

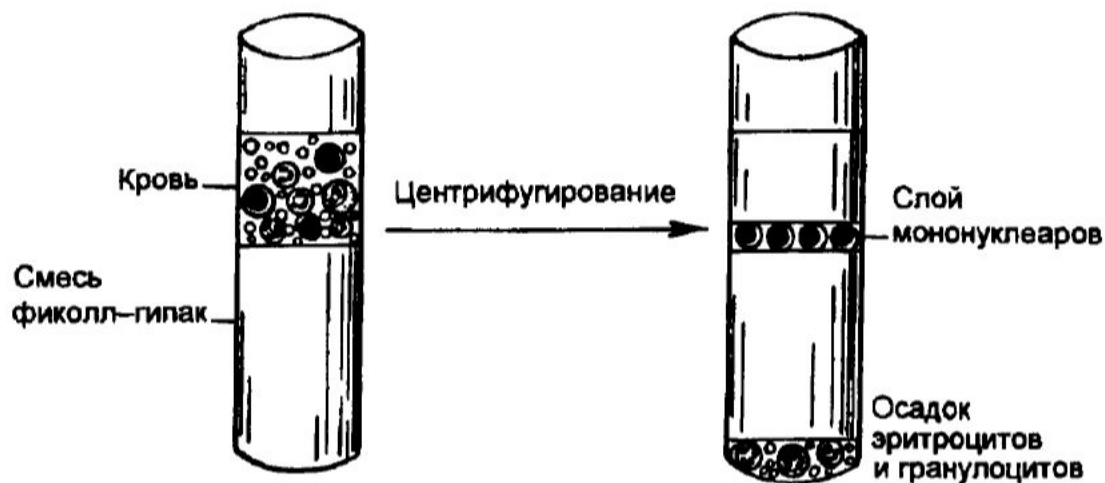
# Иммунодиагностика

# Клинико-иммунологические исследования делят:

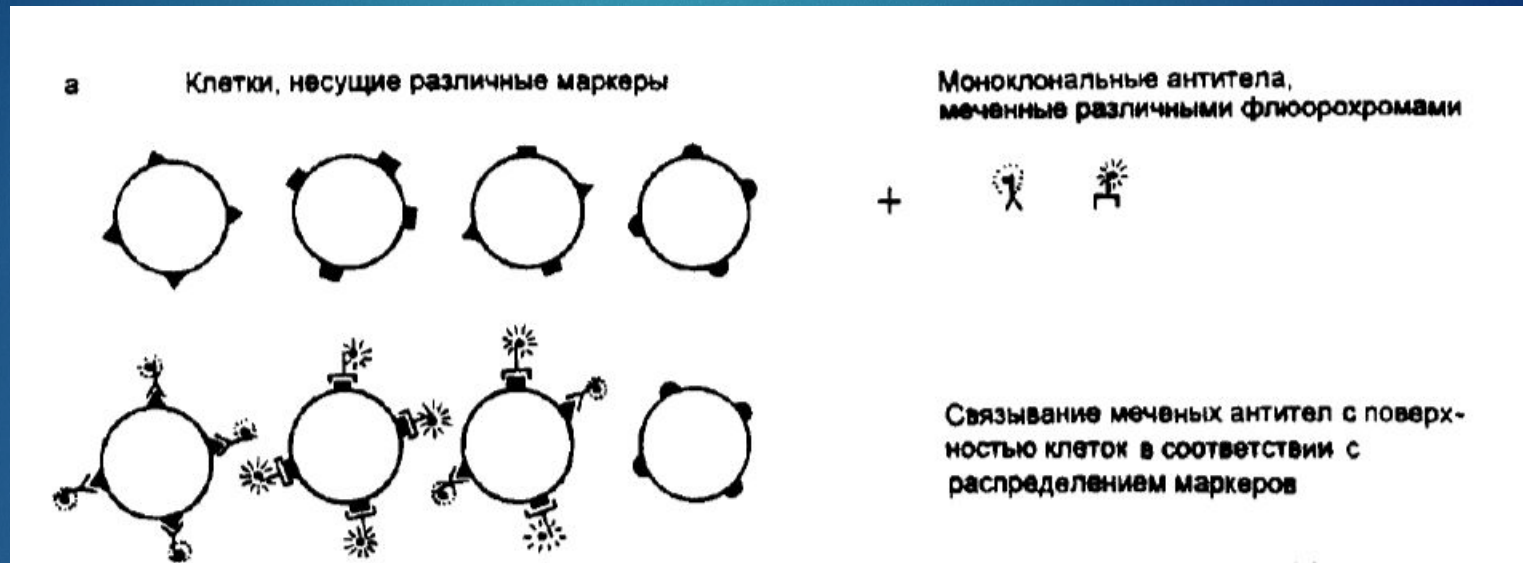
- ▶ Методы оценки клеточного иммунитета
- ▶ Методы оценки гуморального иммунитета

Основные объекты анализа: кровь или сыворотка.

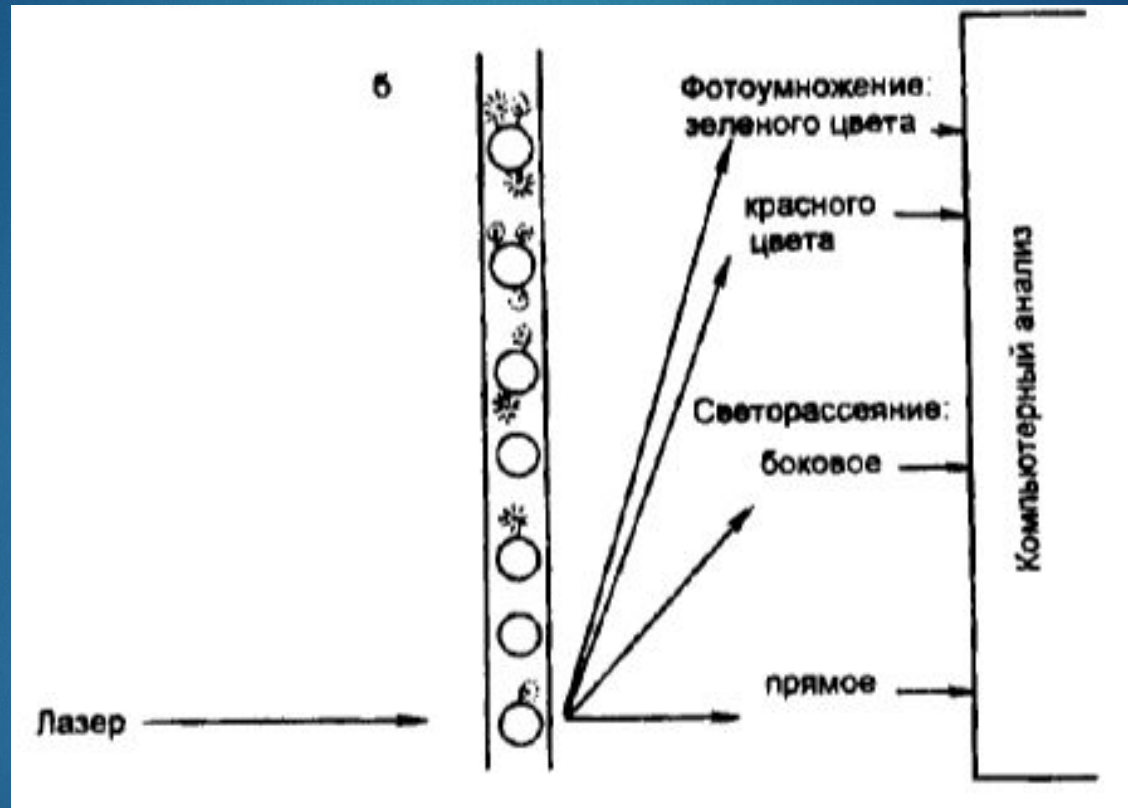
# Принцип выделения мононуклеарных клеток



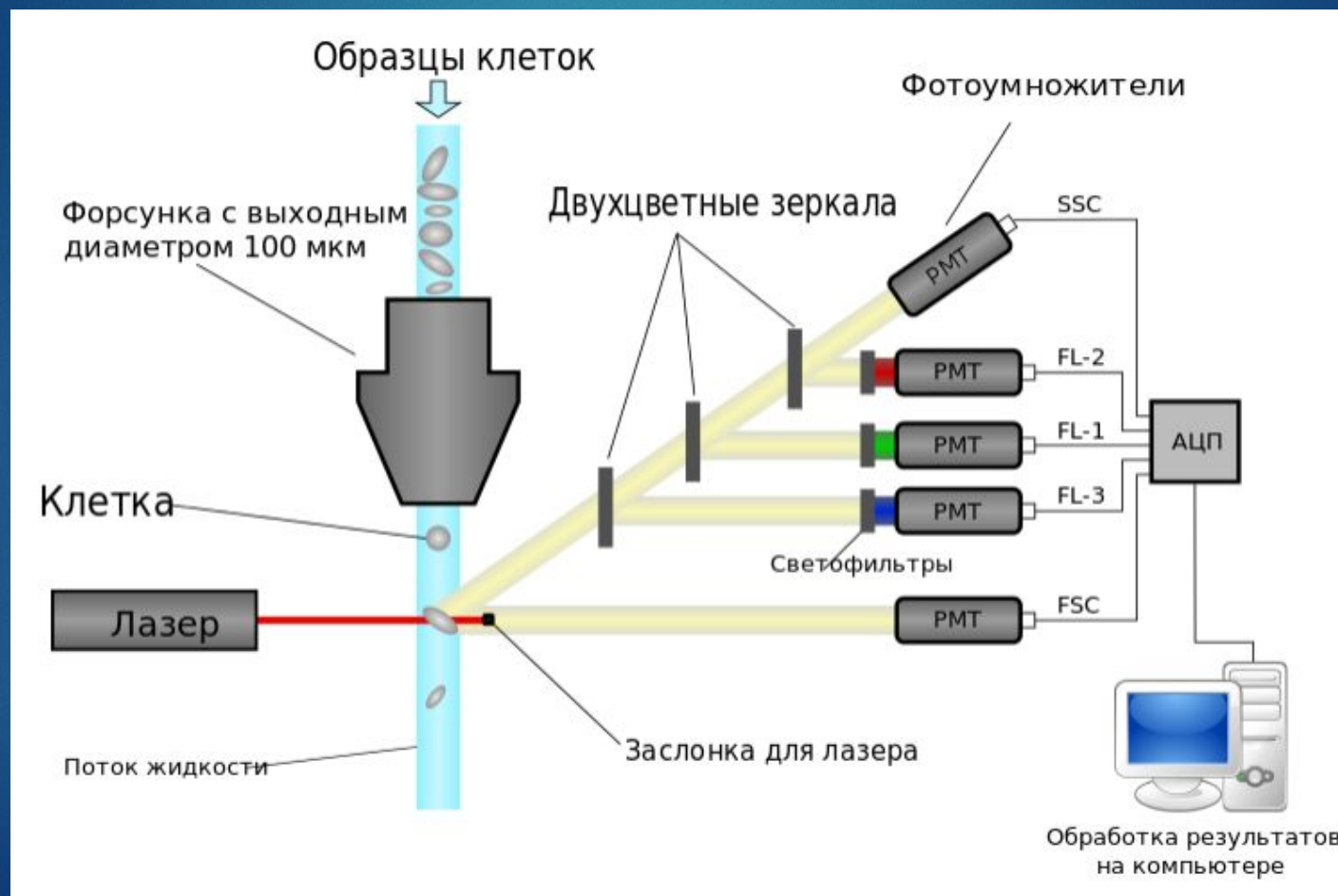
# Цитофлюориметрический метод



# Цитофлюориметрический метод

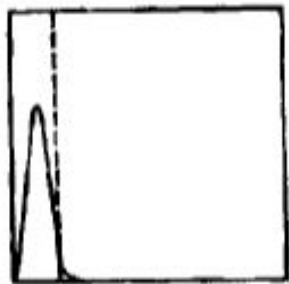


# Цитофлюориметрический метод

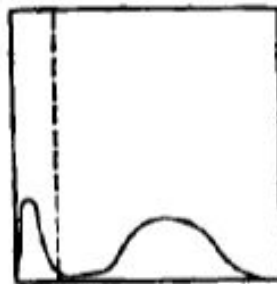


# Цитофлюориметрический метод

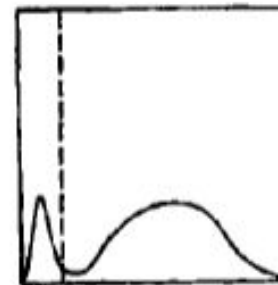
в



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.

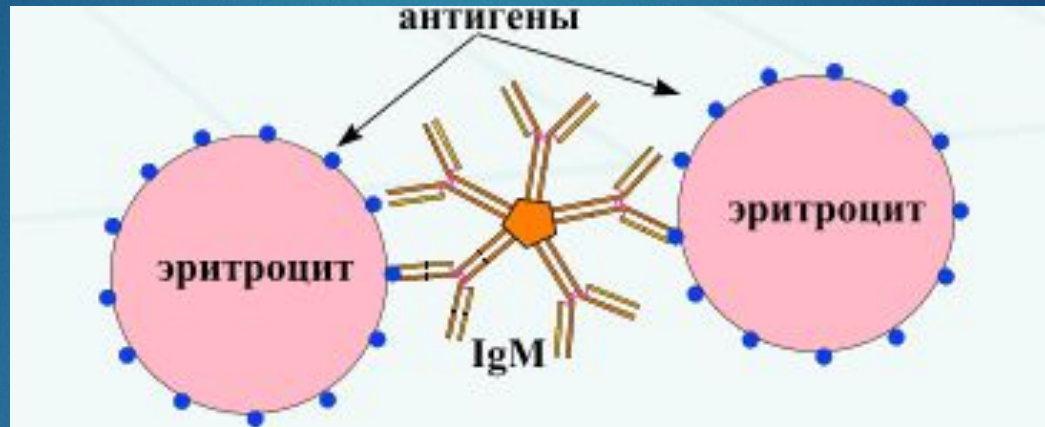
РА используют для:

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

# Реакция прямой агглютинации



# Реакция непрямой агглютинации

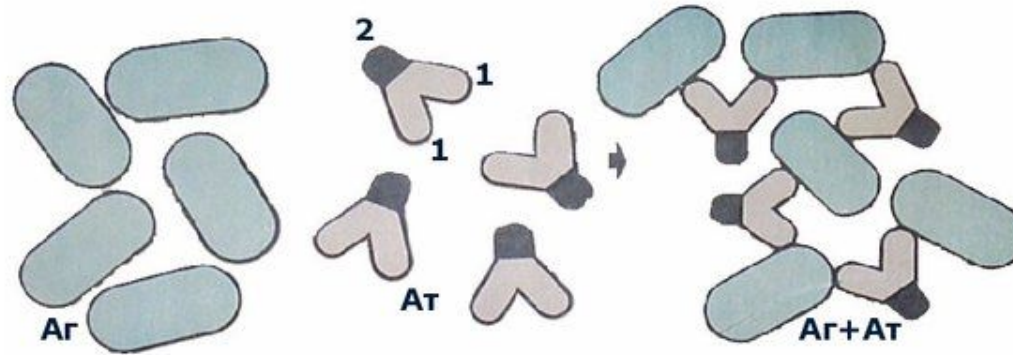


- ▶ Эритроциты (или частицы латекса) с адсорбированными на них антигенами взаимодействуют с соответствующими антителами сыворотки крови, что вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка.

При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде пуговки.

# Реакция агглютинации

## механизм реакции

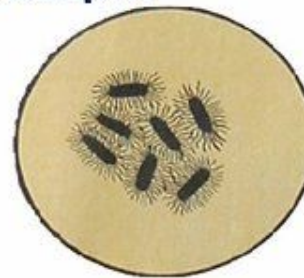


## Виды агглютинации

**О-агглютинация**  
Термостабильный АГ  
(мелкозернистая  
агглютинация)

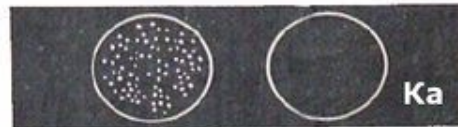


**Н-агглютинация**  
Термолабильный АГ  
(крупнохлопчатая  
агглютинация,  
протекает быстрее)

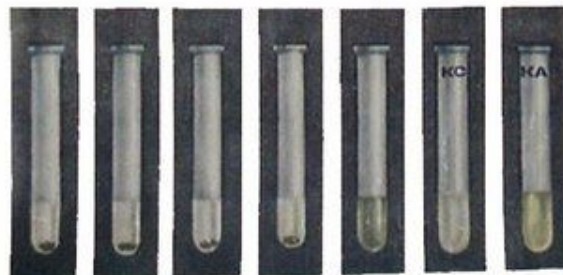


## Способы постановки

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

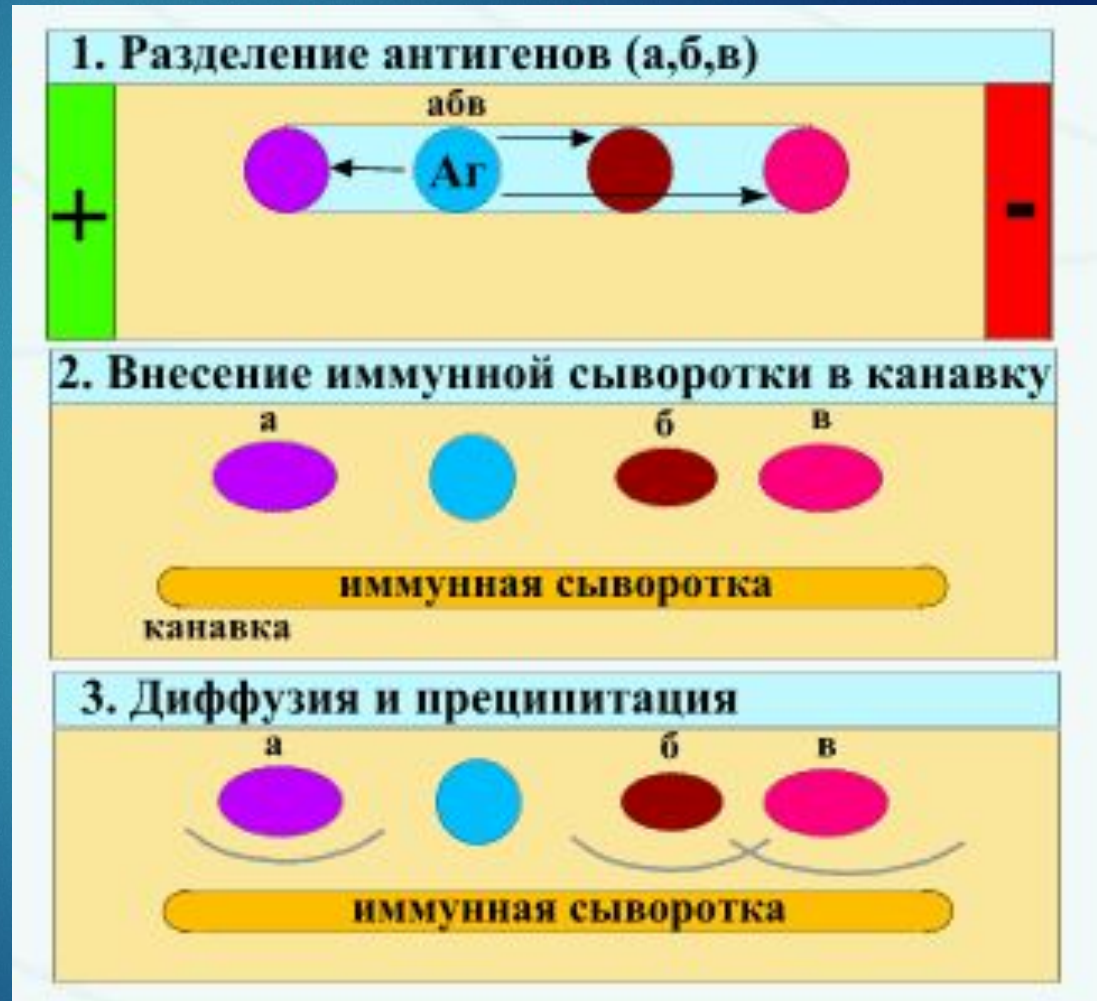
# Реакция преципитации (РП)

- ▶ 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 комплемент (С),

## 2 фазы:

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

# Реакция связывания комплемента (РСК)

Схема РСК с сывороткой больного

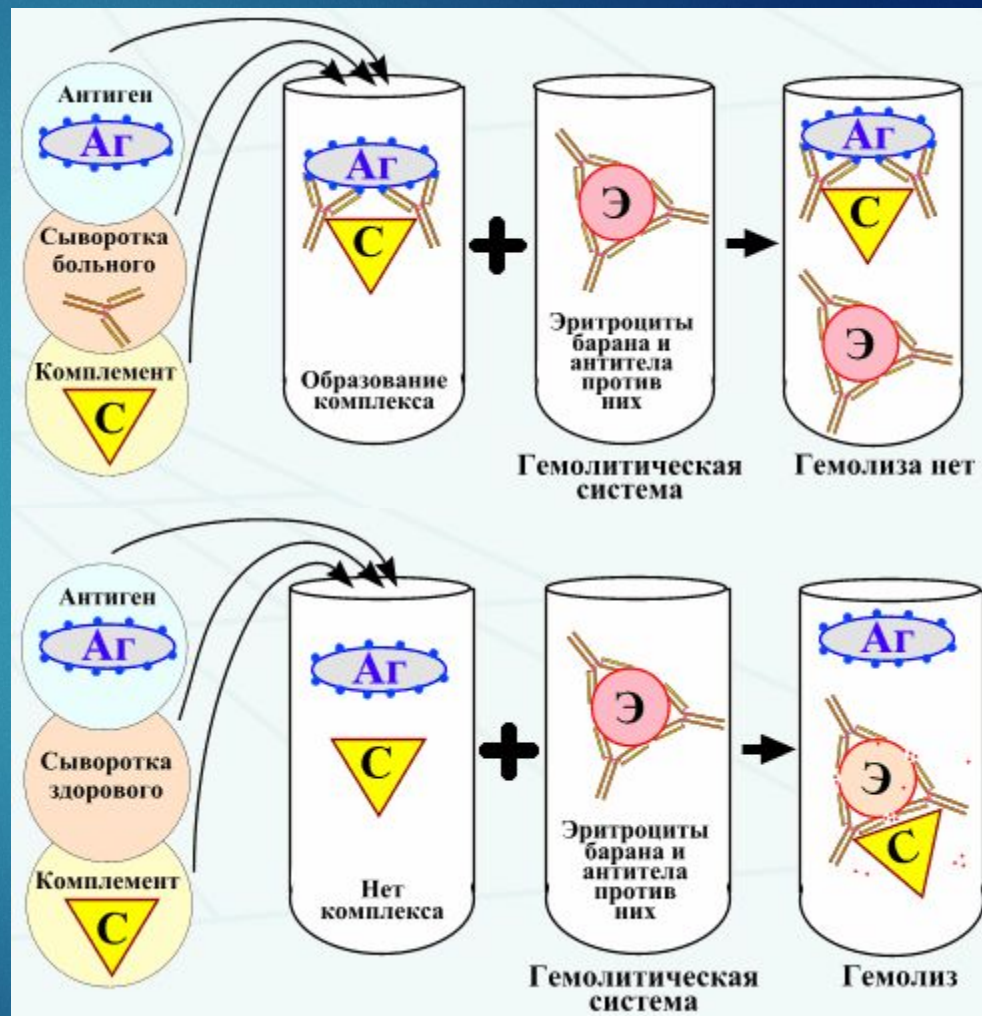
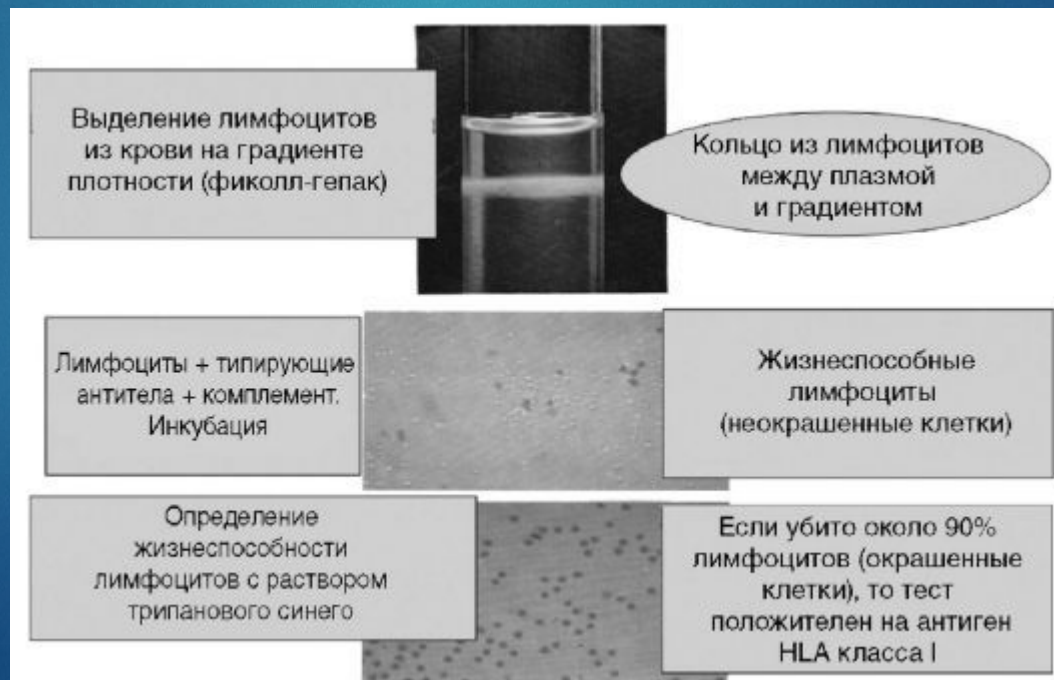


Схема РСК с сывороткой здорового



# 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.



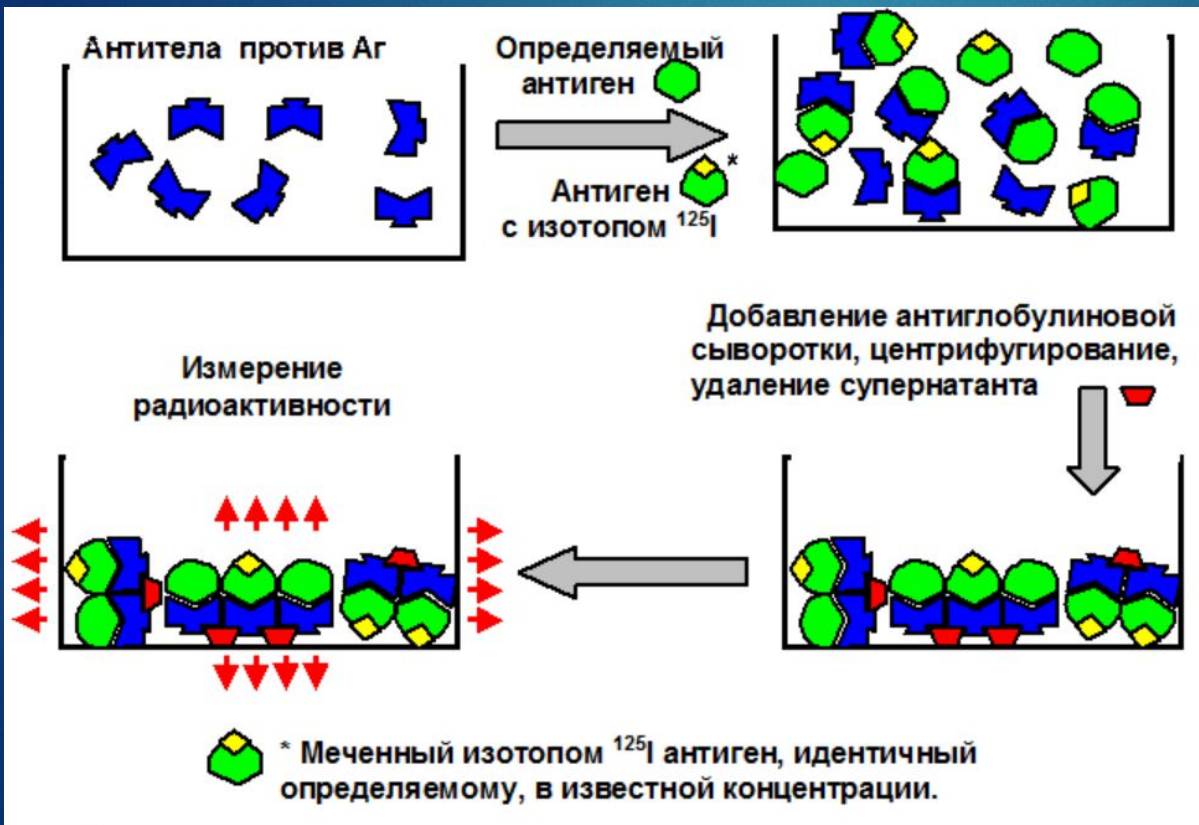
# Непрямой метод РИФ



- ▶ 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)

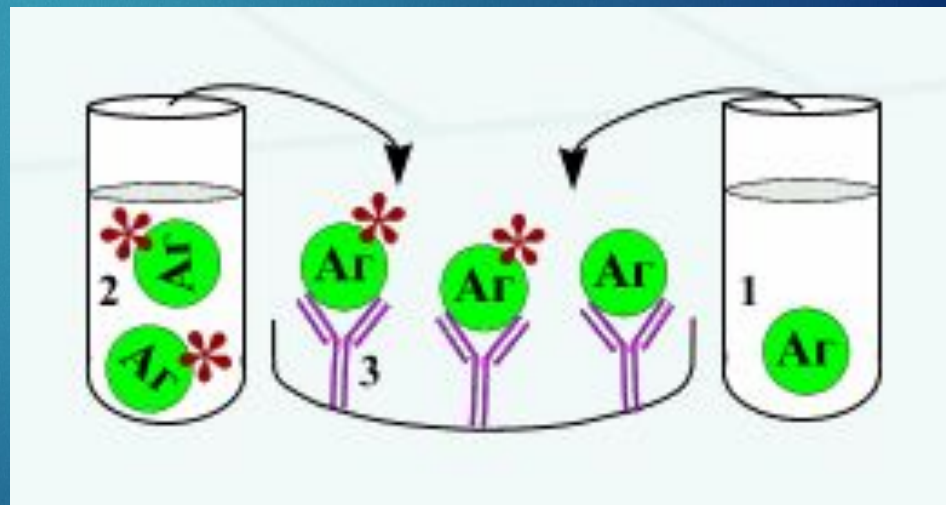


- ▶ высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген - антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  и др.). После их взаимодействия отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют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

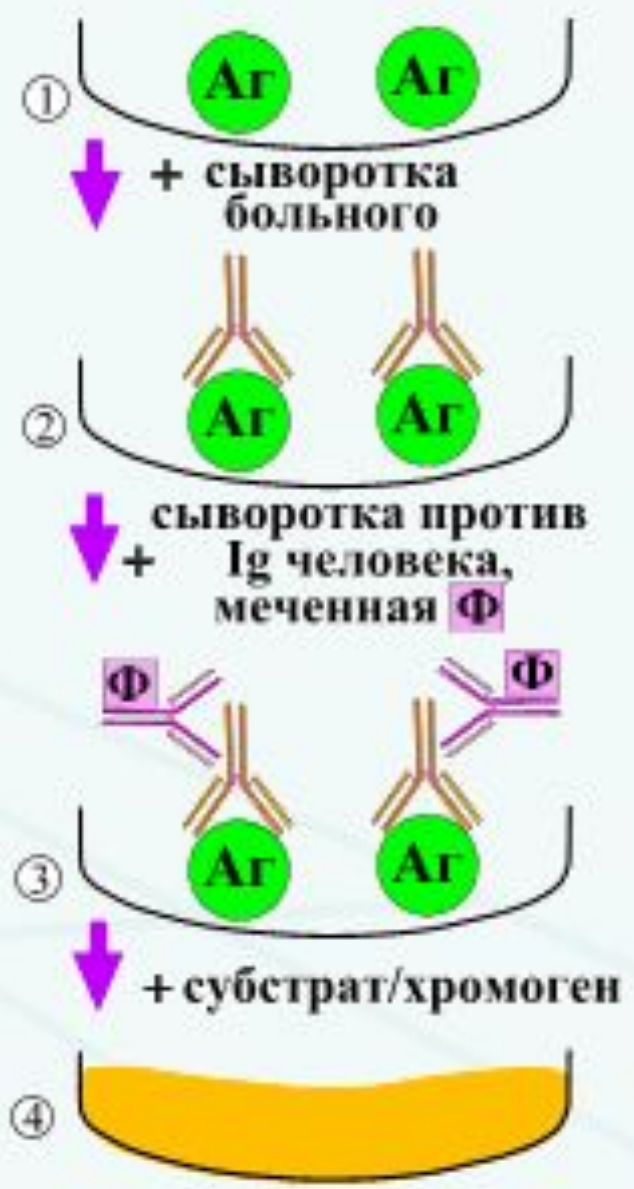
# Иммуноферментный анализ (ИФА)

- ▶ 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

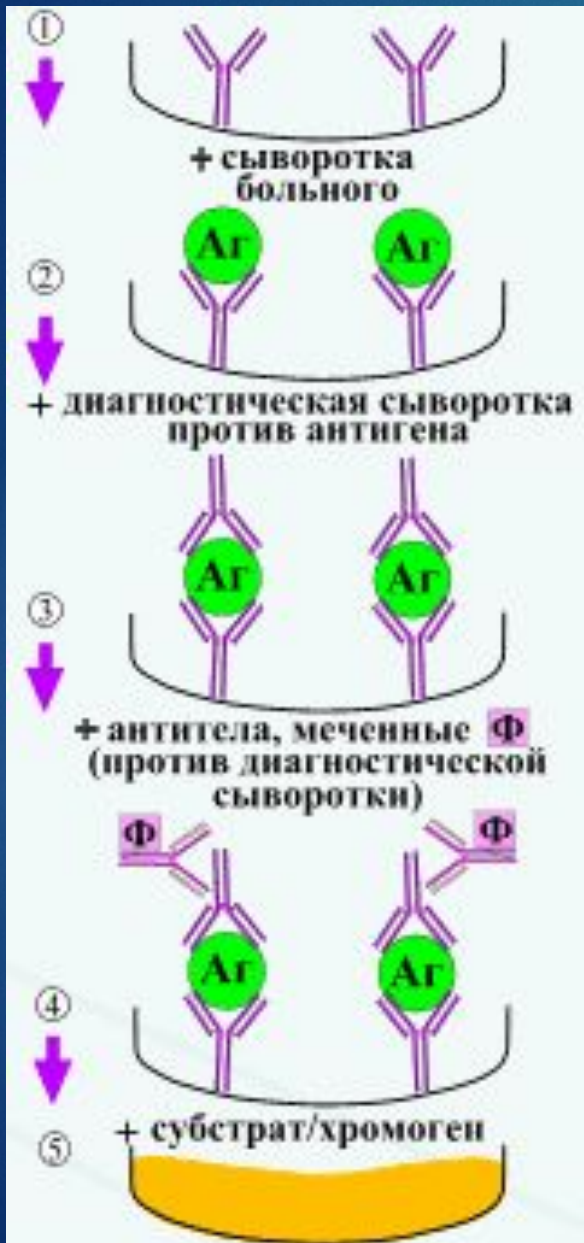
Конкурентный ИФА для определения антигенов: искомый антиген(1) и меченый ферментом антиген(2) конкурируют друг с другом за антитела (3), сорбированные на твердой фазе.



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



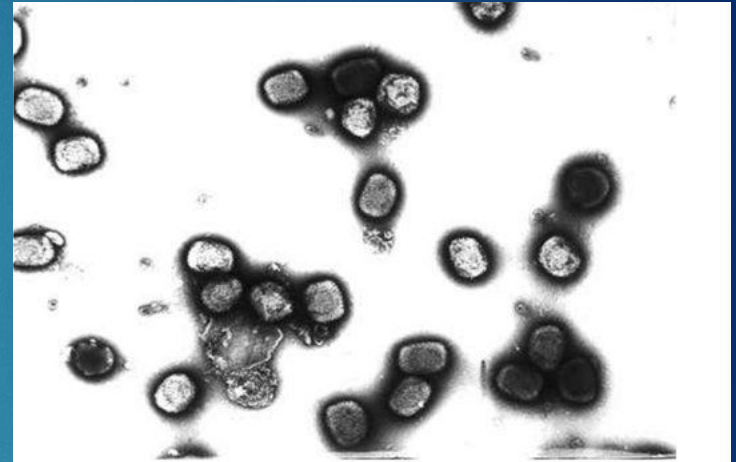
Определение антигена в сыворотке больного (в лунках планшетонок с сорбированными диагностическими антителами)





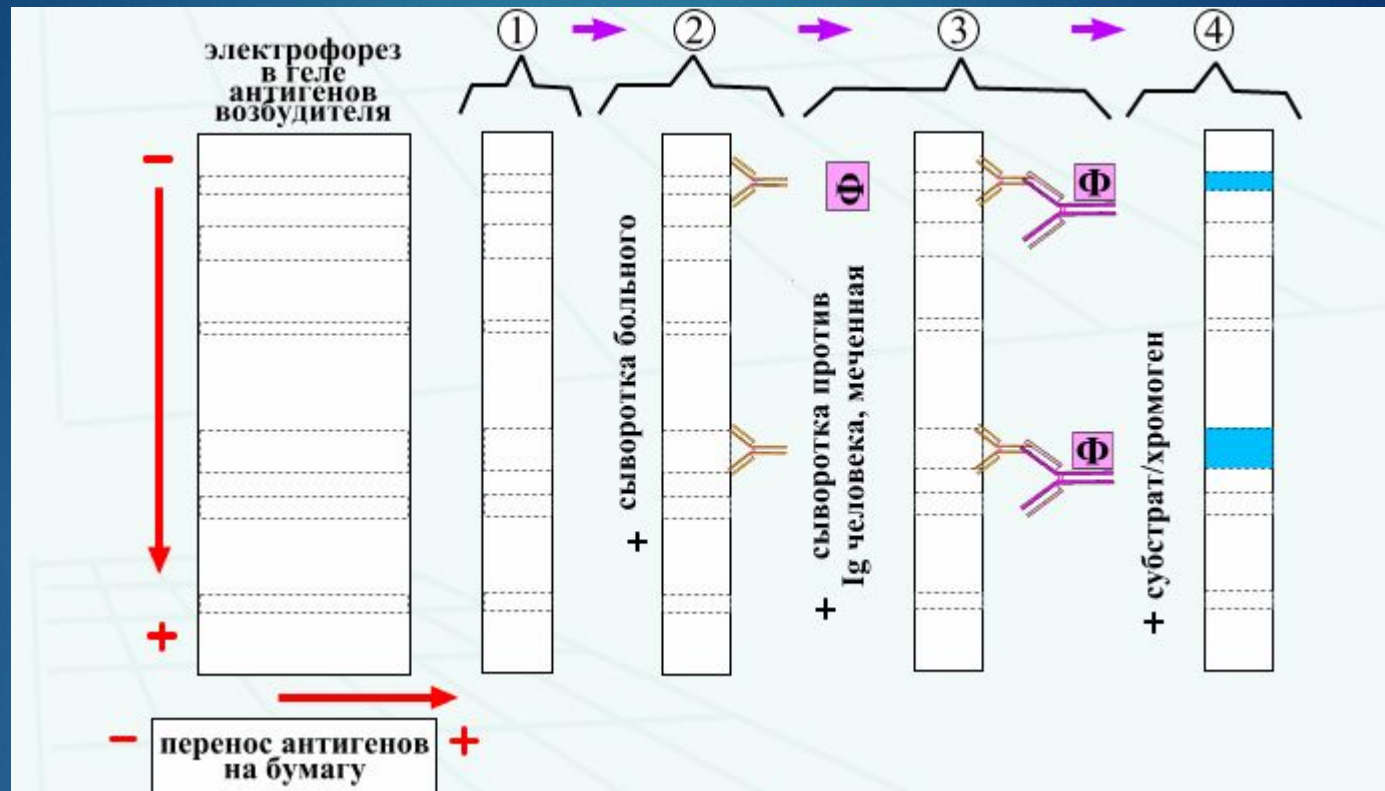
# Иммунная электронная микроскопия (ИЭМ)

- ▶ - 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.

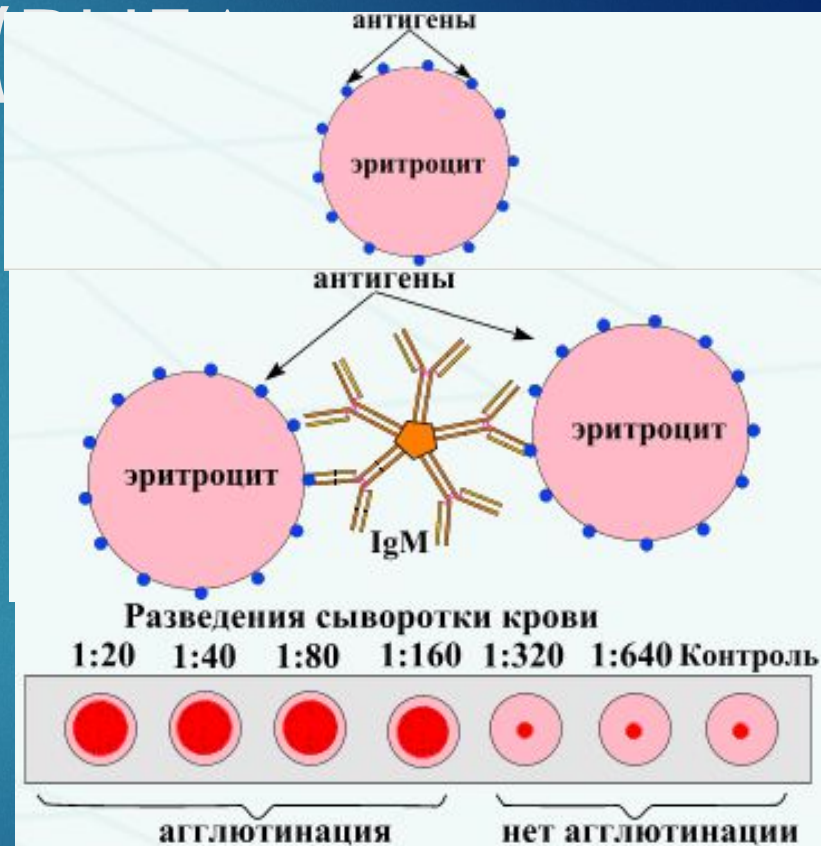
# Иммуноблоттинг (ИБ)



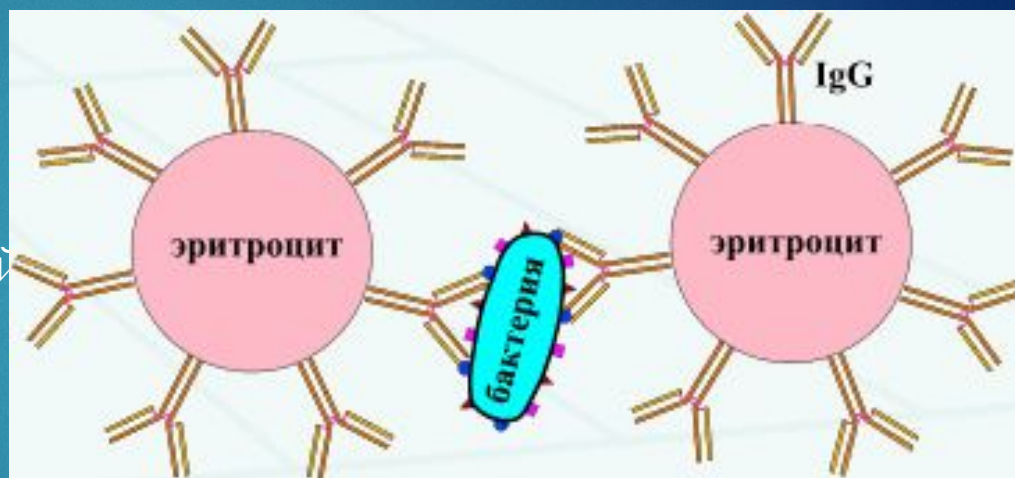
# Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РПГА)

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.

