

- В основе **иммунодиагностики** инфекционных заболеваний лежит применение серологических реакций.
- **Серологическая реакция** - это реакция между **антигеном (АГ)** и **антителом (АТ)** in vitro, с помощью которой можно найти или неизвестный антиген (используя известное антитело), или неизвестное антитело (используя известный антиген).
- **Свойства серологических реакций:**
 - специфичность
 - чувствительность

Антигены – все органические вещества, которые несут признаки генетически чужеродной информации и при введении в организм вызывают развитие специфических иммунологических реакций

- Образование **антител** (гуморальный иммунный ответ)
- Формирование клона сенсibilизированных **Т-лимфоцитов** (клеточный иммунный ответ)

Свойства антигенов:

1. Иммуногенность – способность антигена вызывать иммунологические реакции.
2. Антигенность – способность антигена специфически реагировать с антителами и сенсibilизированными лимфоцитами
3. Специфичность – определяется индивидуальностью поверхностных химических структур антигена (детерминантами)

Детерминанты антигенов – это поверхностные химические структуры антигена, с помощью которых он взаимодействует с рецепторами лимфоцитов и активными центрами иммуноглобулинов (антител)

Бактериальные антигены (АГ)

- По специфичности:

1) АГ, которые встречаются у **разных видов** одного рода или семейства

2) видоспецифические (видовые)

встречаются у представителей **одного вида**

3) группоспецифические (групповые)

определяют серологические группы – **серогруппы** – внутри одного вида

3) типоспецифические (типовые)

определяют серологические варианты (типы) – **серовары** – внутри одного вида или серогруппы

Бактериальные антигены (АГ)

- По локализации в бактериальной клетке:

1) **O – АГ** (соматический)

ЛПС (у грам-) или полисахарид (у грам+) клеточной стенки;
термостабилен (выдерживает кипячение в течение 1–2 ч);

2) **H – АГ** (жгутиковый)

белок флагеллин; термолабилен;

3) **K – АГ** (капсульный)

полисахарид (реже полипептид) капсулы;

по чувствительности к температуре K - АГ подразделяются
на A-, B- и L-антигены.

Разновидности K - АГ:

– **Vi – АГ**

поверхностно-облагоденные АГ

Антитела (иммуноглобулины)

Глобулины, продуцируемые плазмочитами при попадании в организм антигена, способные специфически взаимодействовать с данным антигеном.

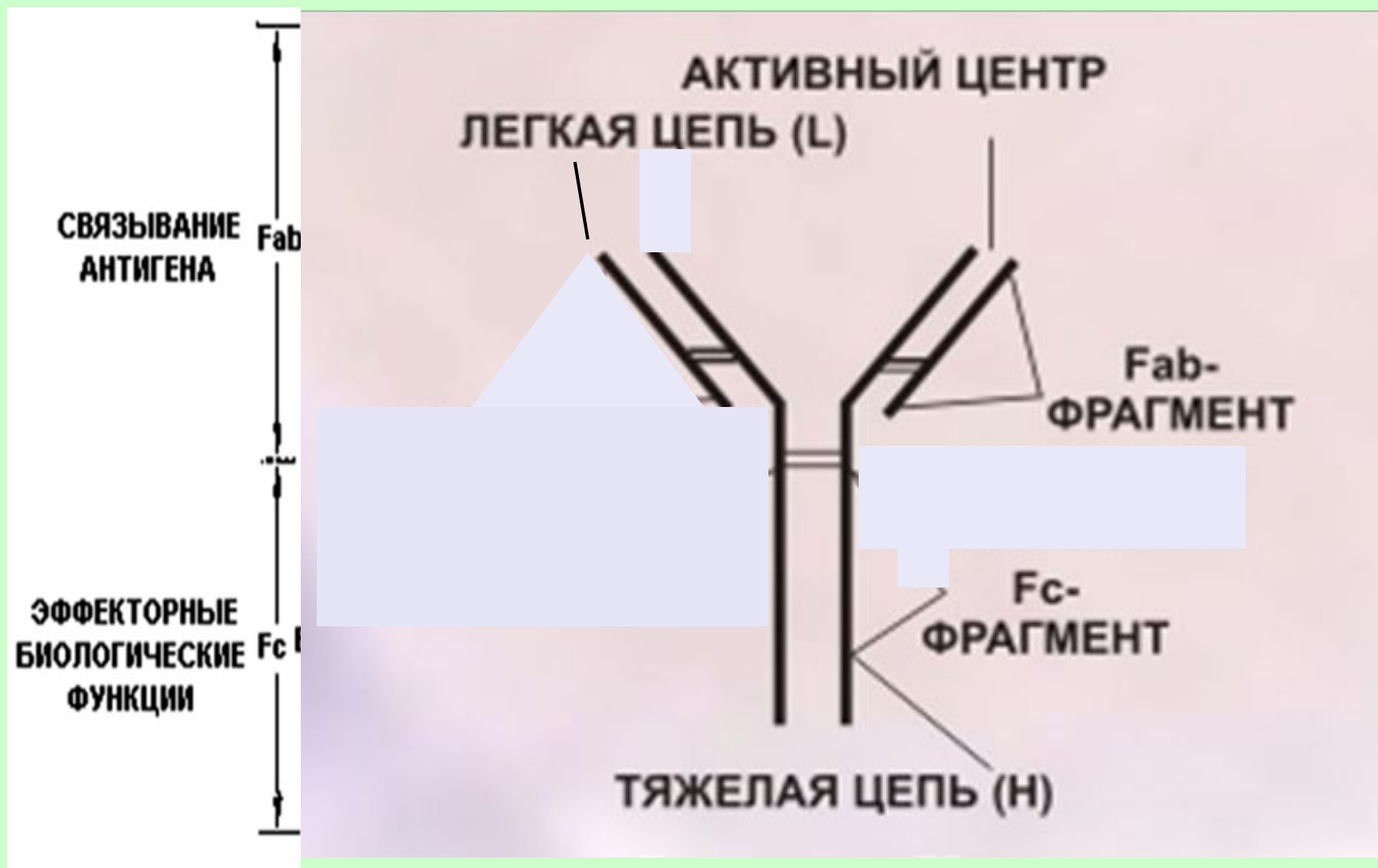
Классификация иммуноглобулинов:

1. ПОВЕРХНОСТНЫЕ – связаны с наружной мембраной В-лимфоцитов
2. СЫВОРОТОЧНЫЕ – содержатся в сыворотке крови и лимфе
3. СЕКРЕТОРНЫЕ – содержатся в секреторных жидкостях

Классы и подклассы иммуноглобулинов:

IgD, IgM, IgG (G1, G2, G3, G4), IgA (A1, A2), IgE

Структура молекулы иммуноглобулина



Эффекторные функции антител:

- Нейтрализация антигена
- Активация системы комплемента (**классический путь**) с последующим лизисом антигена
- Активация фагоцитоза антигена (**опсонизация**) с последующим его уничтожением
- Запуск антитело-зависимой клеточной цитотоксичности с последующим лизисом антигена

Серологические реакции:

- Реакции, результат которых можно увидеть невооруженным глазом:
 - агглютинации
 - преципитации
 - лизиса
- Реакции, для визуализации результата которых применяют различные **метки**, которые прикрепляют к АГ или АТ, а затем проводят детекцию меченного реагента:
 - радиоизотопная метка (радиоиммунный анализ – РИА)
 - флюорохромная метка (реакция иммунофлюоресценции – РИФ)
 - ферментная метка (иммуноферментный анализ – ИФА)

- Реакция агглютинации (РА) (от лат. *agglutinatio* - склеивание)
 - это склеивание **корпускулярных** антигенов (бактерий, эритроцитов, частиц с адсорбированными на них антигенами) антителами в присутствии электролитов.
- Проявляется в виде **хлопьев** или **осадка**, состоящих из корпускул (например, бактерий), «склеенных» антителами.
- Варианты РА:
 - **прямая**
 - **пассивная (непрямая)**

- Реакция преципитации (РП) (от лат. *praecipito* - осаждать)
 - это формирование и осаждение комплекса **растворимого молекулярного** антигена с антителами в виде **помутнения**, называемого преципитатом.
- Варианты РП:
 - 1) реакция **кольцепреципитации**
 - 2) реакция **преципитации в геле**

Направления иммунодиагностики

1. Сероиндикация
2. Сероидентификация
3. Серодиагностика

1. Сероиндикация

это обнаружение АГ возбудителя в **исследуемом материале** с

помощью известных АГ (**диагностических сывороток**);

входит в экспресс-метод диагностики;

реакции:

- РПГА (реакция пассивной гемагглютинации)
- Реакция латекс-агглютинации
- Реакция коагглютинации
- РП (реакция преципитации)
- ИФА (иммуноферментный анализ)

2. Сероидентификация

это определение АГ выделенной **чистой культуры** с

помощью известных АГ (**диагностических сывороток**);

проводится на **III этапе** бактериологического метода;

реакции:

- РА (реакция агглютинации)
- РП (реакция преципитации)
- Реакция латекс-агглютинации

3. Серодиагностика

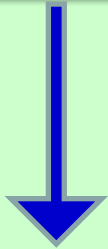
это обнаружение АГ к возбудителю в **сыворотке крови** с помощью известных АГ (**диагностикумов**);
является самостоятельным методом диагностики (**серологический**).

Реакции:

- РПГА (реакция пассивной гемагглютинации)
- РА (реакция агглютинации)
- РСК (реакция связывания компонента)
- нРИФ (непрямой вариант реакции иммунофлюоресценции)
- ИФА (иммуноферментный анализ)

Получение диагностических сывороток

Гипериммунизация
животных – продуцентов
соответствующим м/о (АГ)



Получение сыворотки
животного, содержащей АТ к
соответствующему м/о (АГ)
(**поликлональные АТ**)

Гипериммунизация
животных – продуцентов
соответствующим м/о (АГ)



Получение лимфоидных клеток,
продуцирующих АТ нужной
специфичности (АОК)



Гибридизация АОК с опухолевыми
клетками миеломы in vitro
(**гибридома**)



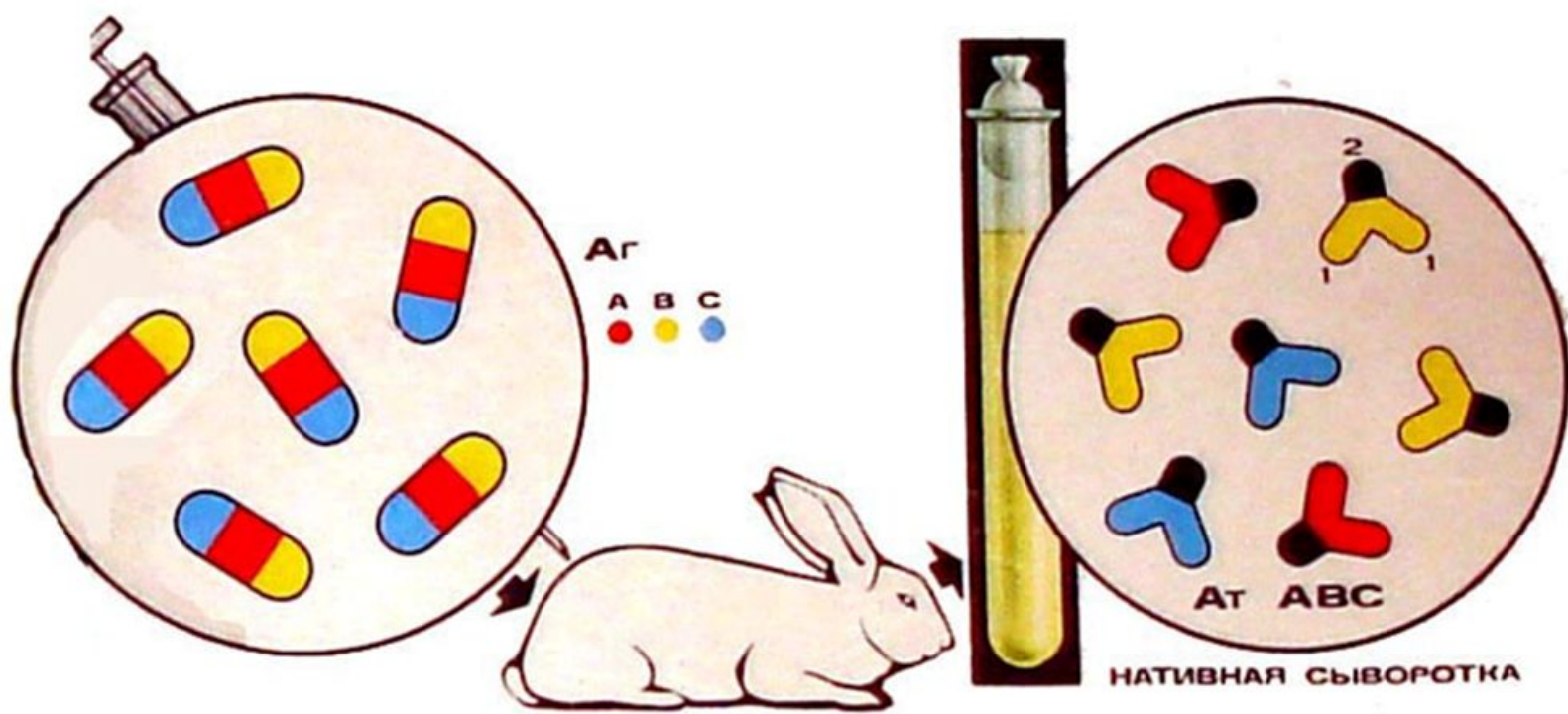
Получение **моноклональных АТ**

- По специфичности поликлональные сыворотки подразделяют на:
 - **поливалентные** (полиспецифические)
содержат АТ к разным антигенам (антигенным детерминантам) микроорганизма
 - **моновалентные** (моноспецифические)
содержат АТ к одному конкретному антигену (антигенной детерминанте) микроорганизма

Для повышения специфичности из сыворотки **удаляют часть АТ** (ненужные или лишние АТ).

Способы удаления из сывороток лишних АТ:

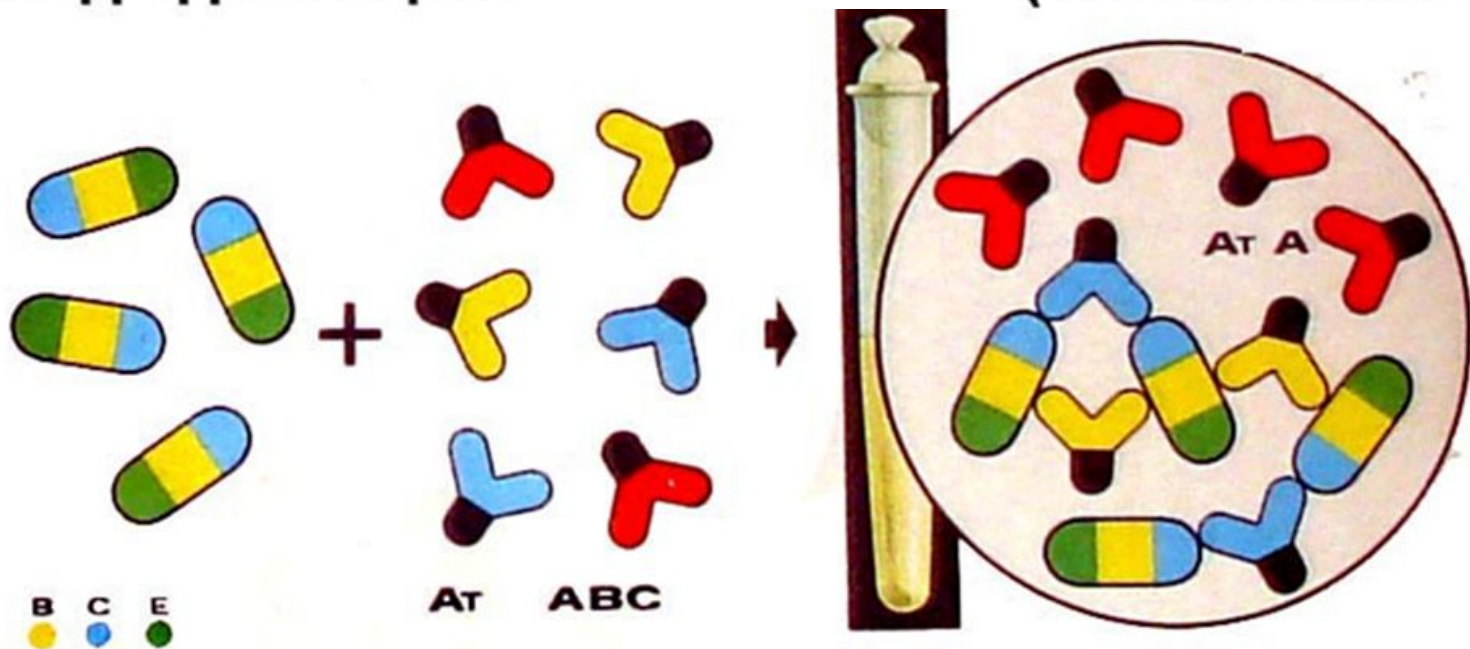
1. Метод адсорбции по Кастеллани
2. Сорбционные методы (например, аффинная хроматография)



МЕТОД АДСОРБЦИИ

антител

(ПО КАСТЕЛЛАНИ)



- **Метод адсорбции по Кастеллани:**

к нативной сыворотке животного (**неадсорбированной**), содержащей многочисленные АТ различной специфичности, последовательно добавляют микроорганизмы, в состав которых входят АГ, которые взаимодействуют и адсорбируют на себе гомологичные им АТ, от которых нужно “очистить” сыворотку (“ненужные” АТ), тем самым удаляя их из сыворотки.

Оставшиеся “нужные” АТ – **адсорбированная сыворотка**.

- **Аффинная хроматография:**
- Сыворотка крови иммунизированного животного пропускается через колонку с носителем, к которому ковалентно пришит АГ.

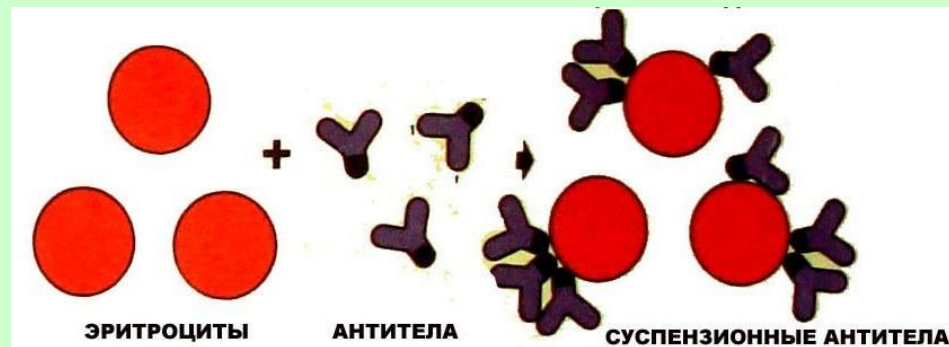
Специфические по отношению к АГ антитела сыворотки связываются с ним, а все другие (“ненужные”) антитела проходят через колонку.

Вслед за этим специфически связанные антитела смывают с колонки кислым или щелочным раствором, получая таким образом именно “нужные” АТ.

СЕРОИНДИКАЦИЯ

Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА или РНГА)

- Ставится на стекле (**пластинчатая РПГА**)
- Компоненты:
 - **исследуемый материал** (в нём ищут АГ)
 - диагностическая сыворотка – **суспензионные АТ**
(антитела к искомому АГ, адсорбированные **на эритроцитах**,
например, I группы крови человека или барана,
предварительно обработанных танином и формалином)



- Учет визуальный:
при “+” реакции - **красные хлопья**
при “-” реакции – хлопьев нет

РПГА

**Положительная
(красные хлопья)**



**Отрицательная
(нет хлопьев)**



Реакция латекс-агглютинации

- Ставится на пластине
- Компоненты:
 - исследуемый материал (в нём ищут АГ)
 - диагностическая сыворотка

(АТ, адсорбированные Fc-фрагментом на **частицах полистирольного латекса**).
- Учет визуальный:
 - при “+” реакции – **белые хлопья** (агрегаты из частиц латекса)
 - при “-” реакции – хлопьев нет

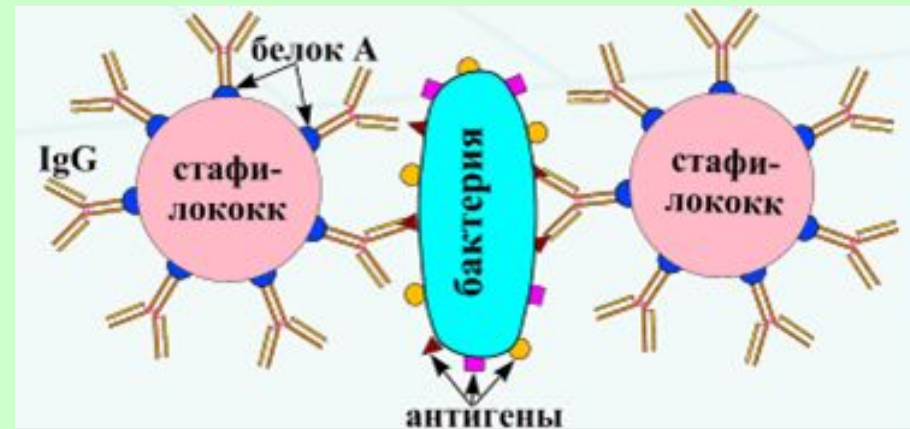


Реакция коагглютинации

- Ставится на пластине
- Компоненты:
 - исследуемый материал (в нём ищут АГ)
 - диагностическая сыворотка

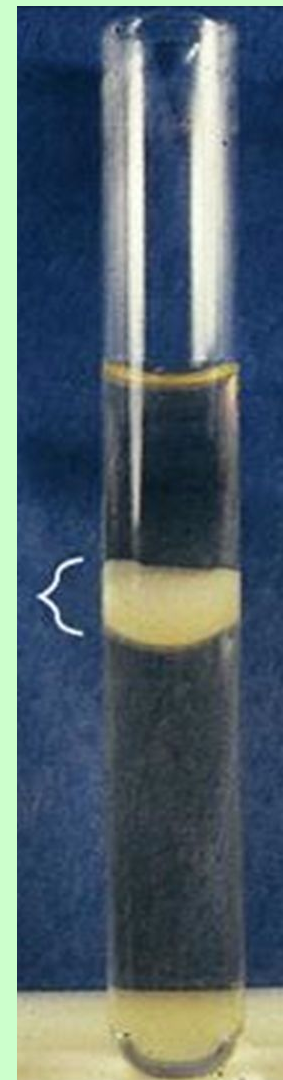
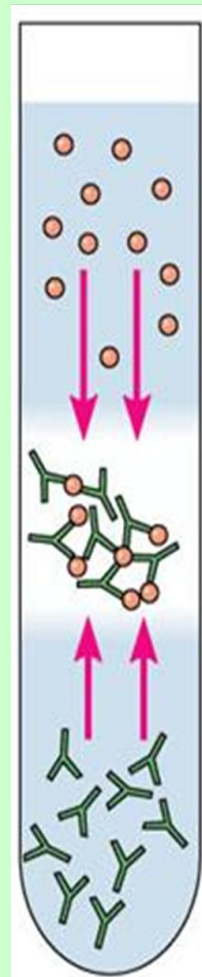
(АТ, адсорбированные Fc-фрагментом на **клетках золотистого стафилококка – *S. aureus***).

- Учет визуальный:
при “+” реакции – **хлопья**
при “-” реакции – хлопьев нет



Реакция **кольцепреципитации (РП)**

- Используется для поиска в материале **растворимых АГ** (например, реакция Асколи в диагностике сибирской язвы)
- Ставится в узких преципитационных пробирках
- Компоненты:
 - **исследуемый материал**
(в нём ищут растворимый АГ)
 - **преципитирующая сыворотка**
- Учет визуальный:
при “+” реакции на границе
двух растворов образуется
непрозрачное **кольцо преципитата**
при “-” реакции кольца нет



Реакция иммунофлюоресценции (**РИФ**)

- Ставится на стекле
- Компоненты:
 - **исследуемый материал** (в нём ищут АГ)
(фиксируют к стеклу)
 - **люминесцирующая сыворотка**
(- антитела к искомому АГ, меченные **ФИТЦ**)
- Инкубация
- Отмывка компонентов, не вступивших в реакцию
- Учет с помощью **люминесцентного микроскопа**:
при “+” реакции наблюдается **специфическое** (чаще –

Иммуноферментный анализ (ИФА)

(“сэндвич” – вариант)

- Ставят в лунках планшета
- Компоненты:
 - **1-ые АТ** (диагностическая сыворотка)
фиксируются Fc-фрагментом к дну лунки
 - **исследуемый материал** (в нём ищут АГ)
 - Инкубация
 - отмывка от несвязавшихся компонентов
 - **2-ые АТ, меченные ферментом** (пероксидаза) (диагностическая сыворотка)
 - Инкубация
 - отмывка от несвязавшихся компонентов
 - Для учета добавляют **субстрат** для фермента (H_2O_2) и **хромоген** (ТМБ)
- Учет:

или **измеряют оптическую плотность** (измеряют оптическую плотность раствора в лунке)



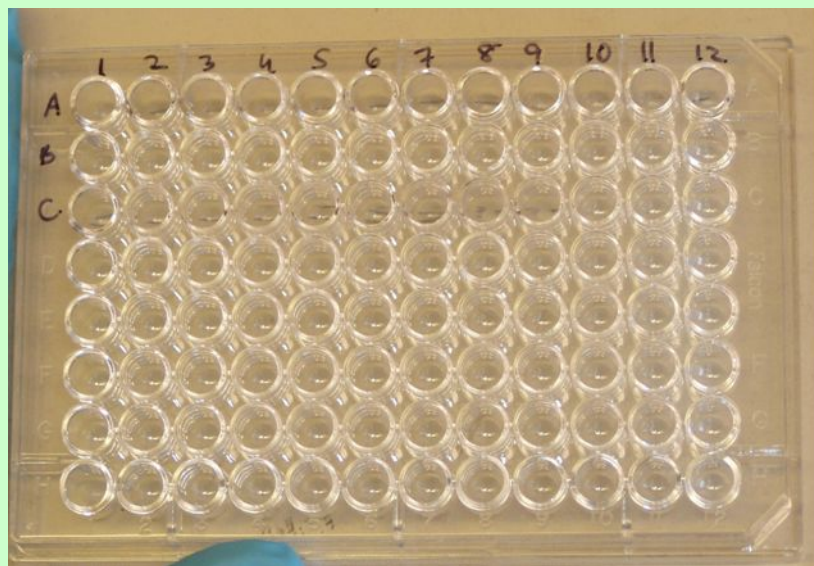
**Антитела к Ag,
меченные ферментом**

Ag

AT

Выявление антигена

Планшет для ИФА



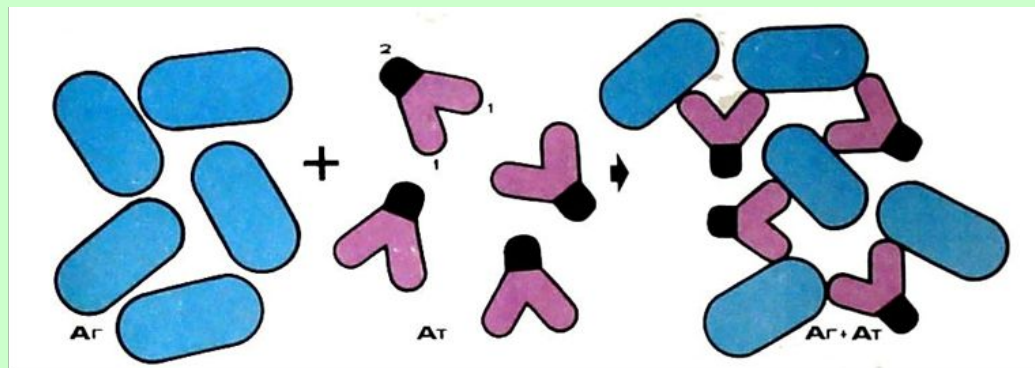
Спектрофотометр (ридер)



СЕРОИДЕНТИФИКАЦИЯ

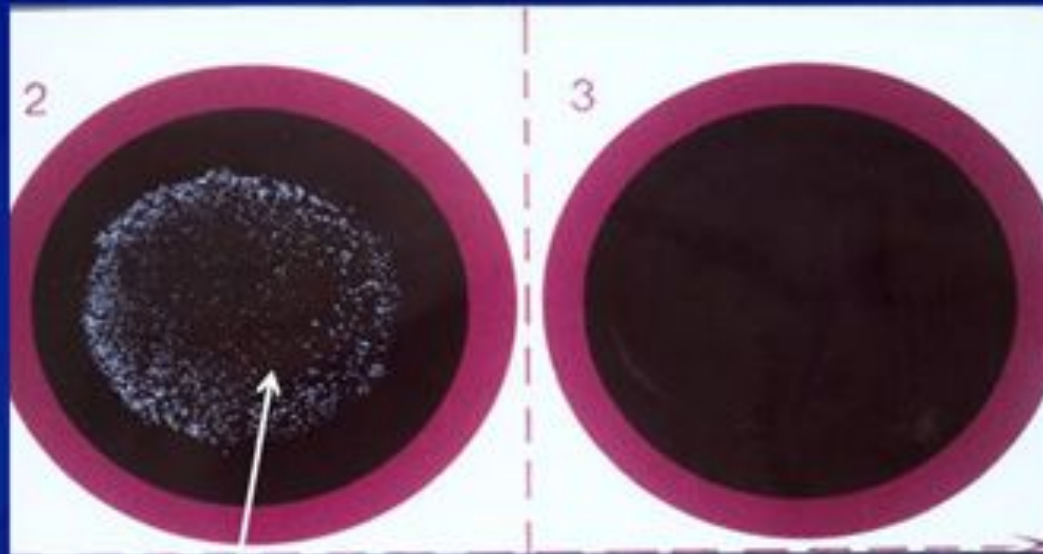
Реакция агглютинации (**РА**)

- Ставится на стекле (**пластинчатая РА**)
- Компоненты:
 - **неидентифицированная чистая культура**
 - диагностическая **агглютинирующая сыворотка**
- Учет визуальный:
при “+” реакции – **белые хлопья**



при “-” реакции – хлопьев нет

Commercial Agglutination Tests



Positive agglutination

GBS is present

Negative agglutination

GBS is not present

A



B

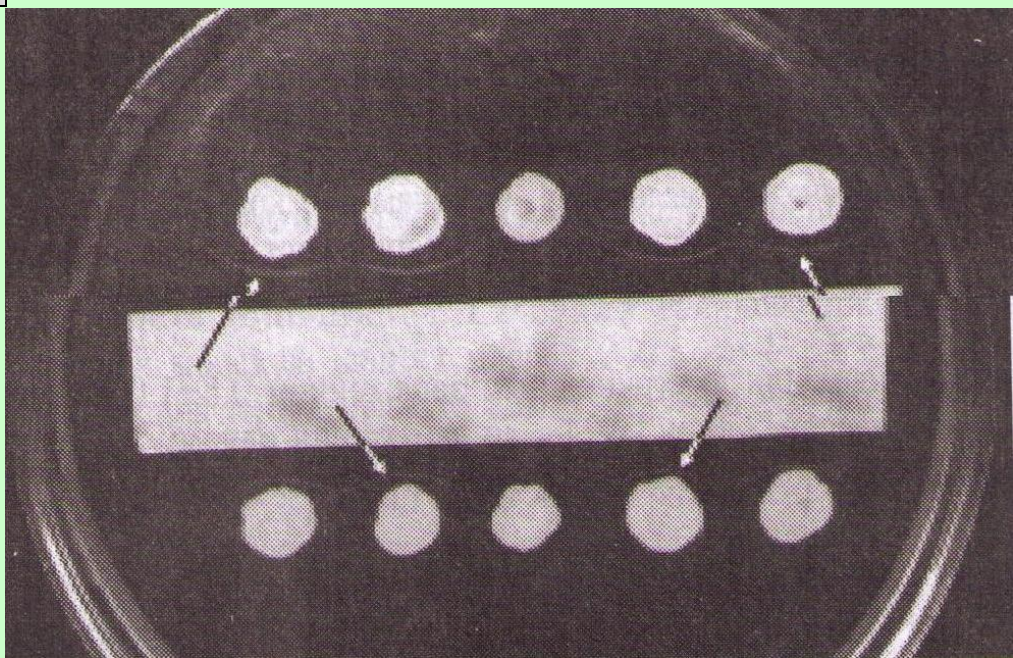
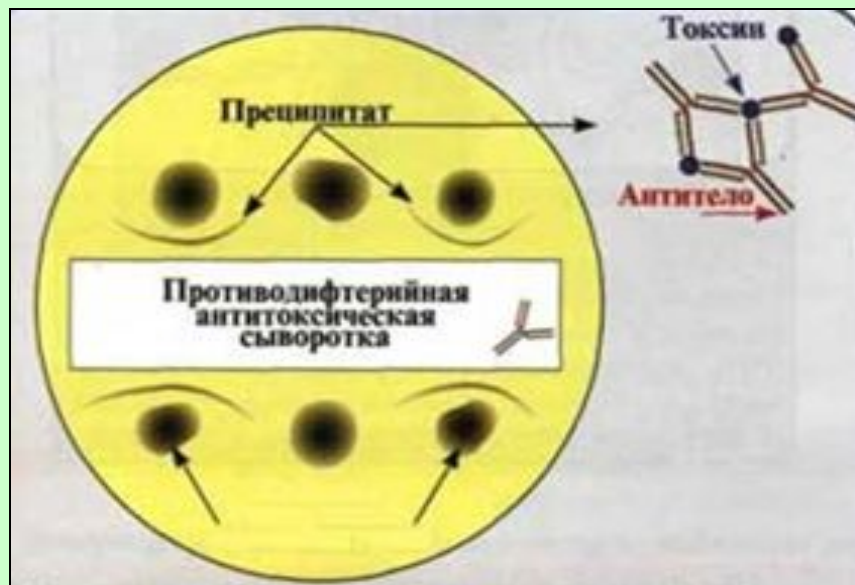


Реакция **преципитации в геле (РП)**

- Используют для определения **токсигенности** чистой культуры (например, при диагностики дифтерии)
- Ставится в чашках Петри с питательным агаром (выполняет роль геля)
- Компоненты:
 - **идентифицированная чистая культура**
 - диагностическая **антитоксическая сыворотка**
- Учет визуальный:
- В основе метода лежит процесс встречной иммунодиффузии токсина и антитоксических АТ в плотной питательной среде.
- При “+” реакции видны **белые “усы” (полосы)** преципитации;

РП в геле

(для определения токсигенности культуры)



Диагностические сыворотки

- Суспензионные АТ
- АТ на частицах латекса
- АТ на клетках *S. aureus*
- Агглютинирующие сыворотки
- Преципитирующие сыворотки
- Антитоксические сыворотки
- Люминесцирующие сыворотки
- Сыворотки, меченные ферментом
- Лизирующие сыворотки, например, гемолитическая

СЕРОДИАГНОСТИКА

Принципы серодиагностики

1. Определение количества (**титра**) АТ в сыворотке крови пациента.

2. Титр АТ пациента сравнить с **диагностическим титром**.

Если титр АТ пациента **равен или выше** диагностического, это свидетельствует в пользу текущего заболевания.

3. Изучение изменений титра АТ **в динамике** (в парных сыворотках с интервалом 7 – 14 – 21 дней)

4. Определение титра АТ **разных классов**:

IgM, IgG, IgA

Диагностикумы:

1. **Корпускулярные**
2. **Некорпускулярные**
3. **Эритроцитарные**

Корпускулярный диагностикум

представляет собой **взвесь клеток микроорганизмов**, инаktivированных физическим или химическим способом; редко – живые клетки.

Некорпускулярный диагностикум

содержит **антигенные фракции**, полученные путем экстракции (чаще всего химической) из клеток микроорганизмов.

Эритроцитарные диагностикумы

содержат **эритроциты человеческой или бараньей крови**, **сенсibilизированные АГ микроорганизма**, т.е. АГ микроорганизма адсорбированы на поверхности эритроцитов.

Для создания прочной связи АГ с поверхностью эритроцитов

Реакция агглютинации (РА)

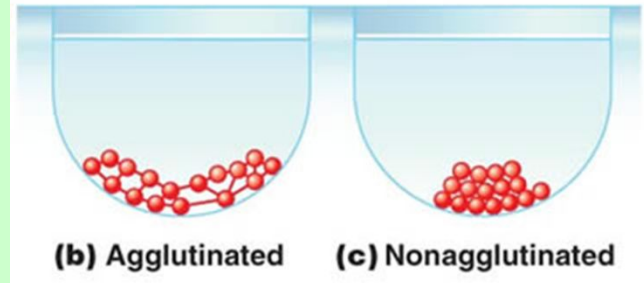
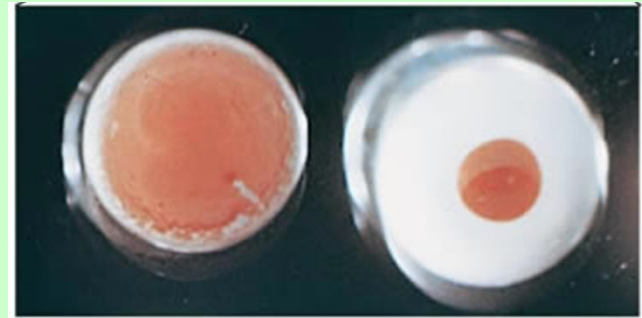
- Ставится в пробирках (развернутая РА)
- Компоненты:
 - раститрованная **сыворотка больного** (в ней ищут АГ к определенному АГ)
 - **бактериальный диагностикум**
- Учет визуальный:
 - при “+” реакции – **белые хлопья**
 - при “-” реакции – **отсутствие хлопьев**
- Титр АГ соответствует **максимальному разведению сыворотки** пациента, в котором реакция ещё положительная.



Tube Agglutination Test

Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (**РПГА** или **РНГА**)

- Ставится в планшете (**развернутая РПГА**)
- Компоненты:
 - раститрованная **сыворотка больного** (в ней ищут АТ к определенному АГ)
 - **эритроцитарный диагностикум** (АГ бактерий, адсорбированные на эритроцитах, предварительно обработанных формалином и танином)
- Учет визуальный:
 - при “+” реакции – осадок в виде **“зонтика”**
 - при “-” реакции – осадок в виде **“пуговки”**



Результат РНГА (РПГА)



Положительный («зонтик»)

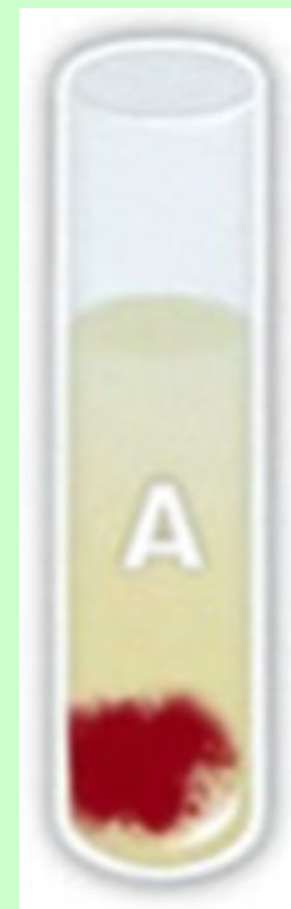
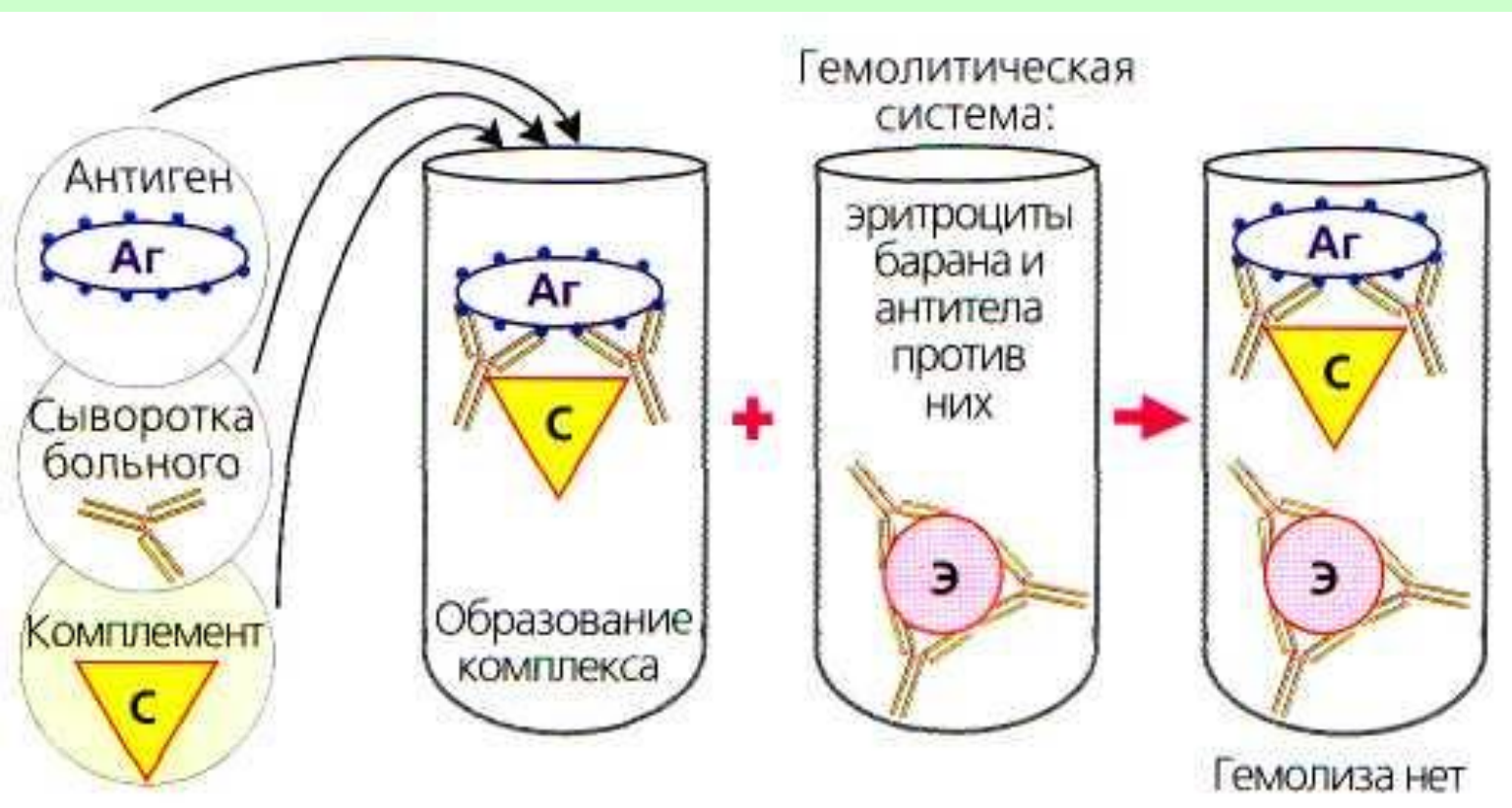
Отрицательный («пуговка»)



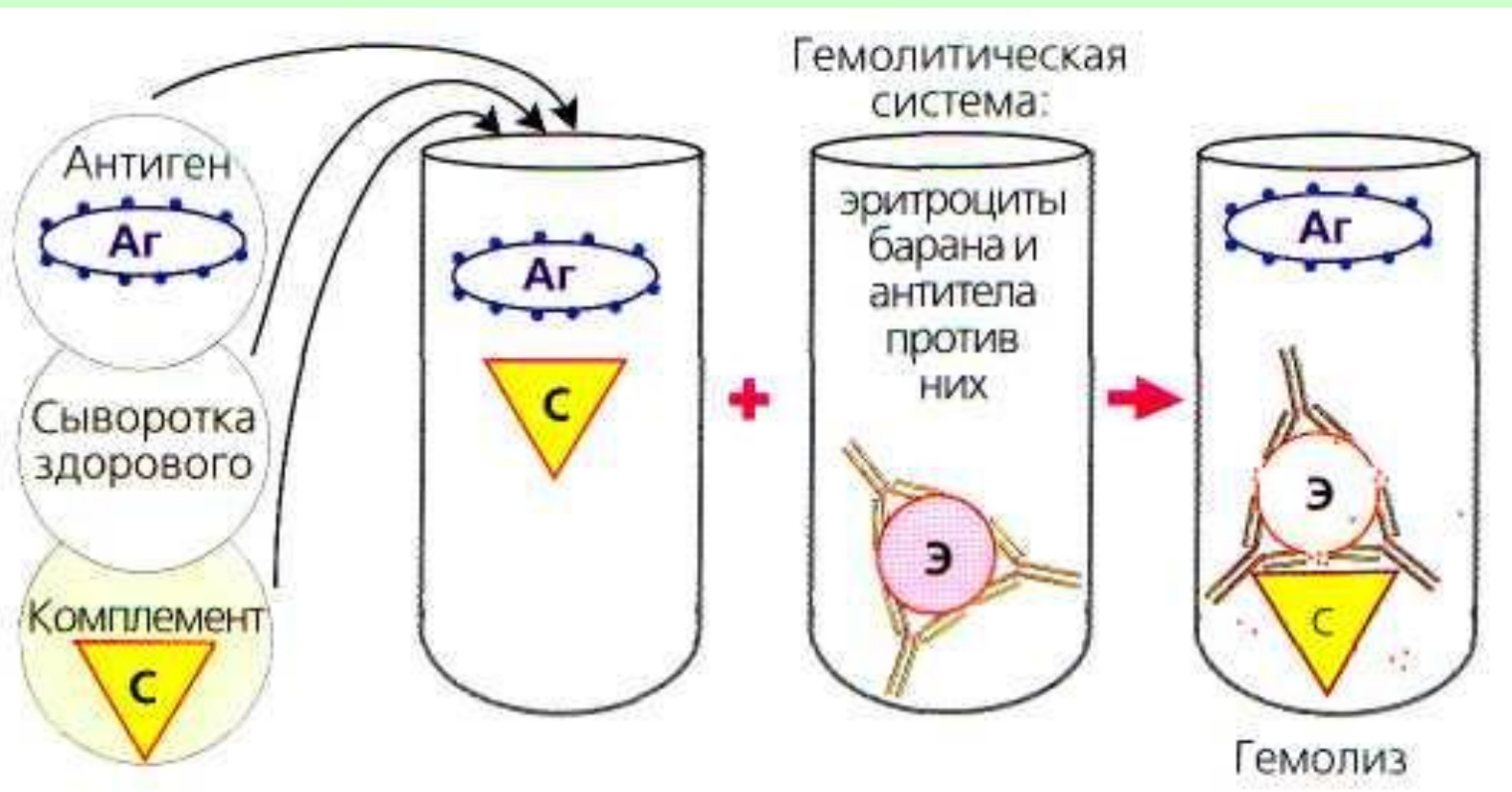
Реакция связывания компонента (РСК)

- Ставится в пробирках
- Компоненты:
 - сыворотка больного (в ней ищут АТ к определенному АГ)
 - диагностикум
 - компонент
- Для учета реакции добавляют индикаторную систему:
- эритроциты барана
- гемолитическая сыворотка (АТ против эритроцитов барана)
- Учет – визуальный:
 - при “+” реакции – осадок из эритроцитов
 - при “–” реакции – гемолиз (“лаковая кровь”)

Положительная РСК



Отрицательная РСК



Подготовка ингредиентов для постановки РСК

- Исследуемую сыворотку прогревают на водяной бане при $+56^{\circ}$ в течение 30 минут для инактивации собственного компонента
- Используют сухой консервированный компонент, полученный из сыворотки крови морской свинки.
- Определяют **титр** и **рабочую дозу компонента** в реакции иммунного гемолиза.

Титр компонента — минимальная его концентрация, обеспечивающая полный лизис 3%-ной взвеси бараньих эритроцитов в присутствии гемолитической сыворотки.

Рабочая доза компонента берётся **на 25 %** выше его титра.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

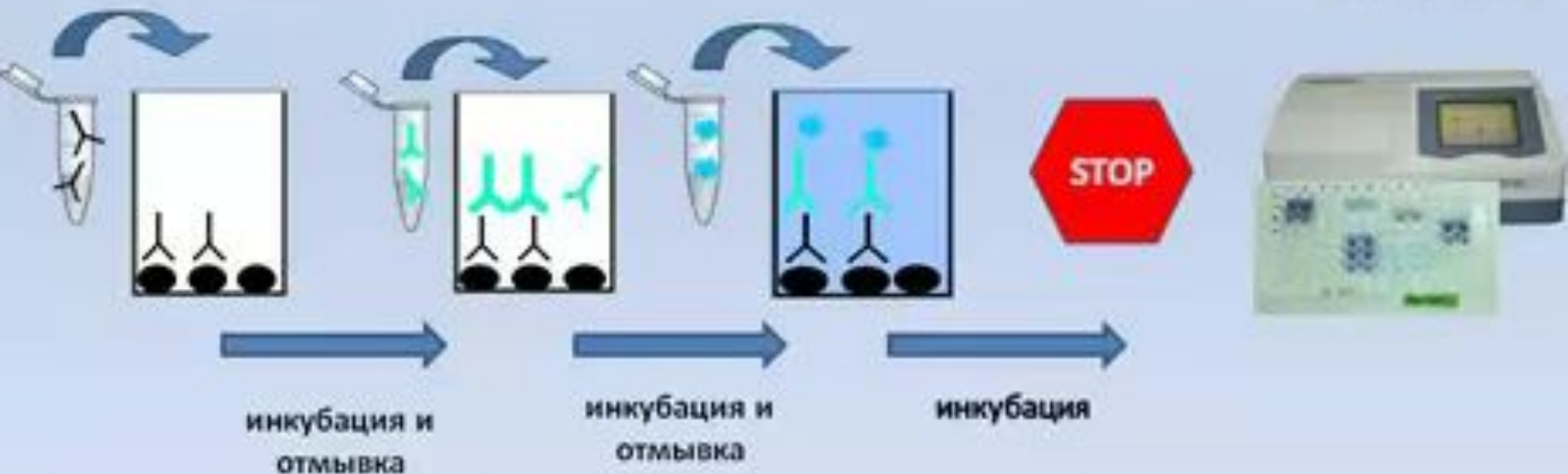
- Ставят в лунках планшета
- Компоненты:
 - **АГ бактерий (диагностикум)**
фиксированы на дне лунки
 - **сыворотка пациента** (в ней ищут АТ)
 - Инкубация
 - отмывка от несвязавшихся компонентов
 - **антиглобулиновая сыворотка (АГС)** (антитела к антителам),
меченная ферментом (пероксидаза)
 - Инкубация
 - отмывка от несвязавшихся компонентов
 - Для учета в конце реакции добавляют **субстрат** для фермента
(H_2O_2) и **хромоген** (ТМБ)
- Учет:

ОБРАЗЦЫ
СЫВОРОТОК

АГС, меченная
ферментом

Субстрат и
хромоген

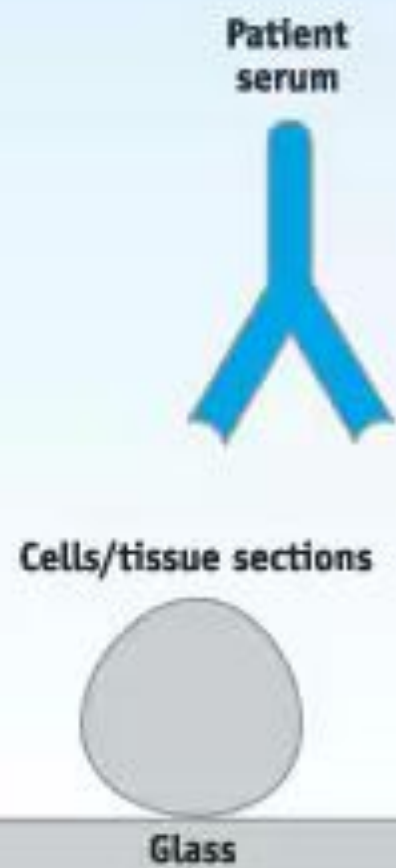
УЧЕТ
РЕЗУЛЬТАТОВ



Непрямая реакция иммунофлюоресценции (**нРИФ**)

- Ставится на стекле
- Компоненты:
 - **АГ бактерий (диагностикум)**
фиксируют к стеклу
 - **сыворотка пациента** (в ней ищут АТ)
 - Инкубация
 - отмывка от несвязавшихся компонентов
 - **антиглобулиновая сыворотка (АГС), меченная ФИТЦ**
 - Инкубация
 - отмывка от несвязавшихся компонентов
- Учет с помощью **люминесцентного микроскопа**:

1



2

Fluorescein-labelled antibody



3

Readings by
fluorescence microscopy



Иммунный блоттинг (иммуноблот, western blot, ИБ)

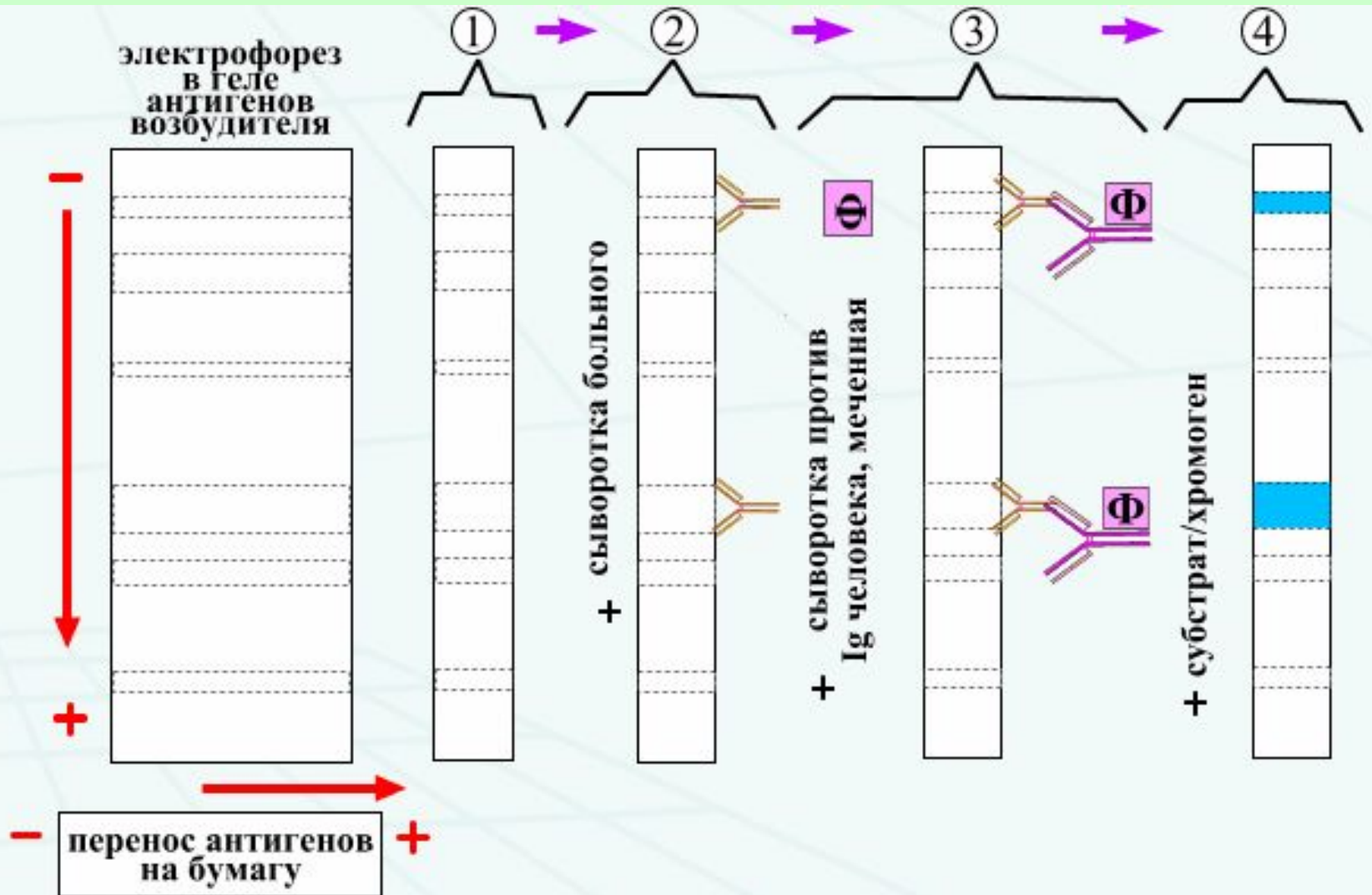
– высокоспецифичный и высокочувствительный референтный (экспертный) метод, подтверждающий диагноз для пациентов с положительным или сомнительным результатами анализов, полученных в ходе серодиагностики (ИФА).

- **Этот метод выявления АТ к отдельным АГ возбудителя основан на проведении ИФА на нитроцеллюлозных мембранах (стрипах),**
- **на которые в виде отдельных полос нанесены электрофоретически разделенные высоко-очищенные лизатные или рекомбинантные АГ микроорганизма.**

Иммуноблотинг

- **Индивидуальная тест-полоска (стрип)** инкубируется с исследуемой сывороткой.
- Содержащиеся в сыворотке АТ связываются с АГ м/о, нанесёнными на тест-полоску.
- Отмывают
- Наносят АГС, меченную ферментом
- Инкубируют
- Отмывают
- Добавляют субстрат и хромоген
- Инкубируют
- Учет результатов:

Иммуноблотинг



Иммуноблоттинг при ВИЧ-инфекции

