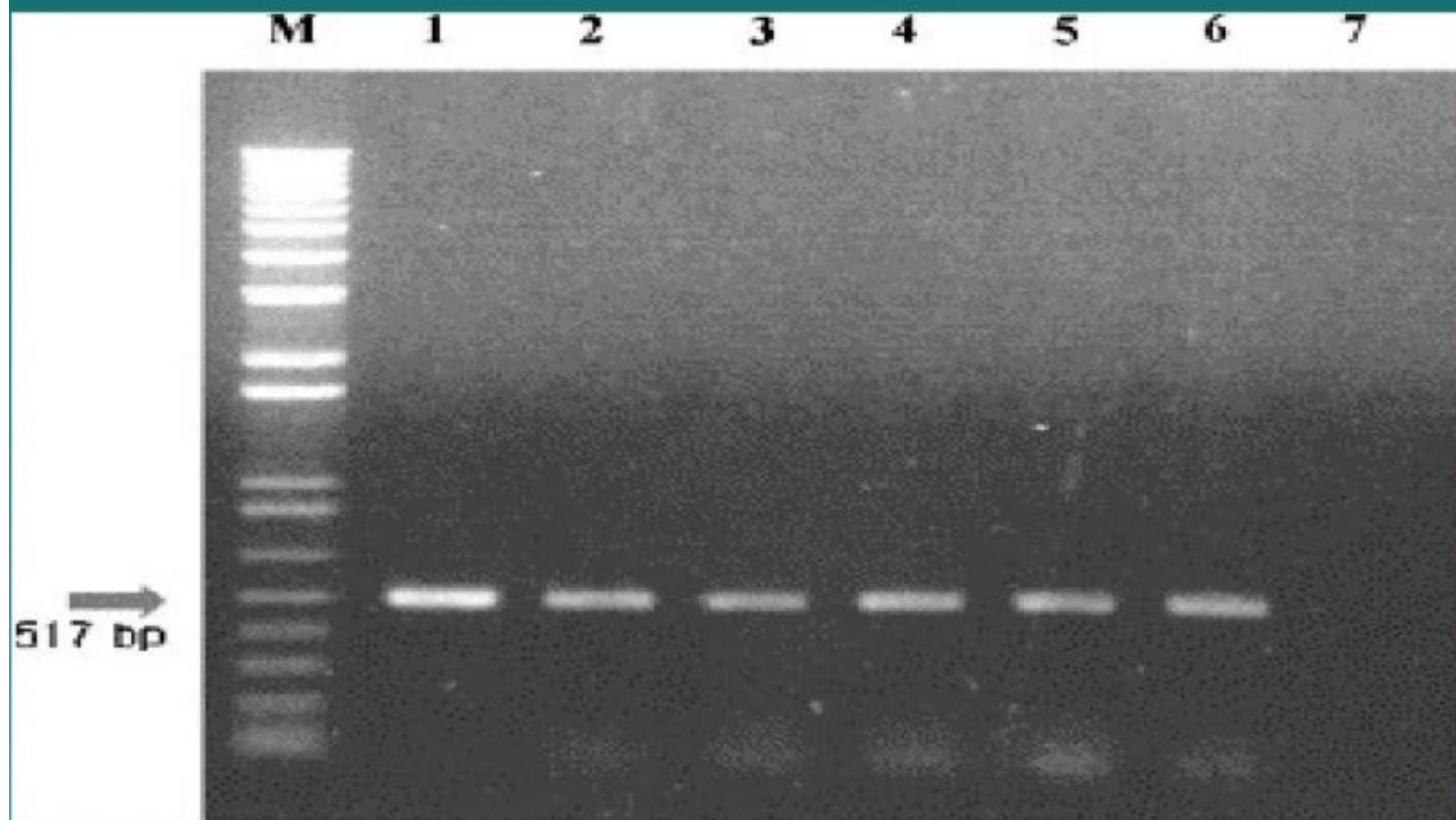
Отличие заключается в том, что вначале молекулы отдельных антигенов разделяют с помощью электрофореза. Реализация метода включает 3 этапа:

- 1) разделение макромолекул (например, белковых антигенов возбудителя) с помощью электрофореза в полиакриламидном геле;
- 2) перенос разделенных белков из геля на твердую подложку (блот) - активированную бумагу или нитроцеллюлозу. Эти этапы выполняются фирмой-производителем и поэтому для определения антител в лабораториях используются уже готовые к исследованию блоты (полоски, стрипы) содержащие разделенные антигены. В ходе диагностики на блоты наносят исследуемую сыворотку, инкубируют в термостате, отмывают от не связавшихся АТ и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом. После чего проводят отмывку добавление субстрата с индикатором. При наличии в исследуемой сыворотке АТ к тем или иным белкам микроорганизма, на блоте появляются темные поперечные полоски, представляющие собой комплексы АГ+АТ+меченная ферментом антиглобулиновая сыворотка + субстрат+индикатор. Расположение этих полос находится в зоне локализации тех или иных антигенов возбудителя. Каждая такая полоска свидетельствует о наличии специфических антител к соответствующему антигену. Результат исследования выдается в виде перечисления АТ к конкретным антигенам возбудителя.

Иммуноблот



Иммуноблот



Спасибо за
внимание!

