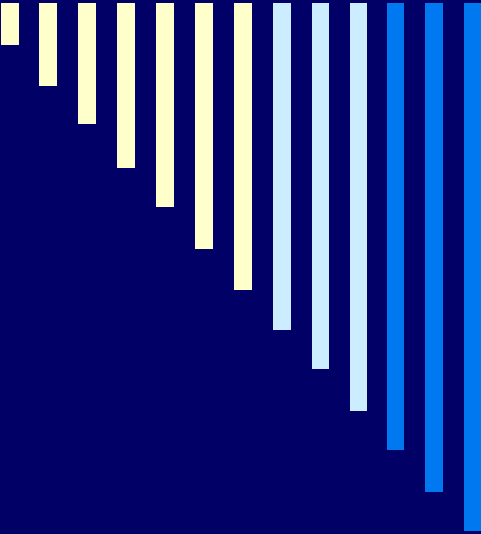


---



**Антигены и антитела.  
Серологический метод  
лабораторной  
диагностики**

---



---

## *Серологический метод*

- выявления специфических  
антител и антигенов возбудителя.

Для постановки реакций используют  
сыворотку (serum), содержащую  
антитела.

---

---



# АНТИГЕН

- это биополимер органической природы, генетически чужеродный для макроорганизма, который при попадании в последний распознается его иммунной системой и вызывает иммунные реакции, направленные на его устранение
-



# Свойства антигенов

- **Антигенность** (эпитоп) – активация иммунной системы и взаимодействие с Ат
  - **Специфичность** – способность индуцировать иммунный ответ к строго определенному биотопу (поликлональный иммунный ответ)
  - **Иммуногенность** – способность вызывать в организме к себе специфическую защитную реакцию
  - **Жесткость конфигурации**
  - **Высокомолекулярность**
-



# Классификация антигенов

- **По происхождению** – экзогенные и эндогенные
- **По химической природе** – белковые и небелковые (полисахариды, липиды, НК, ЛПС)
- **По молекулярной структуре** – глобулярные и фибриллярные
- **По степени иммуногенности** – полноценные и неполноценные (гаптены и полугаптены)
- **По степени чужеродности** – гетеро-(видовые), алло-(групповые), изоантигены (индивидуальные)
- **По направленности** активации и обеспеченности иммунного реагирования – иммуногены (Т-зависимые и Т-независимые), толерогены и аллергены.
- **Суперантигены** (St. энтеротоксин, вирус Э-Б, бешенства, ВИЧ и др.)

# Строение антигена

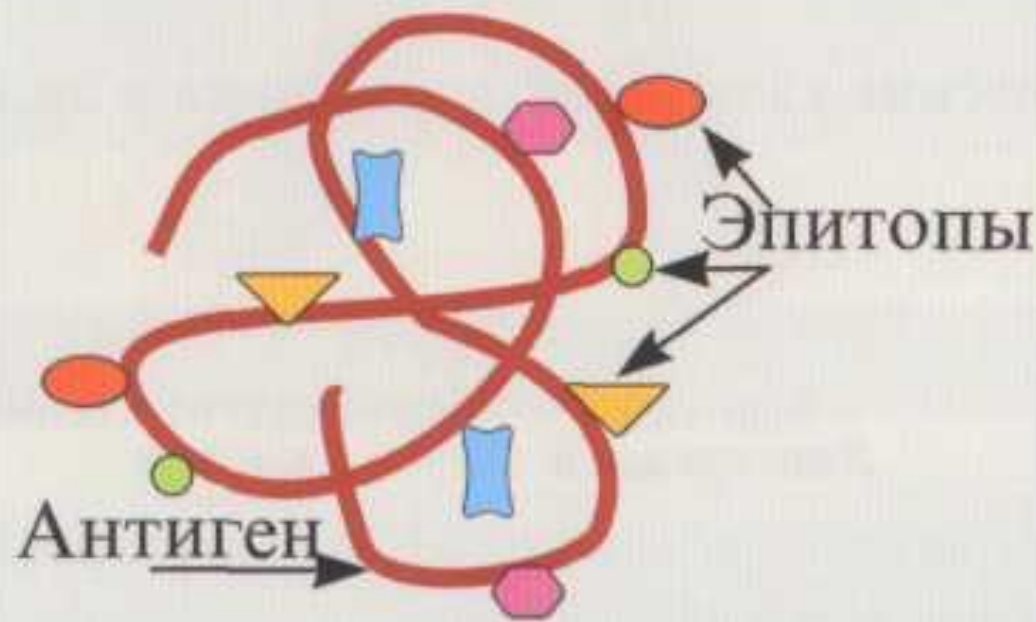
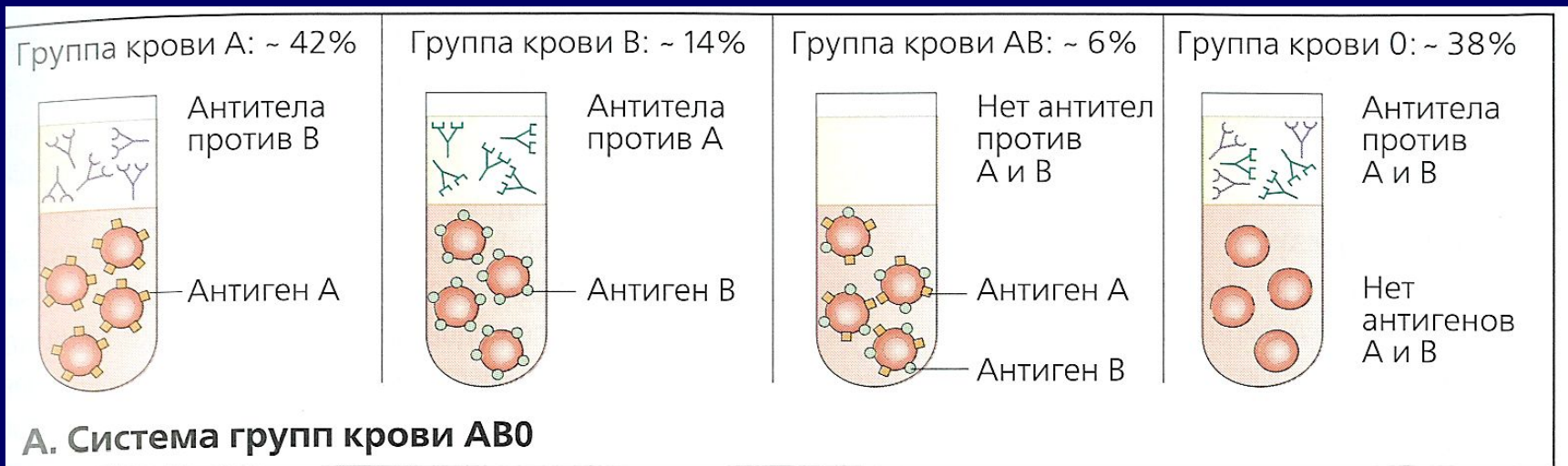


Рис. 7.3. Эпитопы антигена: антиген содержит несколько различных или повторяющихся эпитопов

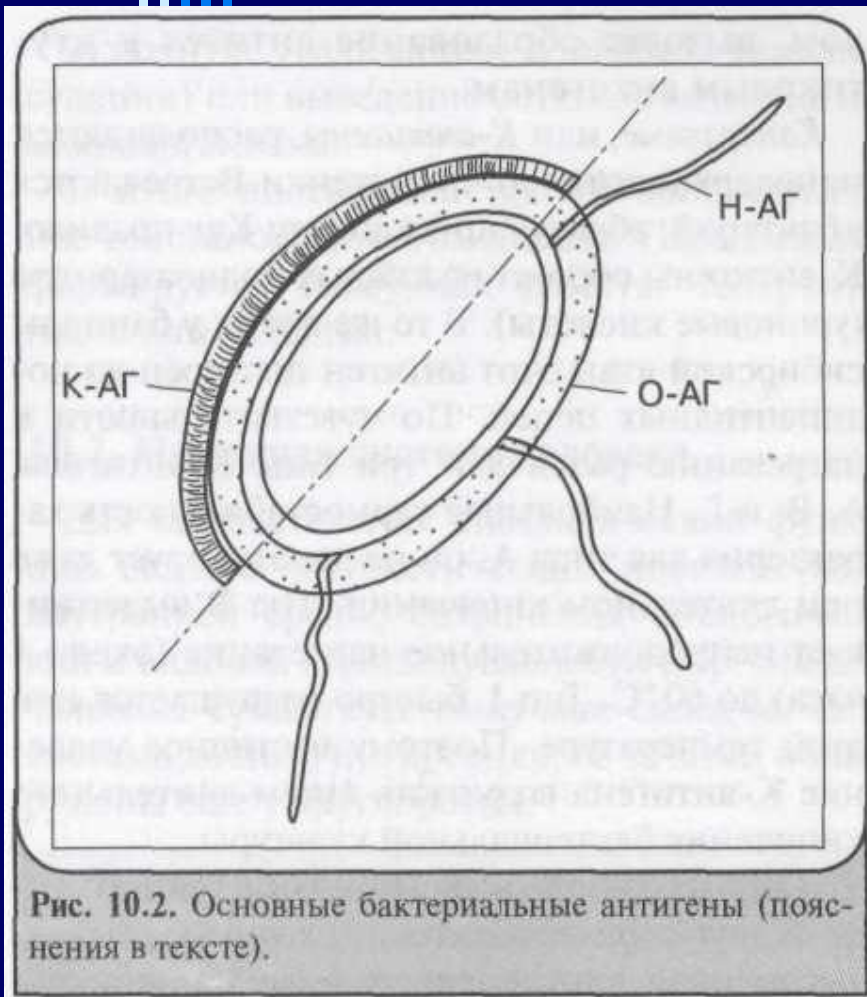
# АНТИГЕНЫ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

1. **АГ групп крови** – система АВО (гены расположены в 9 хромосоме)
  - 0 (I), А (II), В (III), АВ (IV)



2. **Rh – фактор** (полисахарид в строме эритроцитов) – 1 хромосома
  - Rh+
  - Rh-
3. **Антигены гистосовместимости** (система HLA, MHC) – 6 хромосома
  - 1 класс ( локусы А, В, С) определяют индивидуальность
  - 2 класс (локус Д) формируют иммунный ответ

# Антигены бактерий



- К - антиген
- Н - антиген
- L, В, Vi - антигены
- А, М – антигены
- О - антиген
- Экзотоксины





# АНТИГЕНЫ ВИРУСОВ

- **S – антиген (нуклеокапсид)**
    - Коровые или ядерные
    - Капсидные
  - **V - антигены (поверхностные)**
    - H – гемагглютинин
    - N – нейраминидаза (экзофермент)
  - **Суперкапсидные**
-

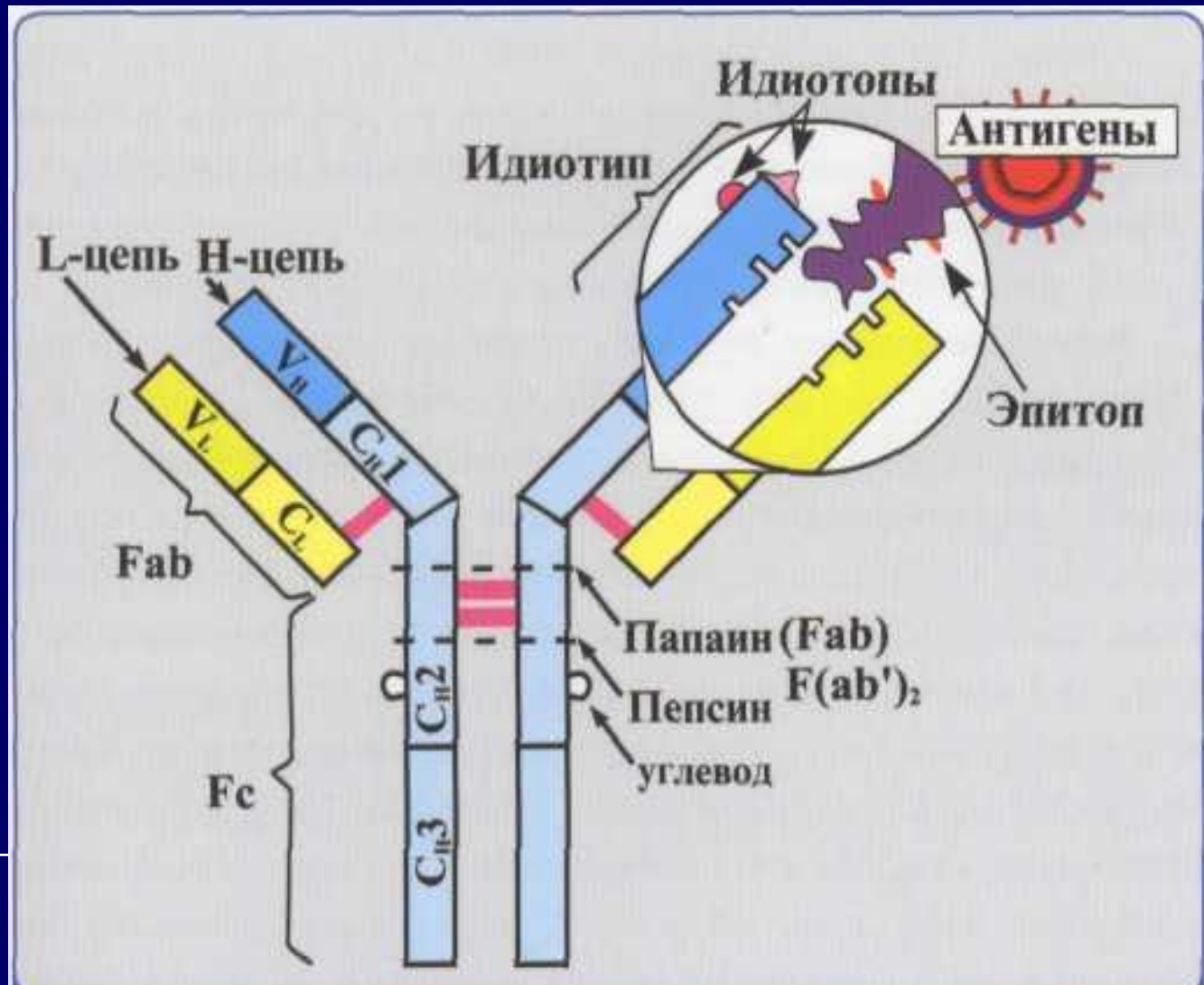
---



# Антитела

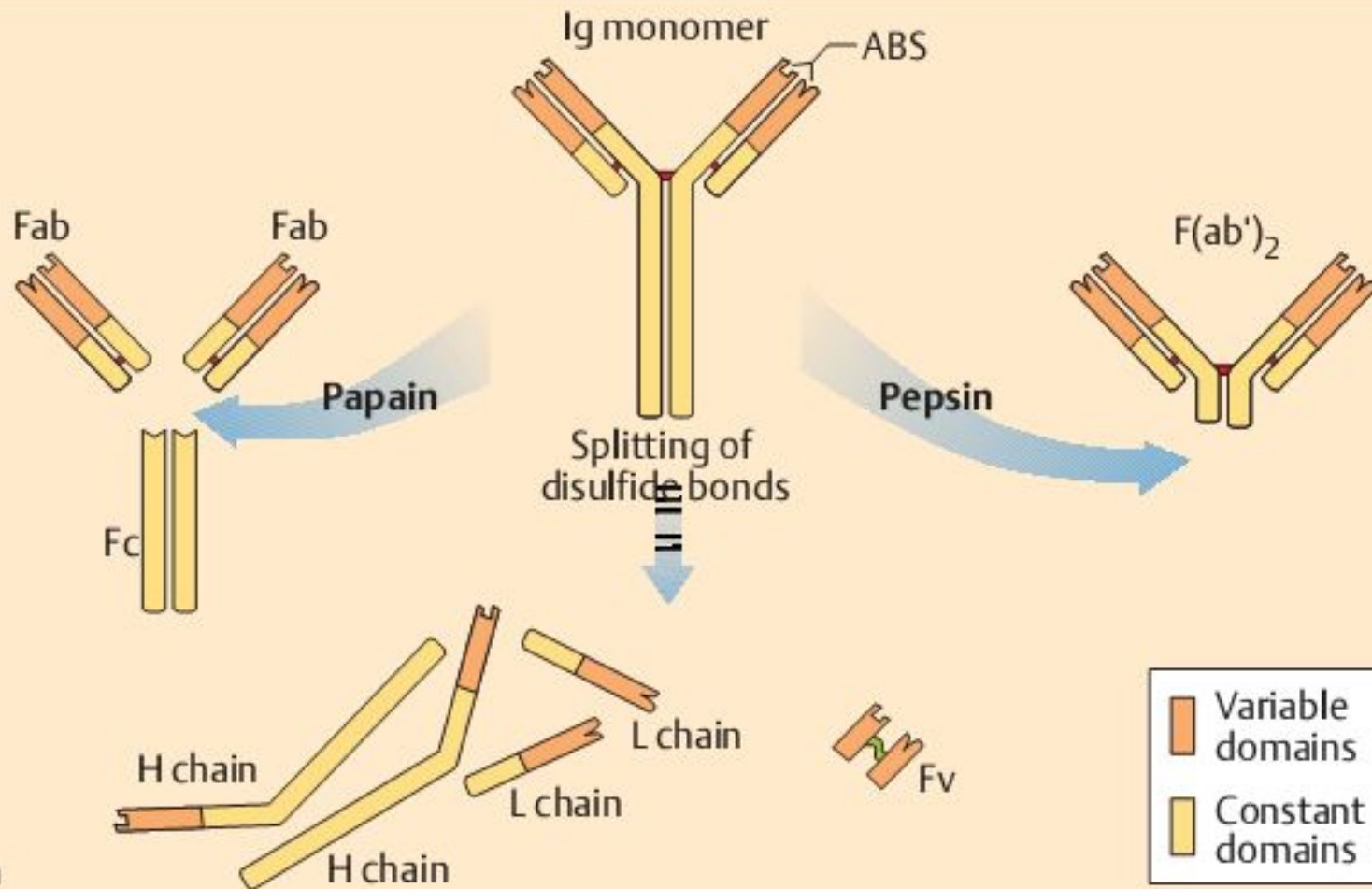
- белки сыворотки крови (иммуноглобулины), вырабатываются в ответ на введение антигена, способны специфически связываться с антигеном и участвовать во многих иммунологических реакциях.  
Синтезируются В лимфоцитами.
-

# Структура ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

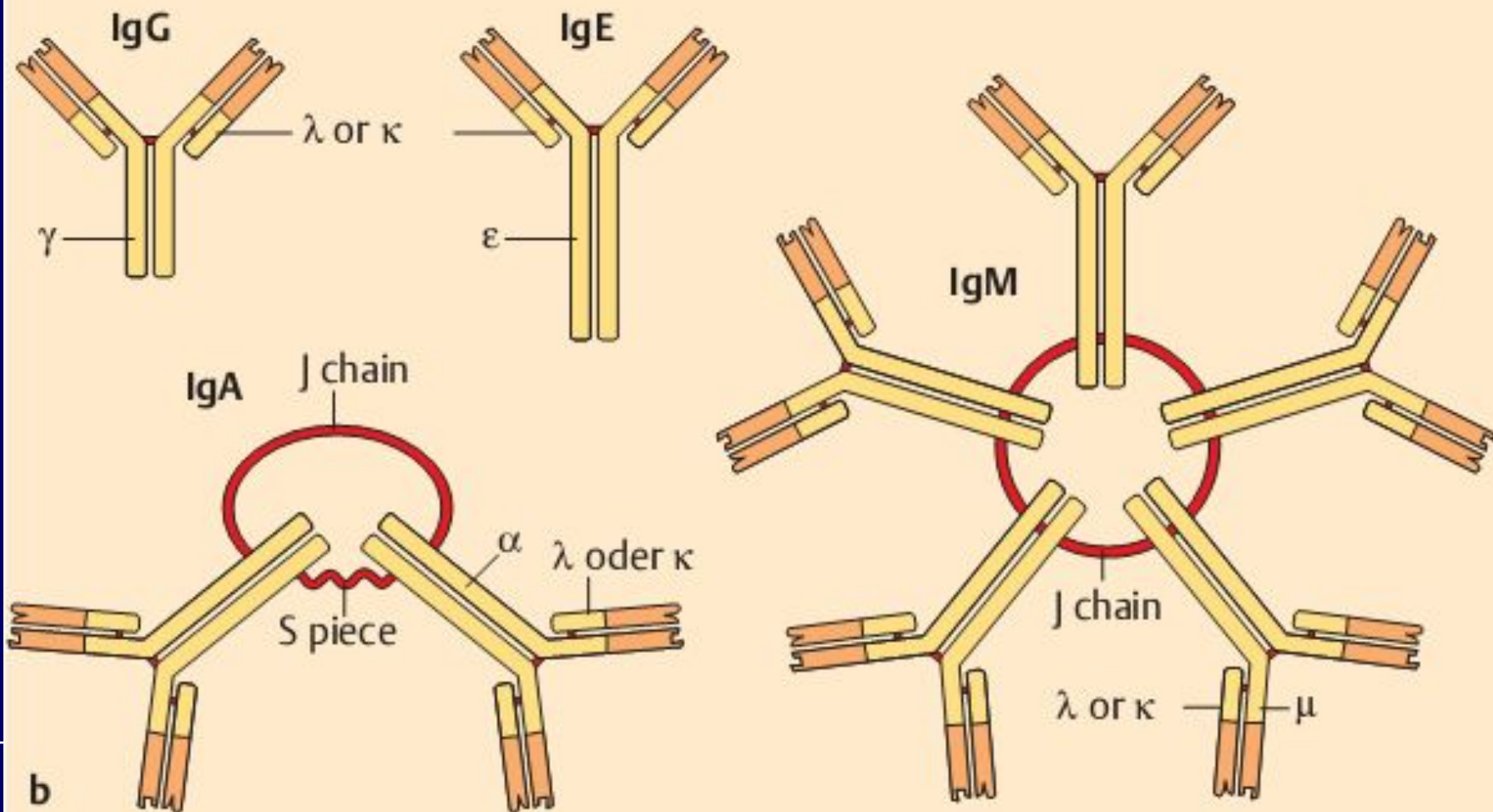


# Строение антитела

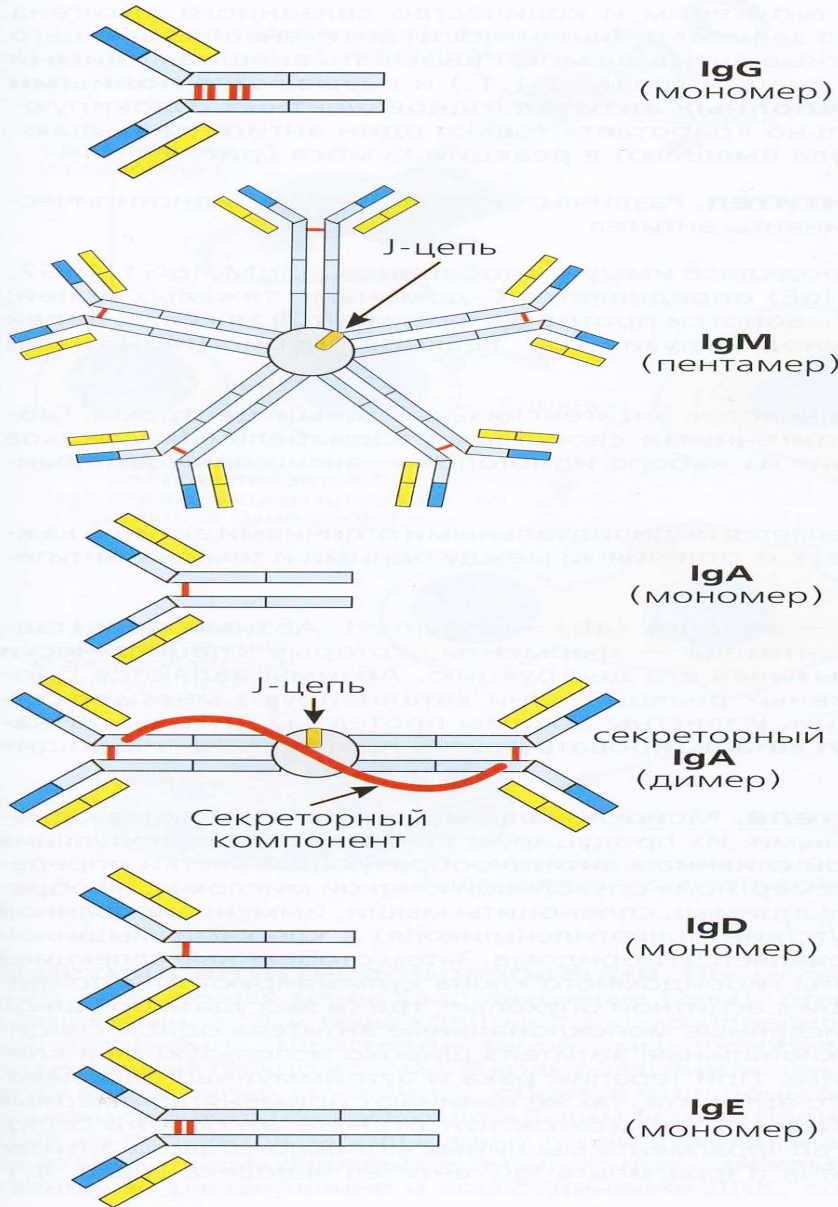
## Basic Immunoglobulin Structures



# Классы ИММУНОГЛОБУЛИНОВ



# Классы иммуноглобулинов



**IgG** (иммуноглобулин G составляет около 80 % антител сыворотки крови, имеет 4 подкласса: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4):

1. Период полураспада 7–23 дня в зависимости от подкласса.
2. Мономер, 2 эпитопсвязывающих участка.
3. Fc-фрагмент может участвовать в классическом пути активации комплемента.
4. Fc-фрагмент может связываться с макрофагом, нейтрофилом и NK.
5. Единственное антитело, которое передается через плаценту.

**IgM** (иммуноглобулин M составляет около 6 % антител сыворотки крови):

1. Период полураспада около 5 дней.
2. Первое антитело, продуцируемое при иммунном ответе.
3. Пентамер; 10 эпитопсвязывающих участков.
4. Fc-фрагмент может участвовать в классическом пути активации комплемента.
5. Мономеры IgM имеются на поверхности В-лимфоцита в виде мембранного Ig (mIg).

**IgA** сывороточный (иммуноглобулин A составляет около 13 % антител сыворотки крови, имеет 2 подкласса — IgA1, IgA2). Период полураспада около 5 дней.

**IgA** секреторный (sIgA) находится на слизистой оболочке, в слюне, слезах, молозиве и грудном молоке, блокируя микробы. Димер имеет секреторный компонент, защищающий sIgA от разрушения ферментами, 4 эпитопсвязывающих участка.

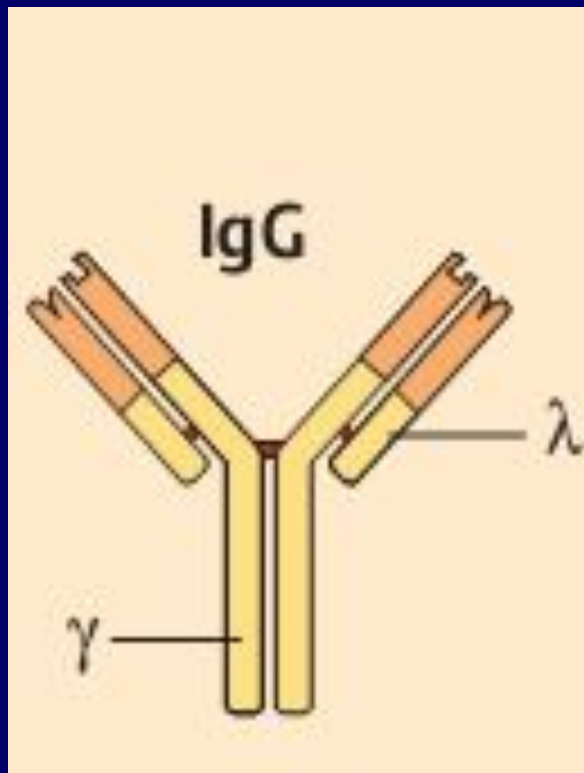
**IgD** (иммуноглобулин D составляет около 0,1 % антител сыворотки крови):

1. Мономер, 2 эпитопсвязывающих участка.
2. Находится на поверхности В-лимфоцита (наряду с мономерным IgM) в виде mIg, контролируя его активацию и супрессию.

**IgE** (иммуноглобулин E составляет около 0,002 % антител сыворотки крови):

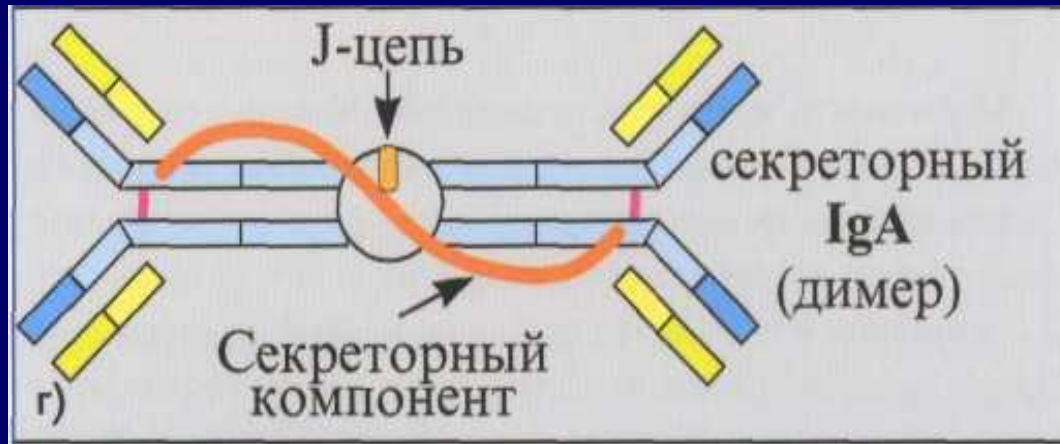
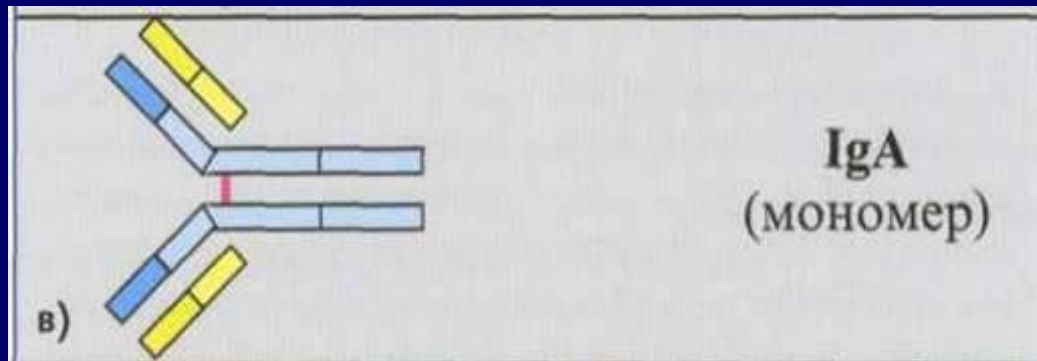
1. Период полураспада около 2 дней.
2. Мономер, 2 эпитопсвязывающих участка.
3. Участвует в противопаразитарном иммунитете и в ответе на аллергены.
4. Fc-фрагмент связывается с тучными клетками и базофилами; последующее взаимодействие с аллергеном запускает аллергическую реакцию.

# Иммуноглобулин G



- 70-80% всех сывороточных Ig
- Содержание 7-24 г/л
- 2 активных центра (паратоба)
- G1, G2, G3 и G4
  - G1 и G3 связывают комплемент
  - G4 обладает цитотфильностью
- Проходит через плаценту

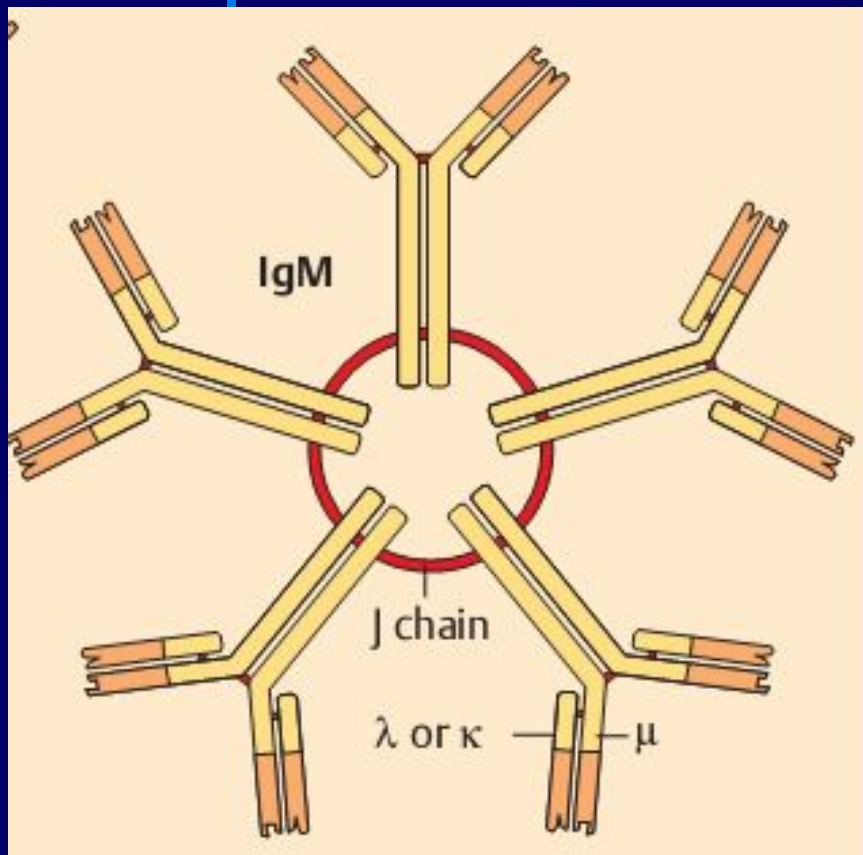
# Иммуноглобулин А



- **Сывороточный IgA** – 2 паратопа.
- **10-15%**
- **1,3-5,1 г/л**
- **Секреторный sIgA**
- **4-6 паратопов**
- **Содержит S-и J-пептиды**
- **Устойчив к действию протеаз**

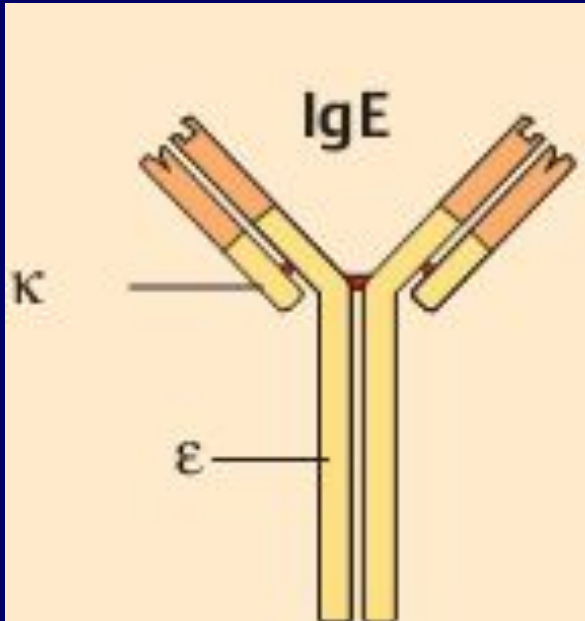


# Иммуноглобулин М



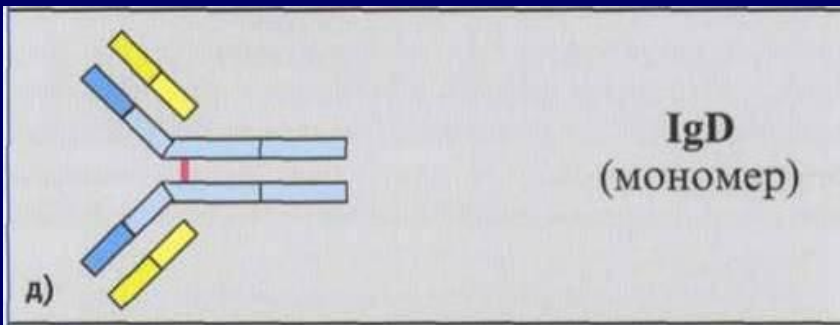
- Пентамер
- 10 паратопов
- 5-10% всех иммуноглобулинов
- M1 и M2
- 0,8 – 1,7 г/л
- Образуется первым на антигенный стимул
- Не проходит через плаценту

# Иммуноглобулины E и D



- **IgE** – реагины
- 0,002% всех сывороточных Ig
- 0,00025г/л или 100КЕ
- 1 паратоп

- **IgD** – 0,2%
- 0,03г/л
- Рецептор В-лимфоцитов
- 1 паратоп





# Виды антител

- **Видовые** – характерны для особей данного вида (кролика, человека и т.п.)
- **Изотипические** – являются групповыми (деление на 5 классов Ig)
- **Аллотипические** – являются индивидуальными (можно различать особи внутри вида)
- **Идиотипические** – отражают особенности строения антигенсвязывающего центра самой молекулы Ig (образованы V доменами легкой и тяжелой цепи)

# Иммунный ответ

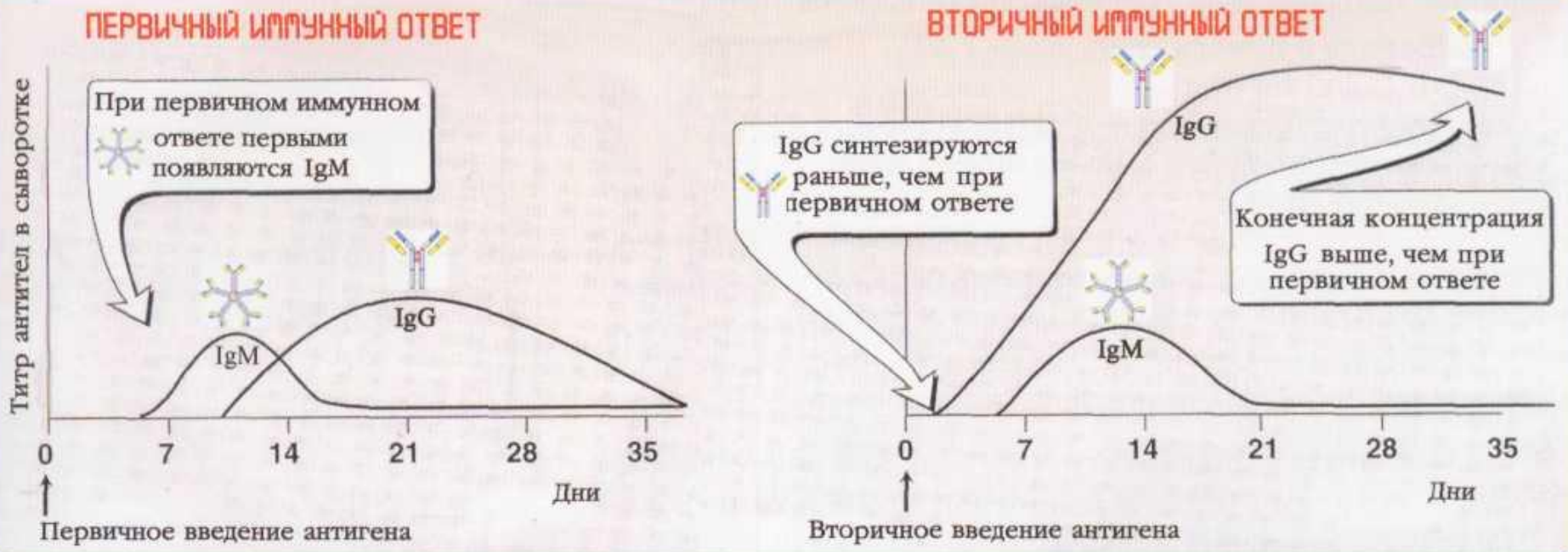


Рис. 7.39. Антителообразование при первичном и вторичном иммунном ответе



# СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- **Серодиагностика** - диагностика инфекционных болезней по обнаружению и установлению титров антител в сыворотке крови при бактериальных, вирусных, реже других инфекционных заболеваниях с помощью известного антигена (*диагностикума*).
  - **Сероидентификация** микроорганизмов, токсинов, антигена вообще с помощью известного антитела (*иммунной диагностической сыворотки*)
-



# Сероидентификация

- Для определения родовой, видовой и типовой принадлежности антигена необходимы заведомо известные **иммунные диагностические сыворотки**. Их получают путем многократного введения животным (чаще кроликам) в нарастающих дозах убитых или живых микроорганизмов, продуктов их распада, обезвреженных или нативных **ТОКСИНОВ**



- Используются *неадсорбированные* и *адсорбированные* диагностические сыворотки.
- Неадсорбированные сыворотки обладают высокими титрами антител, но способны давать групповые (перекрестные) реакции.
- Адсорбированные сыворотки отличаются строгой специфичностью действия (реагируют только с гомологичным антигеном).



---

# Серодиагностика

- В качестве антигенов (диагностикумы) в серологических реакциях применяют взвеси живых или убитых бактерий, продуктов их расщепления, токсины, вирусы.
-

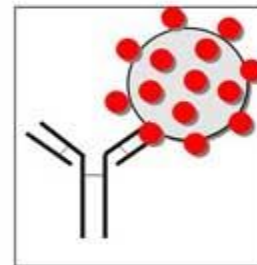


# Фазы :

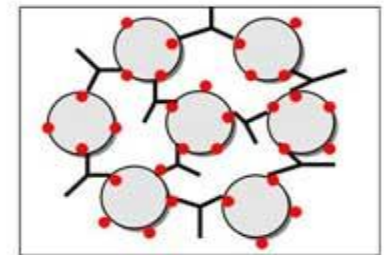
- 1) **специфическая** - фаза взаимодействия, в которой происходит комплементарное соединение активных центров антител (паратопов) и эпитопов антигена. Обычно эта фаза длится несколько секунд или минут;
- 2) **неспецифическая** - фаза проявления, характеризуется внешними признаками образования иммунных комплексов. Эта фаза может развиваться от нескольких минут до нескольких часов.

Схема взаимодействия антигена с антителами

Специфическая фаза



Неспецифическая фаза

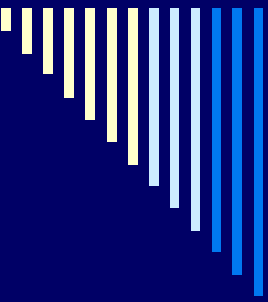


● - антиген;

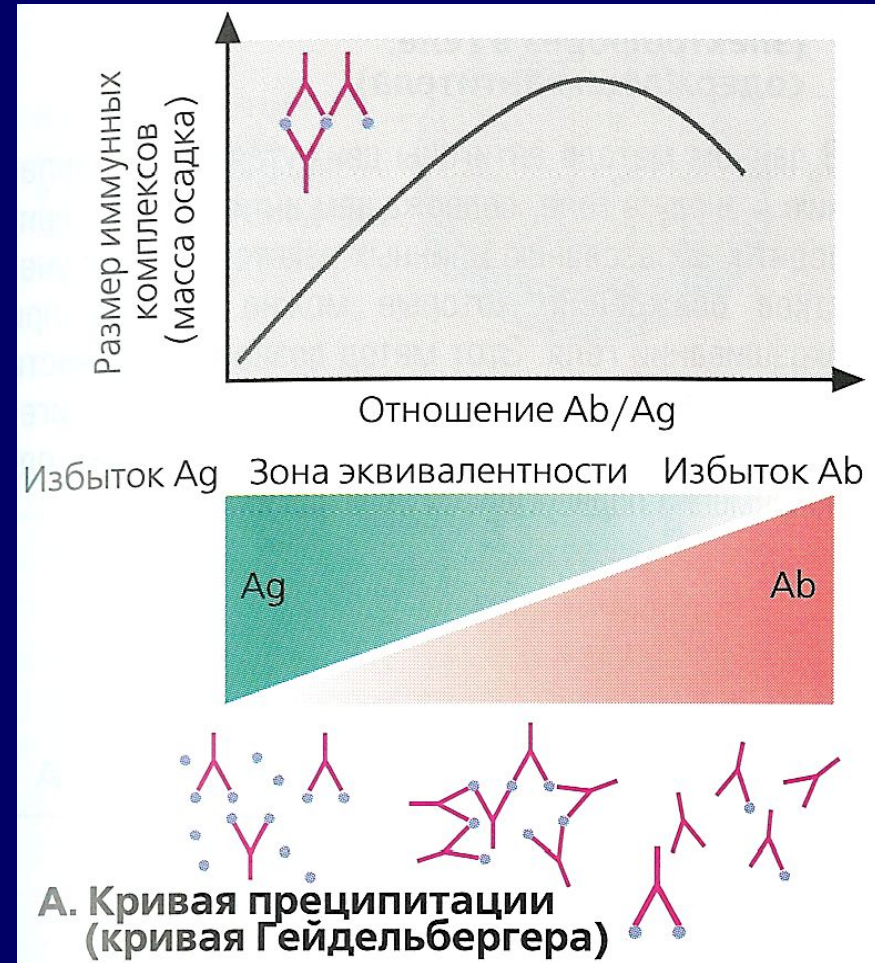
Y - антитела.



- Необходимое условие образование решетки (сетей) - наличие **более трех антигенных детерминант** на каждую молекулу антигена и по **два активных центра** на каждую молекулу антитела.



- Область оптимальных соотношений (**зона эквивалентности**) концентраций антигена и антител, когда в надосадочной жидкости после образования осадка не обнаруживаются ни свободные антигены, ни свободные антитела.





# Чувствительность методов серологических реакций.

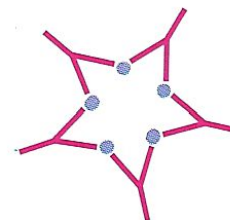
МЕТОДЫ	ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ, г/мл.
Реакция преципитации	$10^4 - 10^6$
Реакция агглютинации	$10^6 - 10^7$
Реакция связывания комплемента	$10^6$
Реакция пассивной гемагглютинации	$10^7 - 10^9$
Реакция иммунофлуоресценции	$10^7$
Реакция коагглютинации	$10^8 - 10^9$
Иммуноферментный анализ	$10^6 - 10^7$
Радиоиммунный анализ	$10^9$ и менее
Иммуноблотинг	$10^7 - 10^9$

# Виды реакций

□ **Агглютинация**

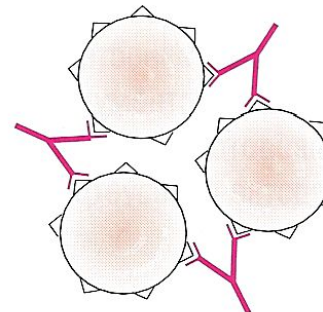
□ **Преципитация**

□ **Лизиса**



Образование  
иммунных  
комплексов  
с молекулами  
антигенов

Преципитация



Образование  
иммунных комплексов  
с антигенными  
частицами  
(эритроциты, латекс)

Агглютинация

**Б. Преципитация и агглютинация**



# РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

- *антигены в виде **частиц** (микробные клетки, эритроциты и другие **корпускулярные антигены**), которые склеиваются антителами и выпадают в осадок.*

## **Компоненты :**

- 1) антиген (агглютиноген);
  - 2) антитело (агглютинин) и
  - 3) электролит (изотонический раствор натрия хлорида).
-



# Ориентировочная реакция агглютинации (РА)

- Ставится на предметном стекле при комнатной температуре.
- Пастеровской пипеткой на стекло наносят отдельно каплю сыворотки в разведении 1:10 - 1:20 и контрольную каплю изотонического раствора натрия хлорида.
- В ту и другую бактериологической петлей вносят колонии или суточную культуру бактерий (каплю диагностикума) и тщательно перемешивают их.

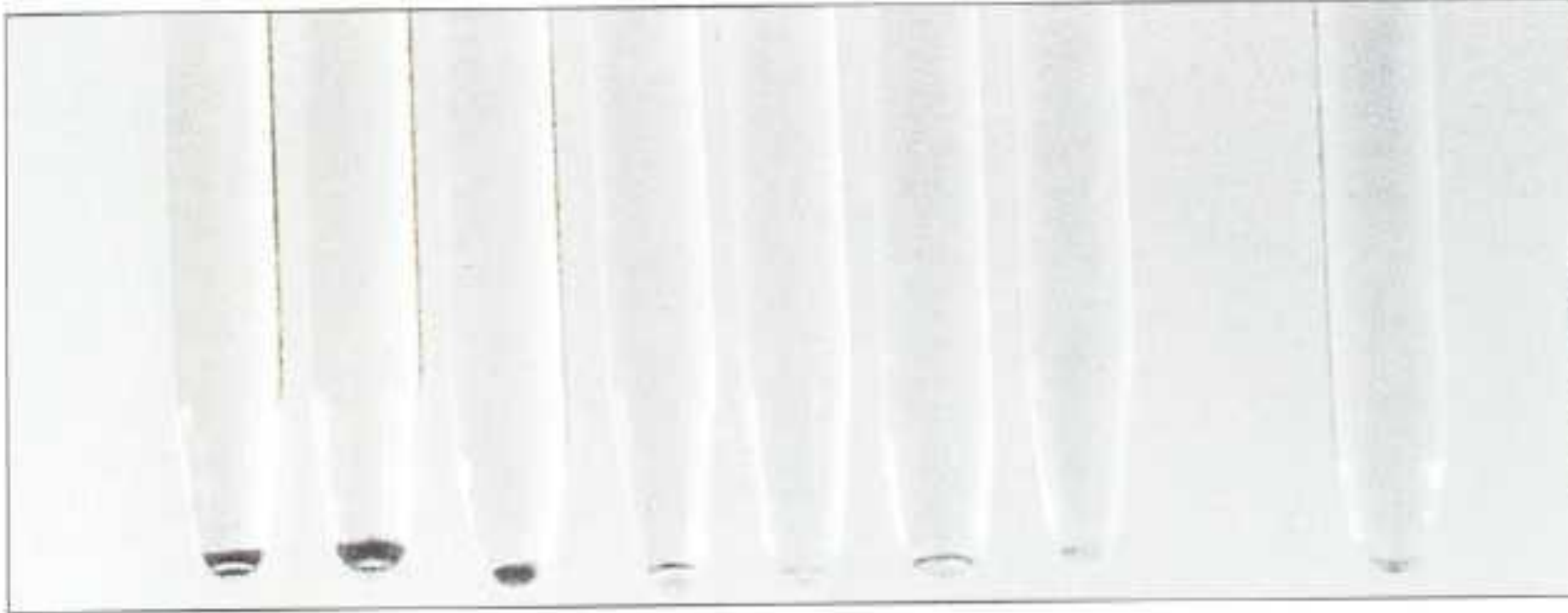
# Ориентировочная реакция агглютинации (РА)

- Реакции учитывают через несколько минут визуально, иногда с помощью лупы (x5). При положительной РА в капле с сывороткой отмечают появление крупных и мелких хлопьев, при отрицательной - сыворотка остается равномерно мутной.





# Линейная агглютинация

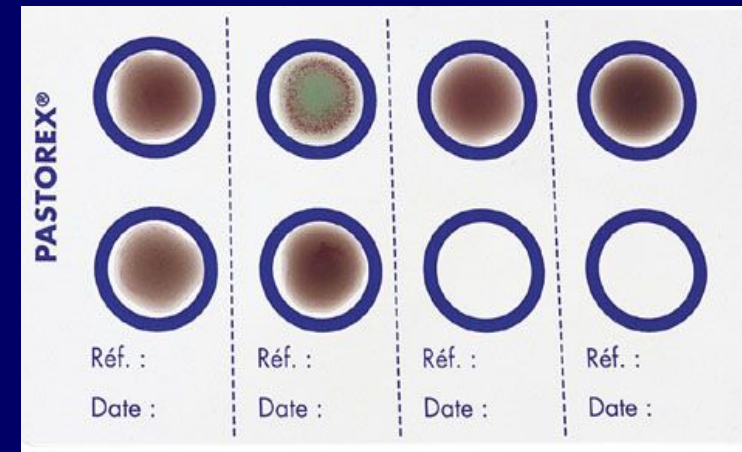


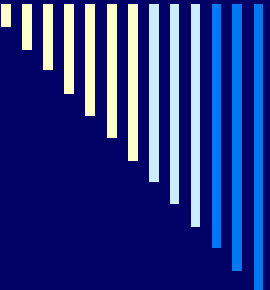
**192 Widal test for serological diagnosis of typhoid fever.** The Widal test measures the patient's antibodies against *Salmonella typhi* O and H antigen preparations. Serial dilutions of the patient's serum are added to the antigens in tubes, the highest dilution giving granular agglutination with the O antigen and floccular agglutination with the H antigen being reported. Dilutions 1:20–1:1280 and a negative control, O titre 1:80. (Incubated for 2 h at 37°C)

# Латекс агглютинация



- Положительная реакция : **красная** агглютинация на **зеленом** фоне
- Отрицательная реакция : гомогенная **коричневая** суспензия
- Неспецифическая реакция :
  - мелкие крупинки на коричневом
  - агглютинация с более чем одним латексом





# Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА)

Реакция ставится:

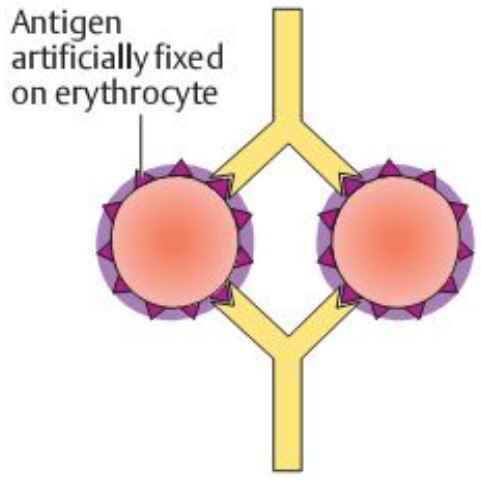
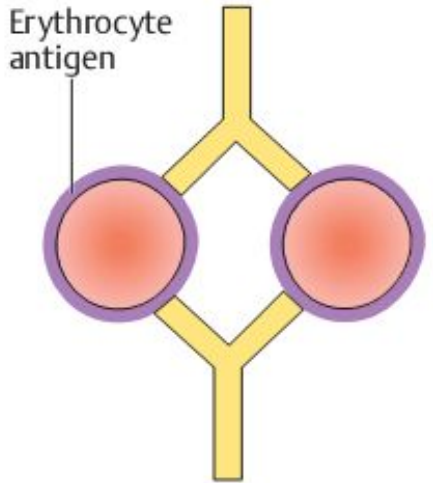
- 1) для обнаружения полисахаридов, белков, экстрактов бактерий и других высокодисперстных веществ, риккетсий и вирусов, комплексы которых с агглютинами в обычных РА увидеть не удается
  - 2) для выявления антител в сыворотках больных к этим высокодисперстным веществам и мельчайшим микроорганизмам.
  - **Под непрямой, или пассивной, агглютинацией понимают реакцию, в которой антитела взаимодействуют с антигенами, предварительно адсорбированными на инертных частицах (латекс, целлюлоза, полистерол, оксид бария и др. или эритроциты барана, I(0)-группы крови человека)**
-



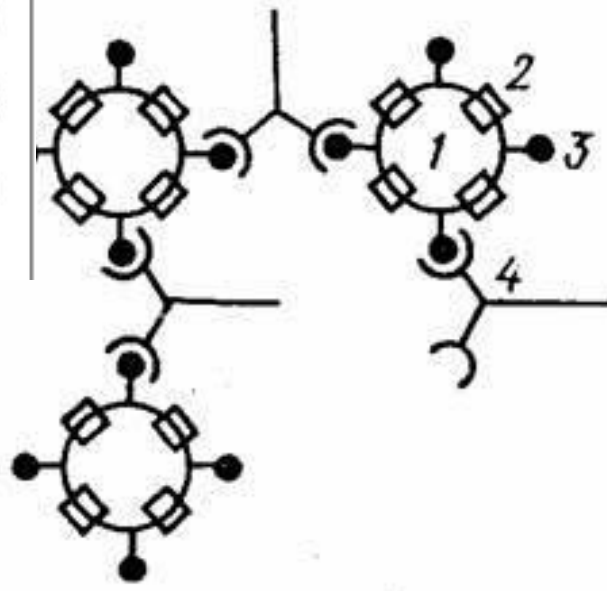
# Реакция непрямо́й (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА)

- В реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) в качестве носителя используют эритроциты. Нагруженные антигеном эритроциты склеиваются в присутствии специфических антител к данному антигену и выпадают в осадок.
- Сенсibilизированные антигеном эритроциты используют в РПГА как *эритроцитарный диагностикум* для обнаружения антител (серодиагностика). Если нагрузить эритроциты антителами (*эритроцитарный антительный диагностикум*), то можно применять для выявления антигенов.

# Hemagglutination



	Reciprocal serum dilution										Control	
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	pos.	neg.
Test serum a positive 1/32												
Test serum b negative												
Test serum c positive 1/8 with prozone 1/2												





## Результат РНГА (РПГА)



Положительный («зонтик»)

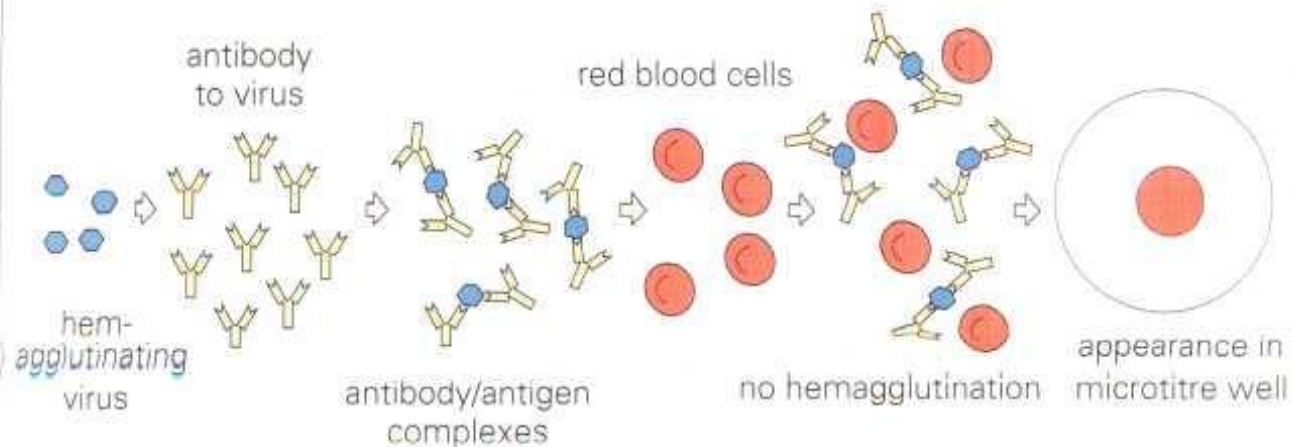
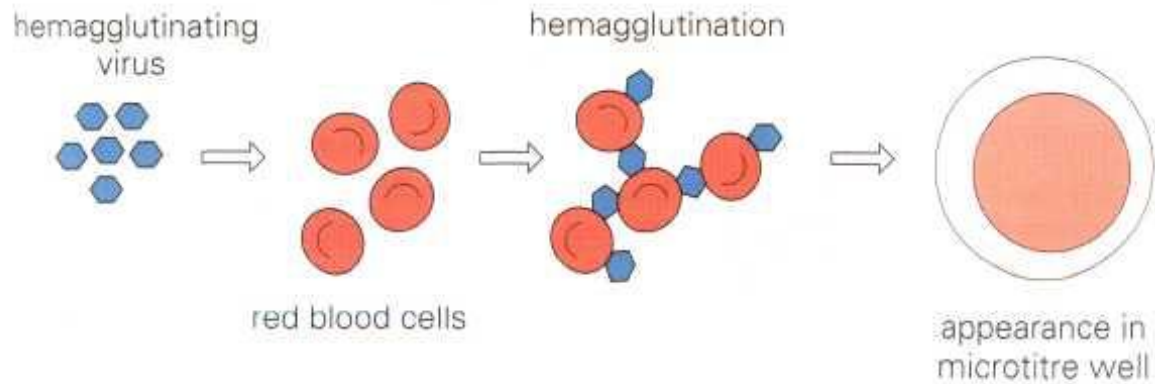
Отрицательный («пуговка»)

### **Постановка.**

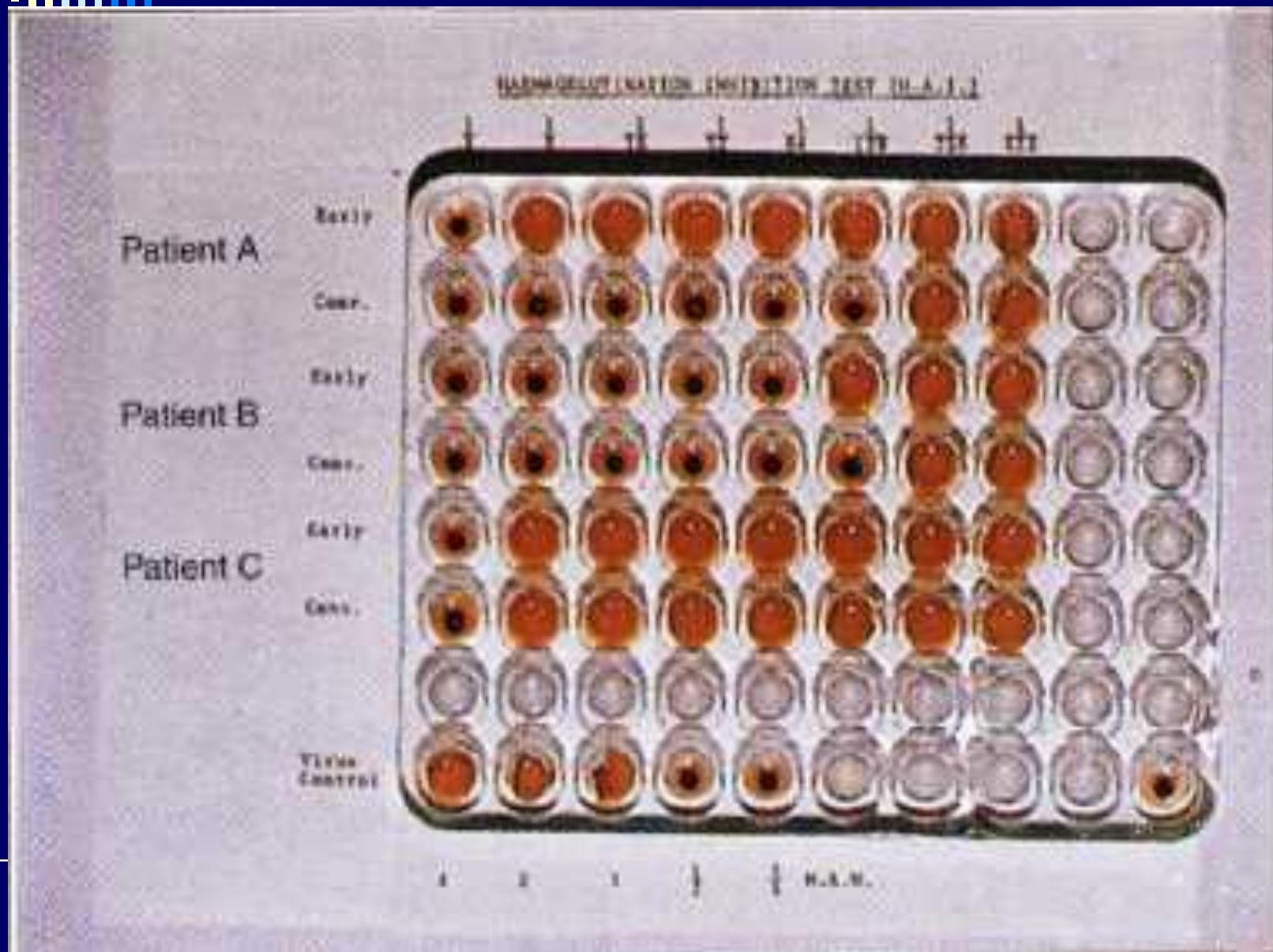
- В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных разведений сыворотки.
- В предпоследнюю лунку вносят - 0,5 мл заведомо положительной сыворотки и в последнюю 0,5 мл физиологического раствора (контроли).
- Затем во все лунки добавляют по 0,1 мл разведенного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и помещают в термостат на 2 ч.

**Учет.** В положительном случае эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем (перевернутый **зонтик**), в отрицательном - оседают в виде **пуговки** или колечка

# Реакция торможения ГА (РТГА)



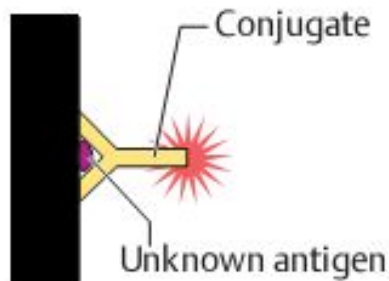
# PTGA



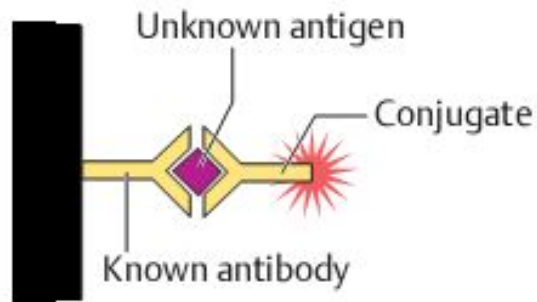
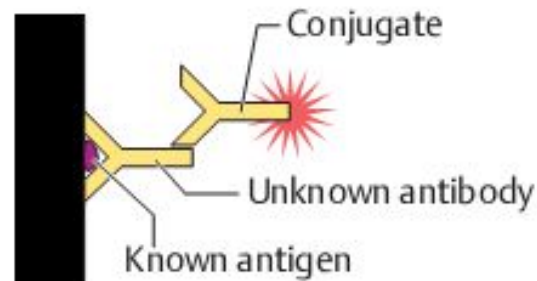


# Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

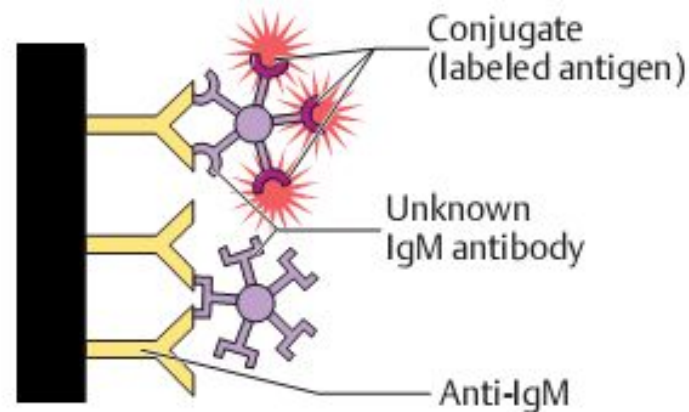
## Basic Solid Phase Test Types



a Direct test



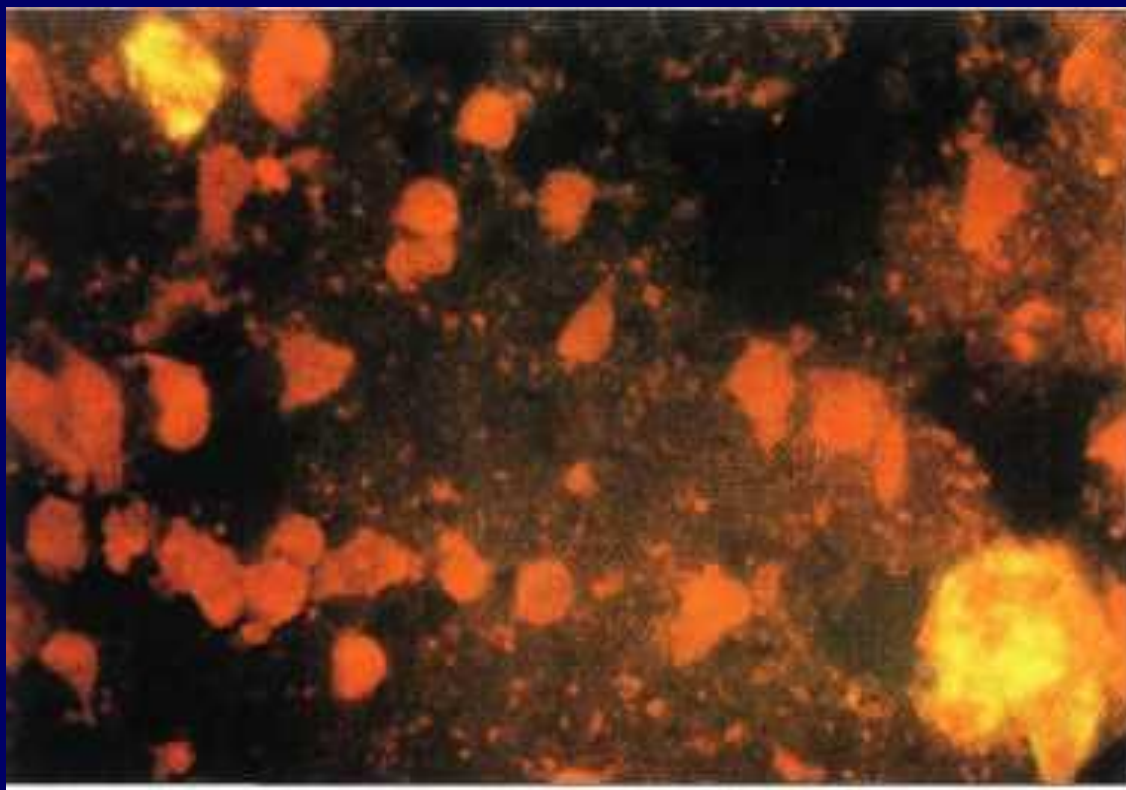
b Sandwich method



c Capture method



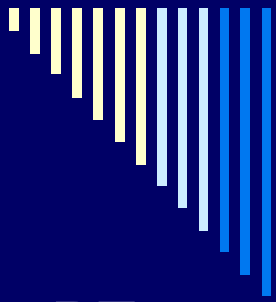
# РИФ



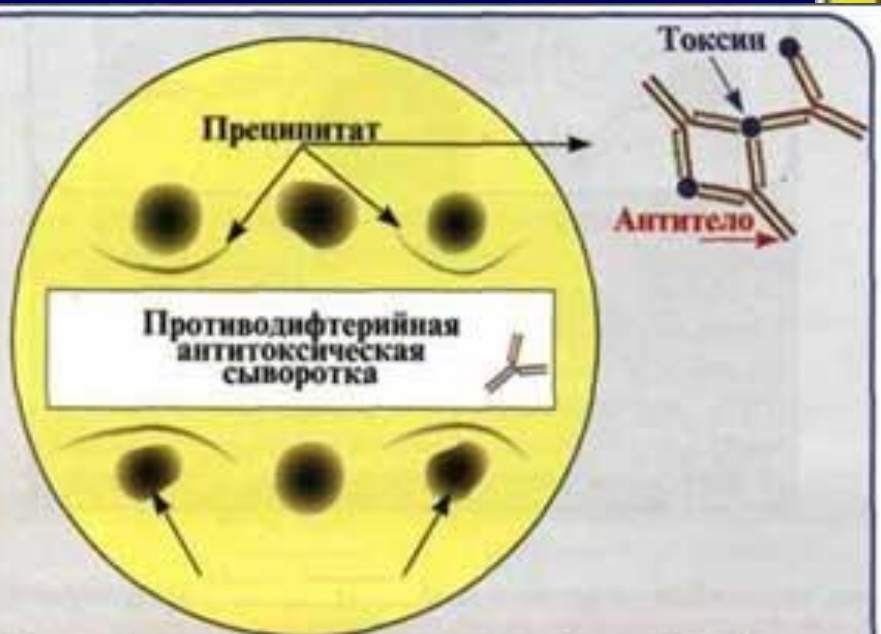


# РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

- Реакции преципитации (РП) основаны на феномене образования видимого осадка (преципитата) или общего помутнения среды после взаимодействия **растворимых либо находящихся в коллоидном дисперсном состоянии** Аг с АТ.



- РП ставят в специальных узких пробирках. В качестве реагентов используют гипериммунные **преципитирующие сыворотки** с высокими титрами АТ к гомологичным Аг.
- РП позволяет быстро (в течение нескольких секунд) выявлять незначительные количества Аг (можно выявить антиген в таких малых количествах, которые не обнаруживаются химическим путем).
- Они очень чувствительны, и их применяют для тонкого иммунохимического анализа, выявляющего отдельные компоненты в смеси антигена.



Определение токсигенности дифтерийной палочки (преципитация в агаре).  
В центре - колонии нетоксигенного штамма.



# РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

- Для диагностики венерических болезней, риккетсиозов, вирусных инфекций.
  - Реакция протекает в две фазы.
  - **Первая фаза** - взаимодействие антигена и антител при обязательном участии комплемента.
  - **Вторая** - выявление результатов реакции при помощи индикаторной гемолитической системы (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка).
-

При наличии в исследуемой сыворотке антител, комплементарных антигену, образующийся комплекс антиген-антитело связывает (адсорбирует) на себе комплемент. При добавлении гемолитической системы **гемолиза не происходит (задержка гемолиза)**, т.к. весь комплемент израсходован на специфическую связь комплекса антиген-антитело, а эритроциты остались неизменными.

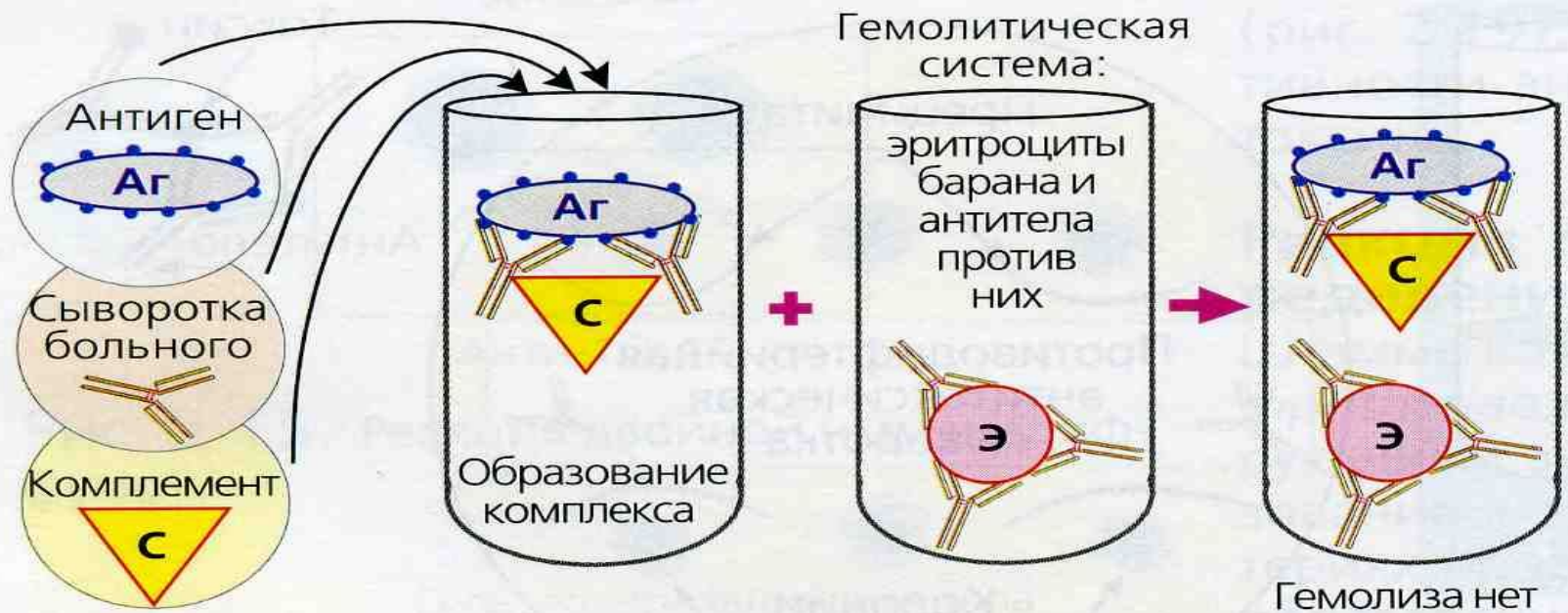


Рис. 2.22. Схема РСК с сывороткой больного

При **отсутствии в сыворотке антител**, комплементарных антигену, специфический комплекс антиген-антитело не образуется и комплемент остается не связанным. Поэтому при добавлении гемолитической системы комплемент присоединяется к ней. Результатом реакции в данном случае будет **гемолиз** эритроцитов - в пробирках образуется так называемая «лаковая» кровь.

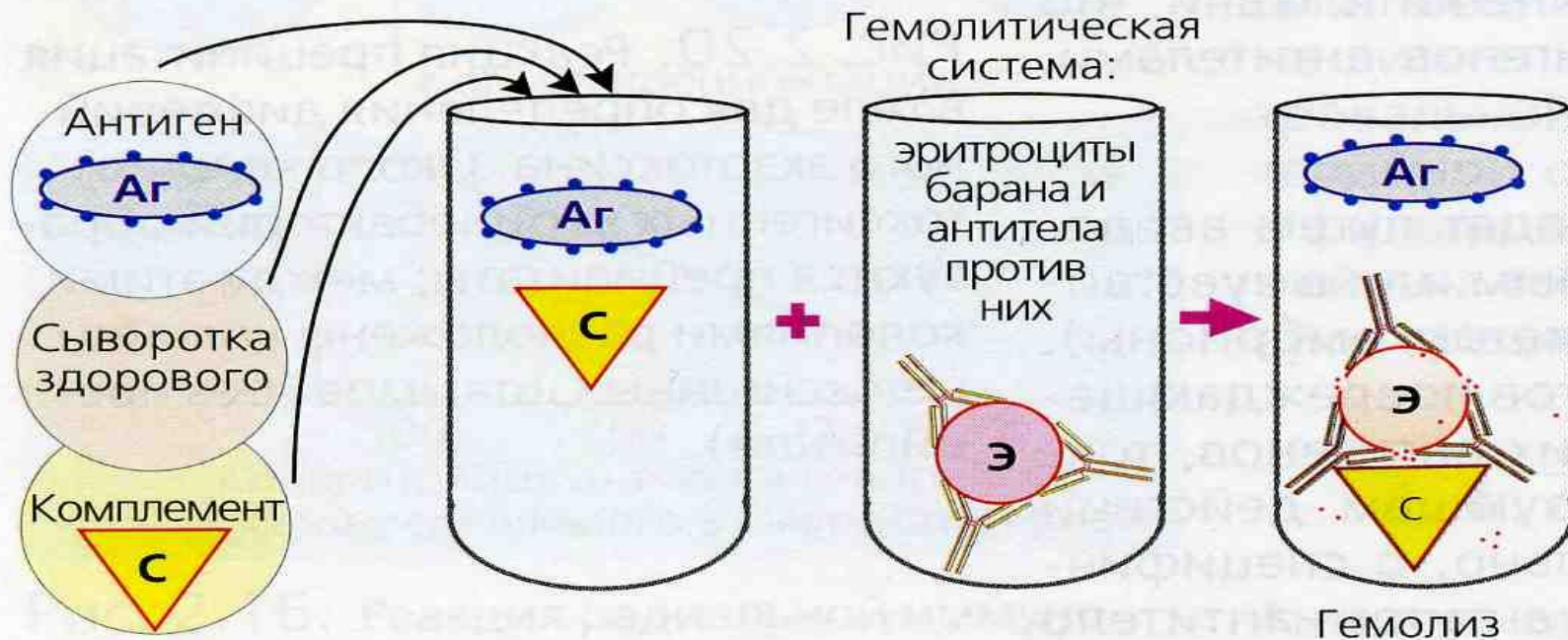


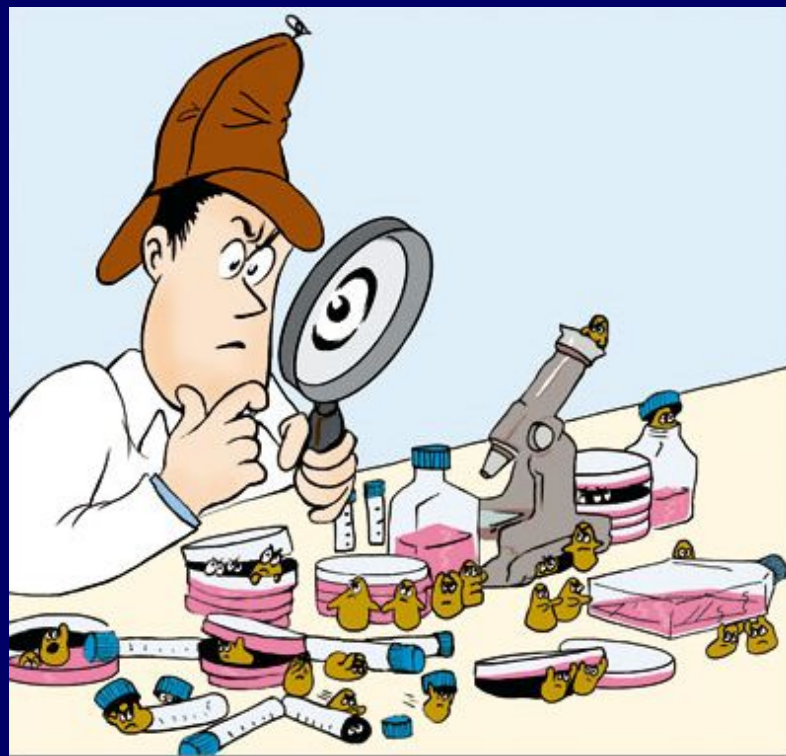
Рис. 2.23. Схема РСК с сывороткой здорового



---



# Благодарю



за внимание!

---