

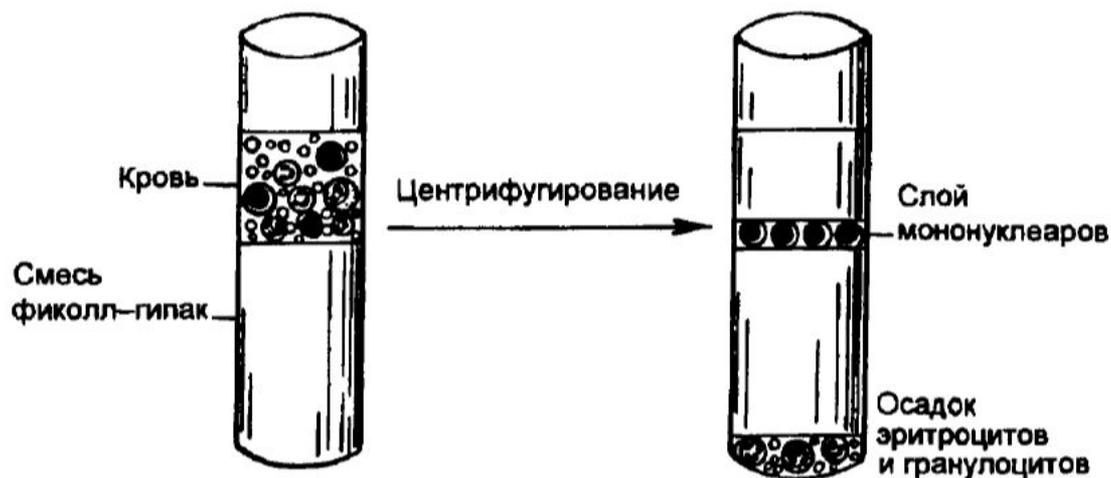
Иммунодиагностика

Клинико-иммунологические исследования делят:

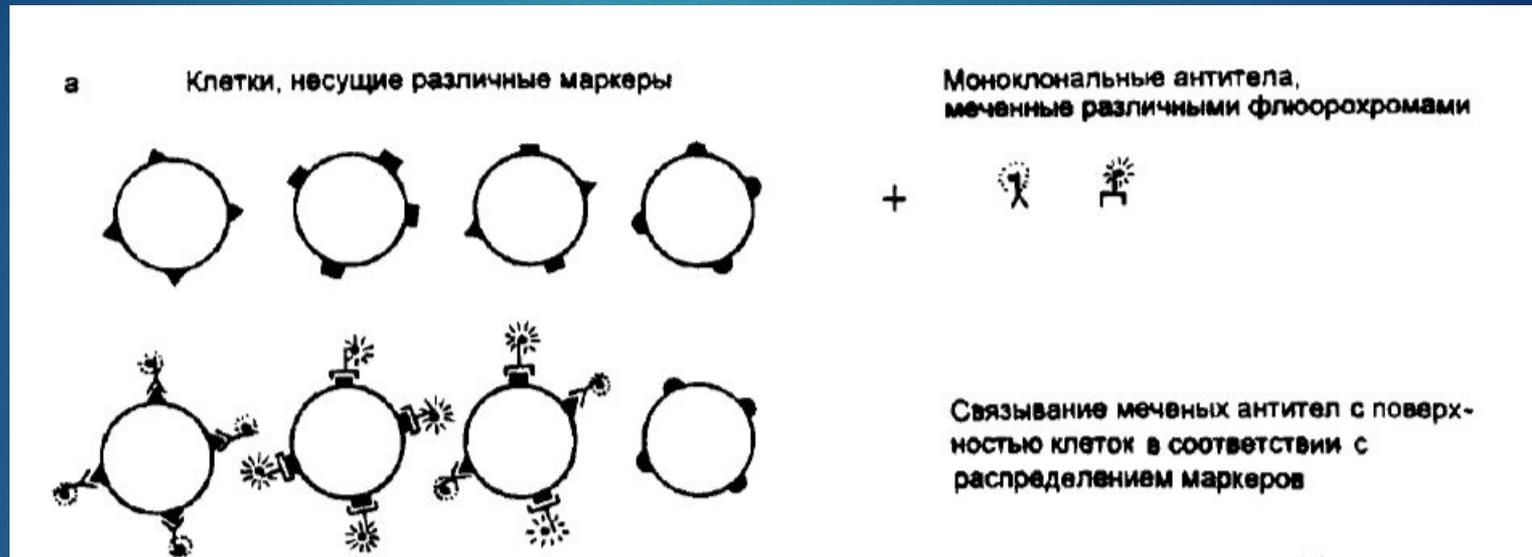
- ▶ Методы оценки клеточного иммунитета
- ▶ Методы оценки гуморального иммунитета

Основные объекты анализа: кровь или сыворотка.

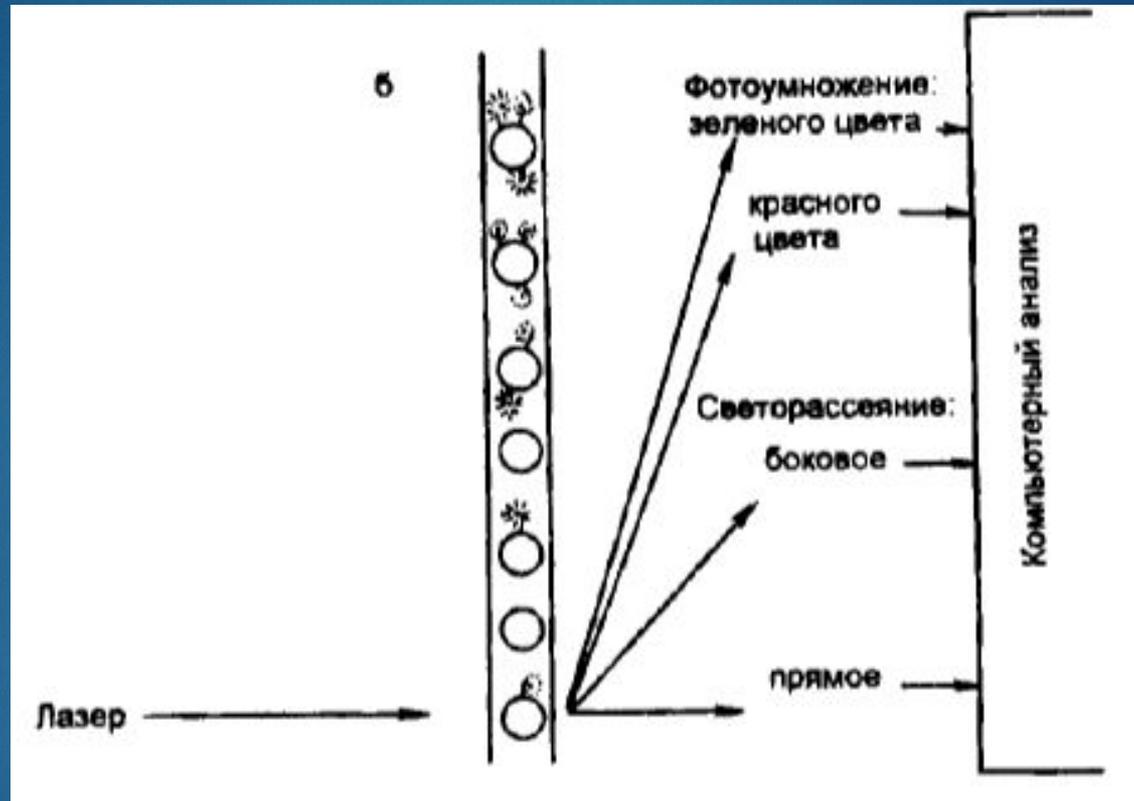
Принцип выделения мононуклеарных клеток



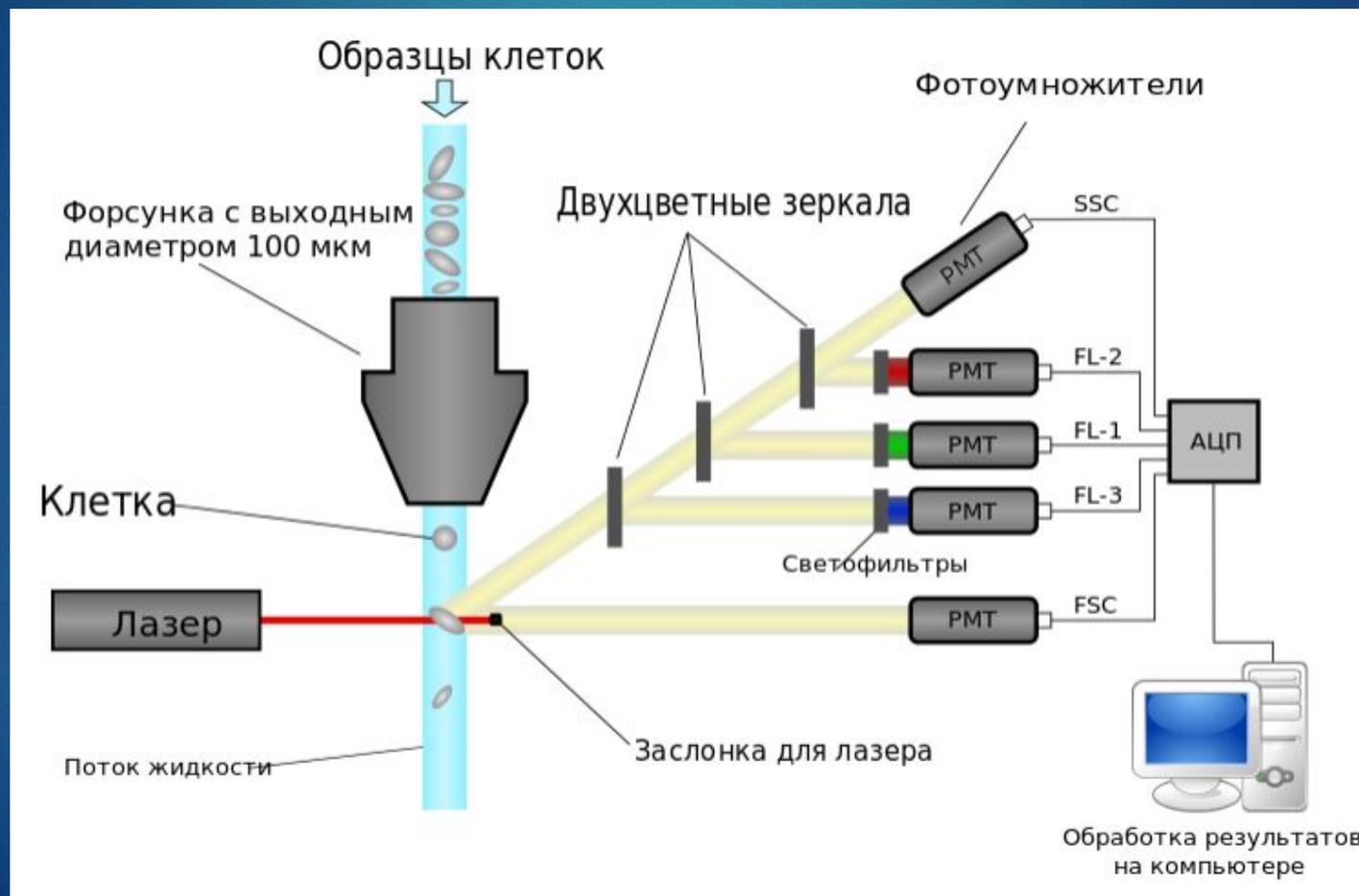
Цитофлюориметрический метод



Цитофлюориметрический метод

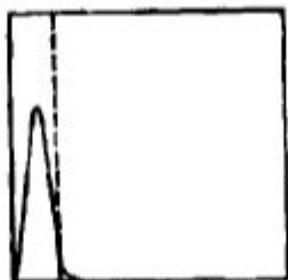


Цитофлюориметрический метод

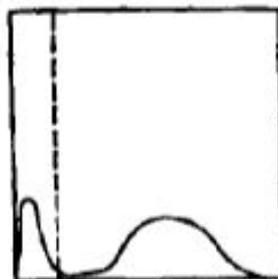


Цитофлюориметрический метод

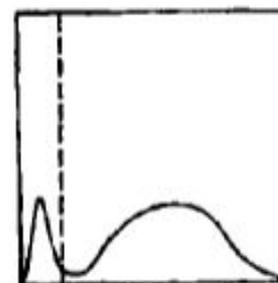
е



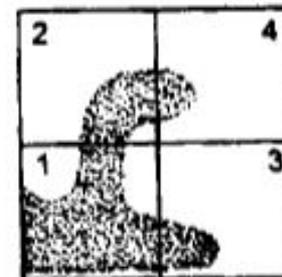
1. Контроль
Однопараметрический
анализ



2. Зеленое окрашивание
Однопараметрический
анализ



3. Красное окрашивание
Однопараметрический
анализ



4. Двухцветное окрашивание
Двупараметрический
анализ

Реакция агглютинации

- ▶ Реакция агглютинации (от лат. agglutinatio - склеивание) - склеивание корпускул (бактерий, эритроцитов и др.) антителами в присутствии электролитов - натрия хлорида.
- ▶ Прямая
- ▶ Непрямая



- ▶ Реакция агглютинации проявляется в виде хлопьев или осадка, состоящих из корпускул (например, бактерий), "склеенных" антителами.

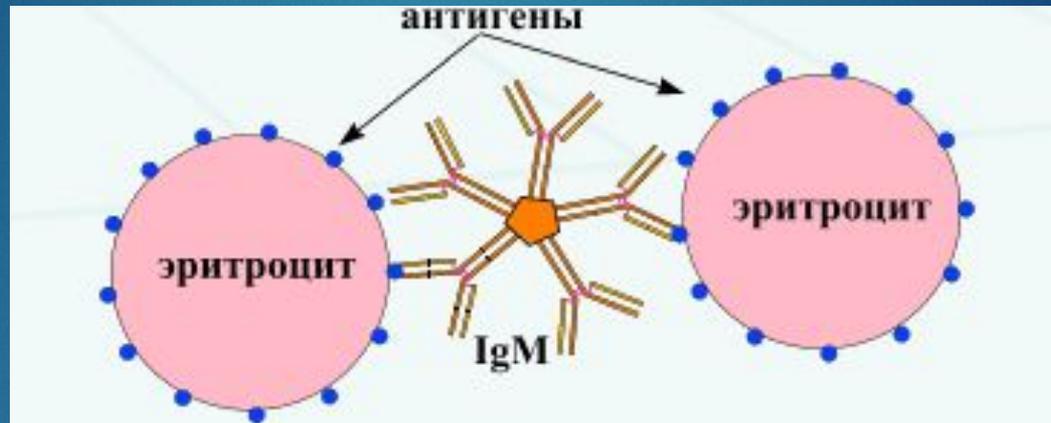
РА используют для:

- ▶ Определения возбудителя, выделенного от больного животного
- ▶ Определения антител в сыворотке крови больного животного

Реакция прямой агглютинации



Реакция непрямой агглютинации

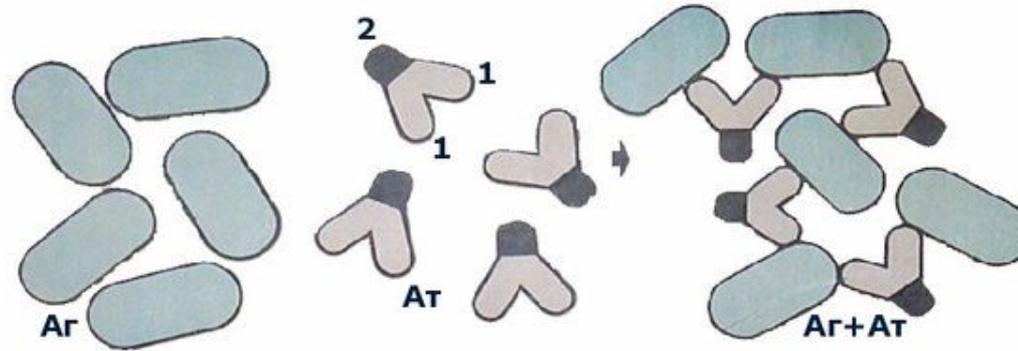


- ▶ Эритроциты (или частицы латекса) с адсорбированными на них антигенами взаимодействуют с соответствующими антителами сыворотки крови, что вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка.

При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде пуговки.

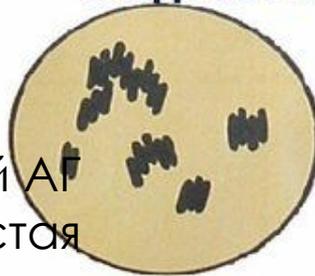
Реакция агглютинации

механизм реакции

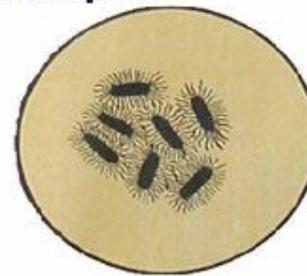


Виды агглютинации

О-агглютинация
Термостабильный АГ
(мелкозернистая
агглютинация)

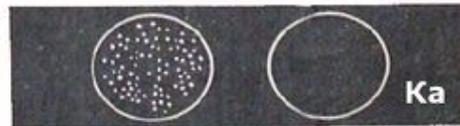


Н-агглютинация
Термолабильный АГ
(крупнохлопчатая
агглютинация,
протекает быстрее)

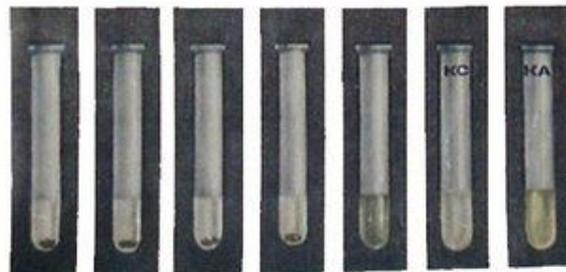


Способы постановки

На стекле



Развёрнутая реакция



Аг – антиген

Ат – антитело (1-FAВ-фрагмент, 2-Fc-фрагмент)

Аг+Ат – комплекс антиген+антитело

КА – контроль антигена

КС – контроль сыворотки

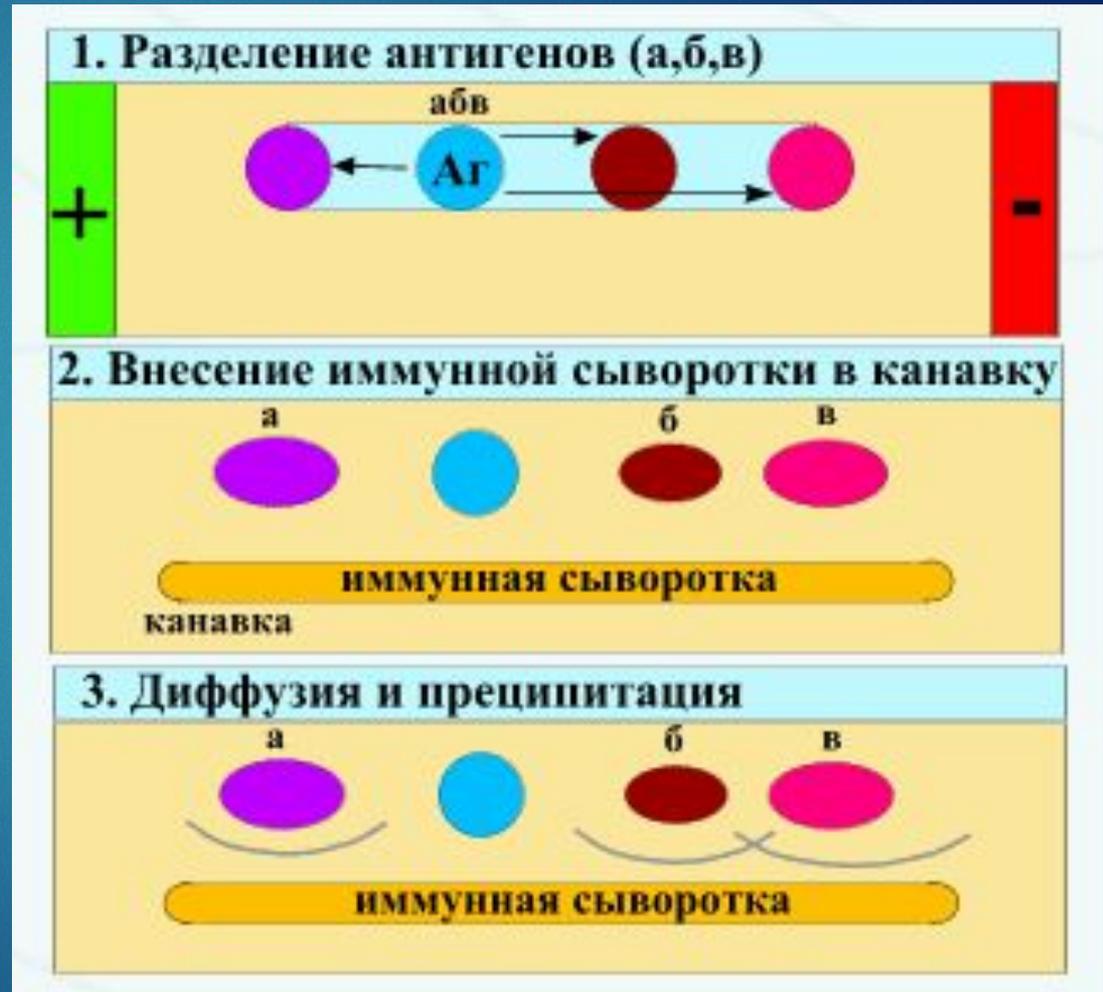
Реакция преципитации (РП)

- ▶ это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого преципитатом. Он образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах, избыток одного из них снижает уровень образования иммунного комплекса.



Иммуноэлектрофорез

- ▶ - сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации: смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза, затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой диффундируют в гель и образуют в месте "встречи" с антигеном линии преципитата



Реакция связывания комплемента (РСК)

- ▶ АГ+АТ комплекс
- ▶ К Fc-фрагментам антител присоединяется компонент (C),

2 фазы:

- ▶ 1-я фаза - инкубация смеси, содержащей антиген + антитело + комплемент,
- ▶ 2-я фаза (индикаторная) - выявление в смеси свободного компонента путем добавления к ней гемолитической системы.

Реакция связывания комплемента (РСК)

Схема РСК с сывороткой больного

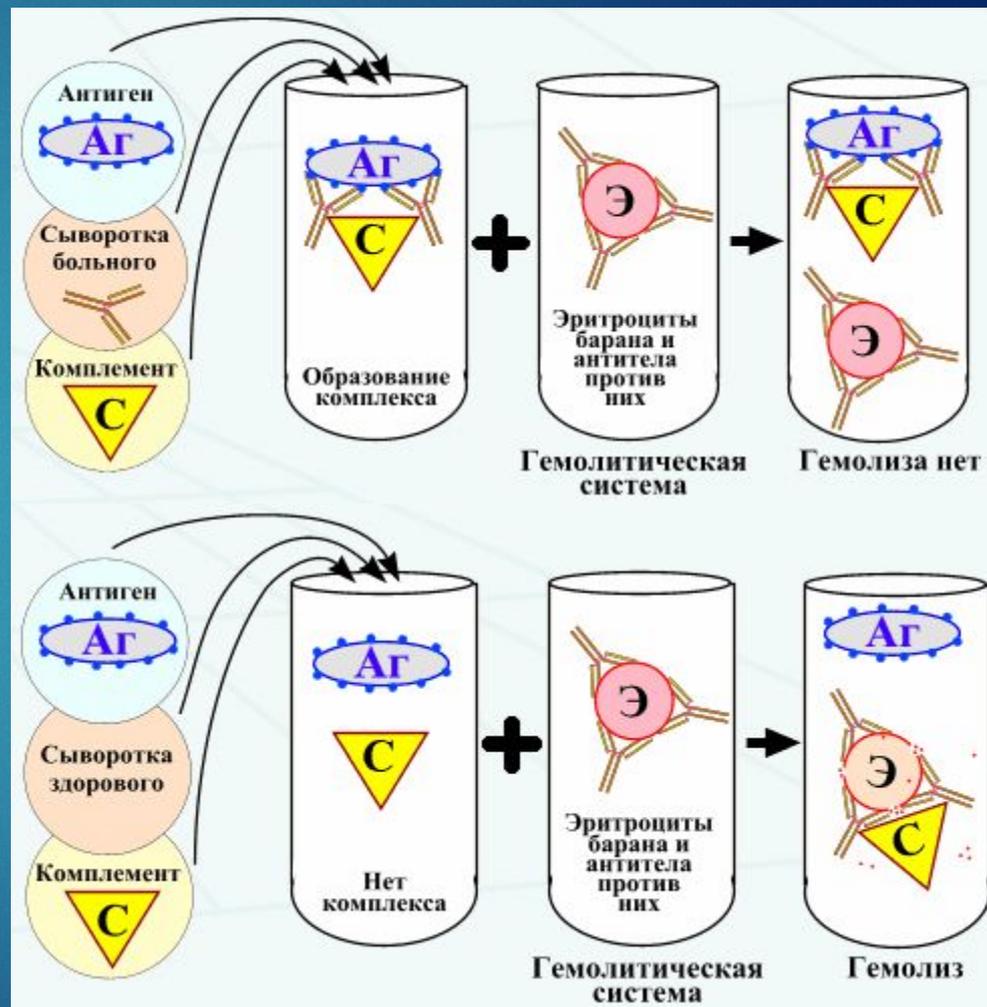
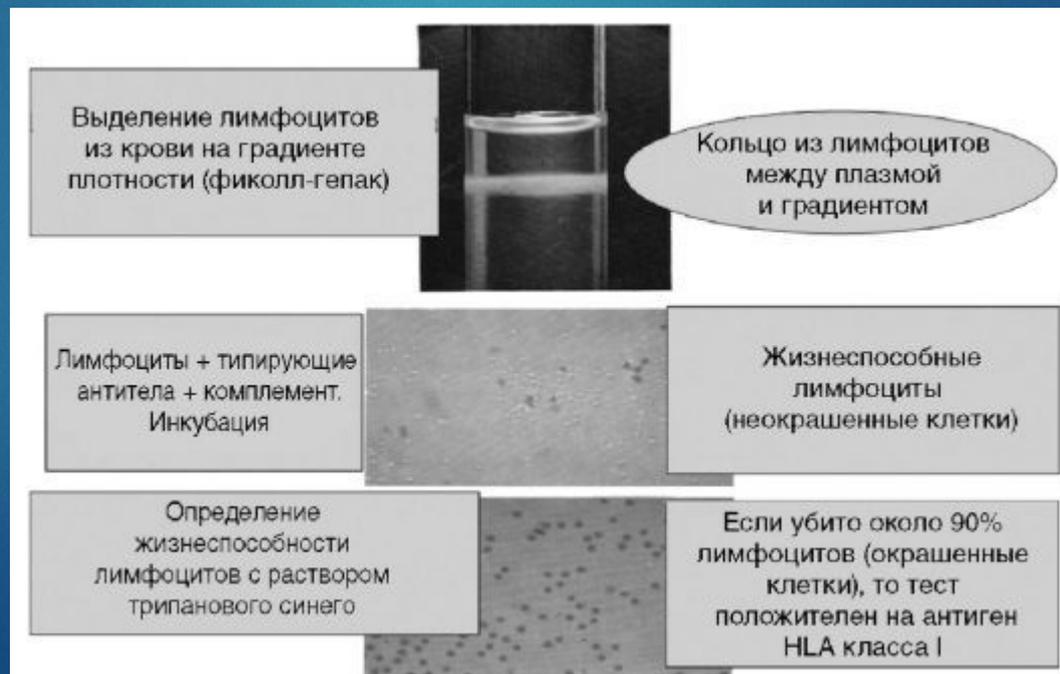


Схема РСК с сывороткой здорового

Цитотоксический тест

- ▶ метод оценки повреждающего действия на культивируемые клетки каких-либо факторов (физических, химических, биологических), заключающийся в подсчете доли погибших клеток после дозированного воздействия повреждающего фактора. (используется для количественного определения субпопуляции Т-лимфоцитов)



Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

- ▶ Различают три разновидности метода прямой, непрямой, с комплементом.

Прямой метод РИФ

- ▶ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, меченными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.



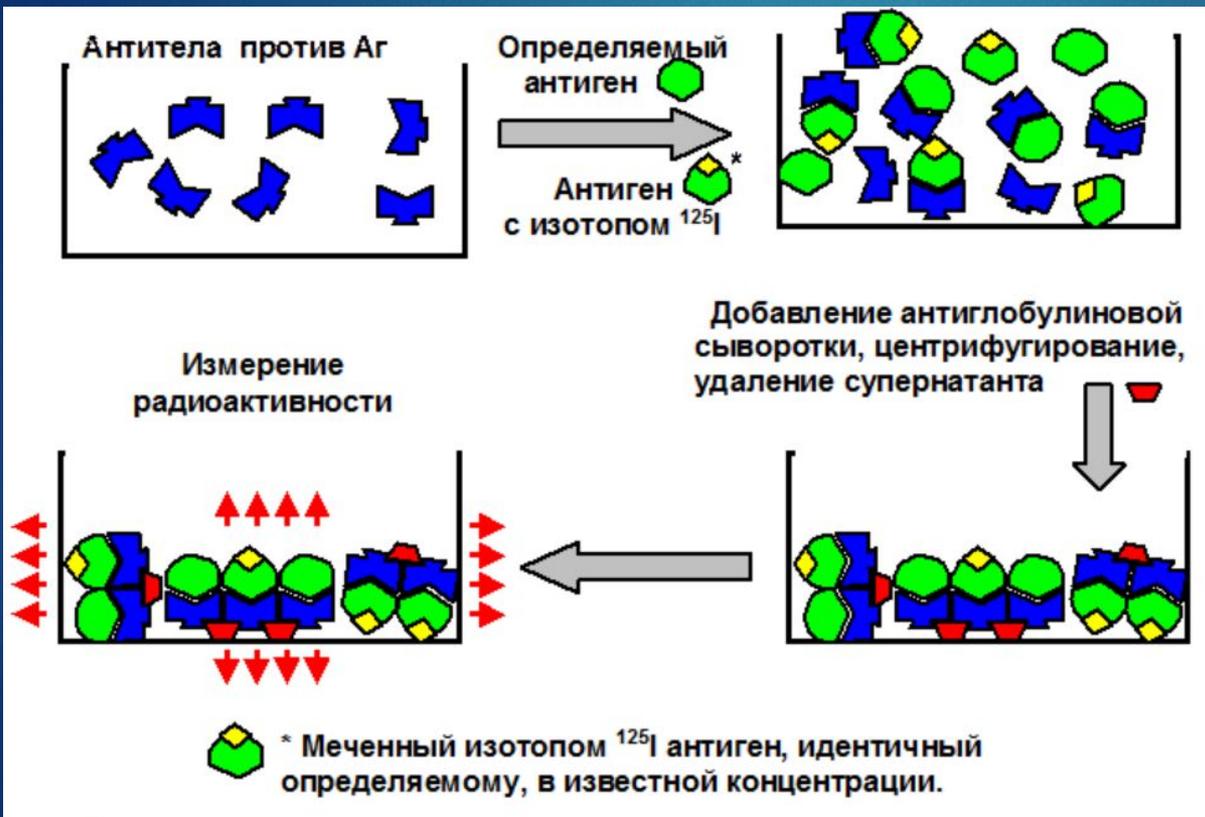
Непрямой метод РИФ



- ▶ заключается в выявлении комплекса антиген - антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченой флюорохромом.

В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.

Радиоиммунный метод, или анализ (РИА)

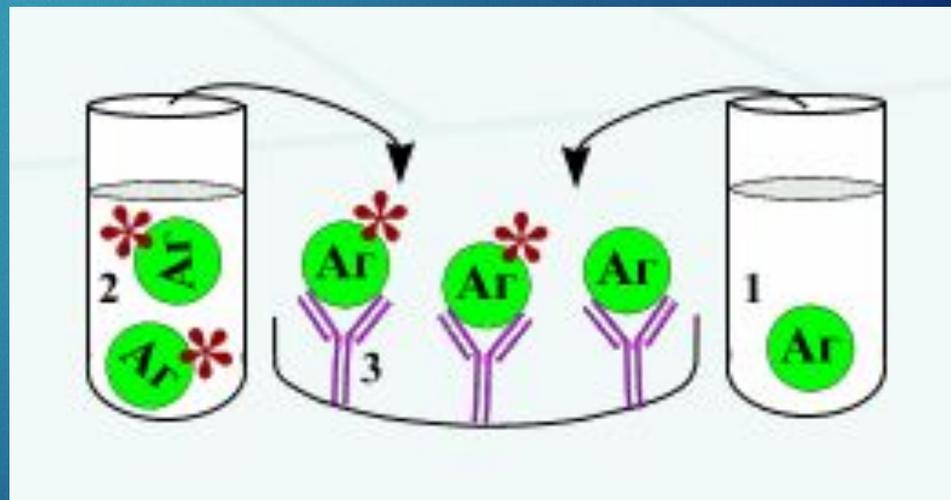


- ▶ высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген - антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом (^{125}I , ^{14}C , ^3H , ^{51}Cr и др.). После их взаимодействия отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (бета- или гамма-излучение). Интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

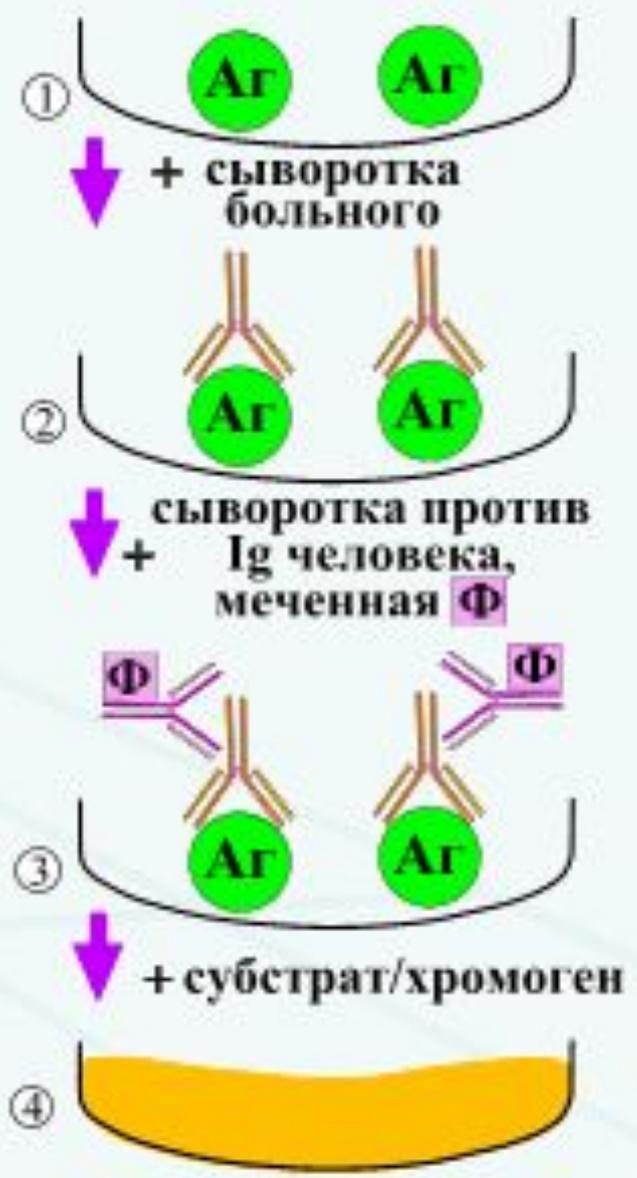
Иммуноферментный анализ (ИФА)

- ▶ выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой и или щелочной фосфатазой). 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

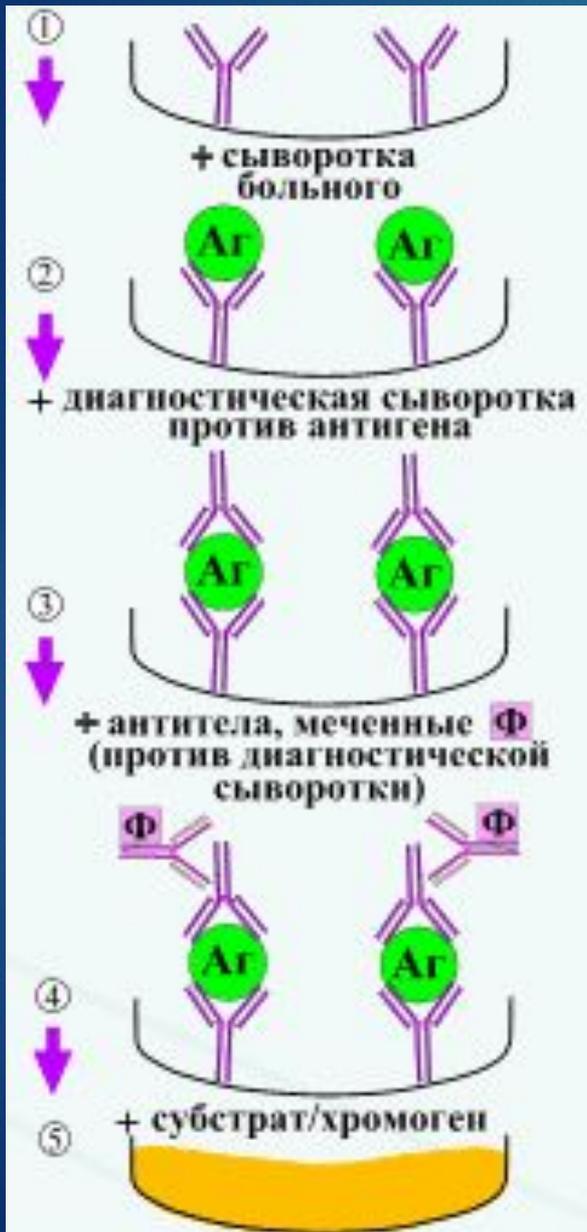
Конкурентный ИФА для определения антигенов: искомый антиген(1) и меченый ферментом антиген(2) конкурируют друг с другом за антитела (3), сорбированные на твердой фазе.



Определение антител в сыворотке больного (в лунках планшеток с сорбированным антигеном)

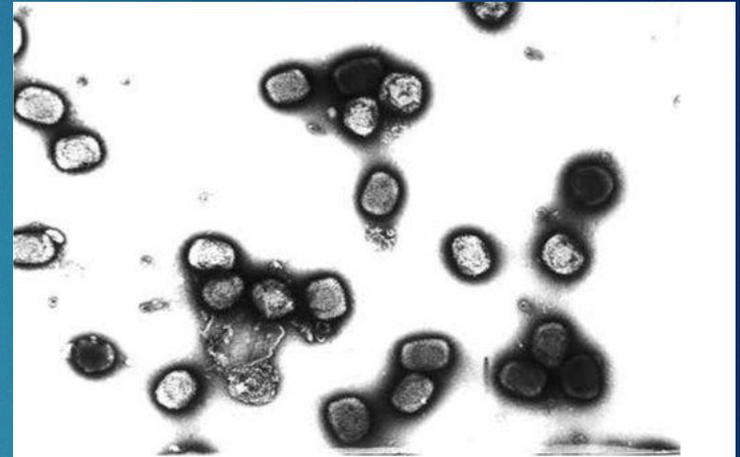


Определение антигена в сыворотке больного (в лунках планшетонок с сорбированными диагностическими антителами)



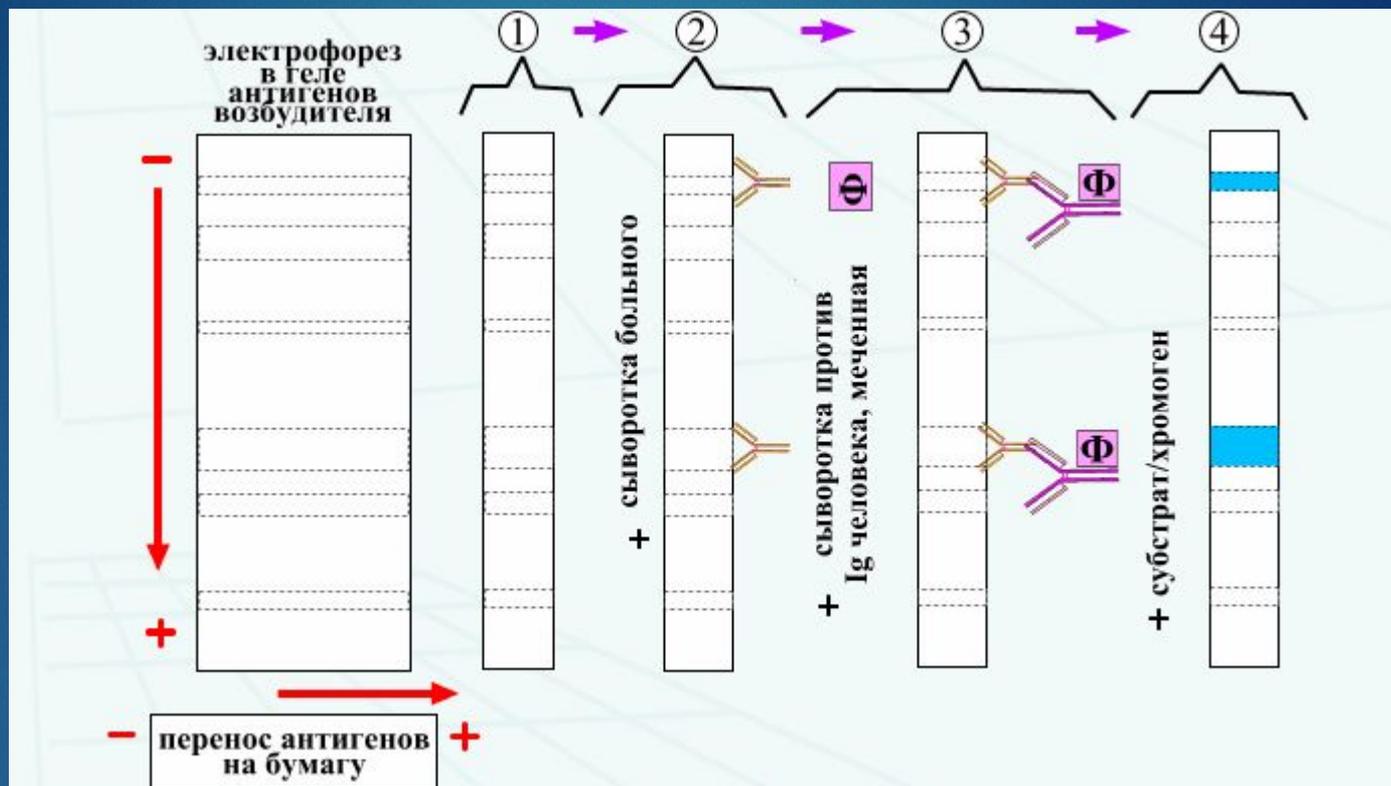
Иммунная электронная микроскопия (ИЭМ)

- ▶ - электронная микроскопия микробов, чаще вирусов, обработанных соответствующими антителами. Вирусы, обработанные иммунной сывороткой, образуют иммунные агрегаты (микропреципитаты). Вокруг вирионов образуется "венчик" из антител, контрастированный фосфорно-вольфрамовой кислотой или другими электроннооптически плотными препаратами.



Вирус оспы.
Иммуноэлектронная
микроскопия. Негативное
контрастирование.

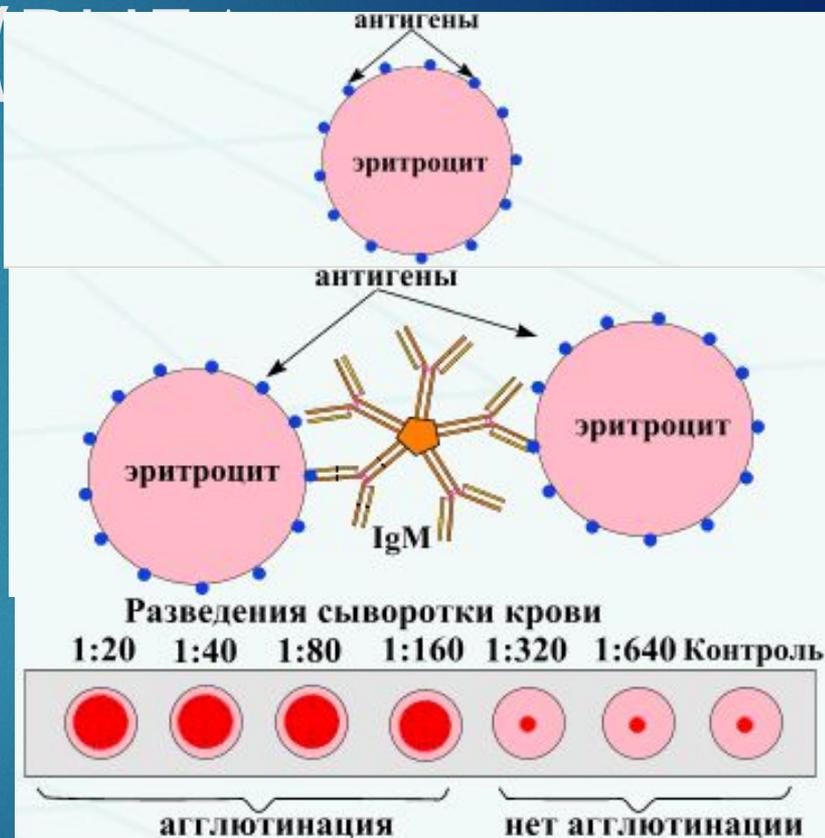
Иммуноблоттинг (ИБ)



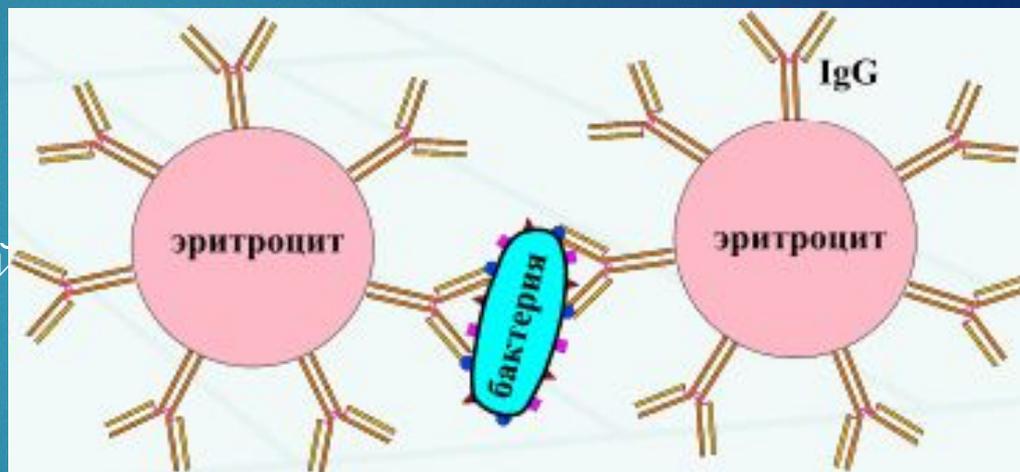
Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РПГА)

Антигенный эритроцитарный
диагностикум

Реакция непрямой (пассивной)
агглютинации



Реакция обратной непрямой
гемагглютинации



Реакция нейтрализации (РН)

Реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток:

А - цитопатогенный эффект (ЦПЭ) в результате размножения вирусов;
Б - ЦПЭ отсутствует в результате нейтрализации вирусов антителами.

