# 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 фибрилярные
- **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

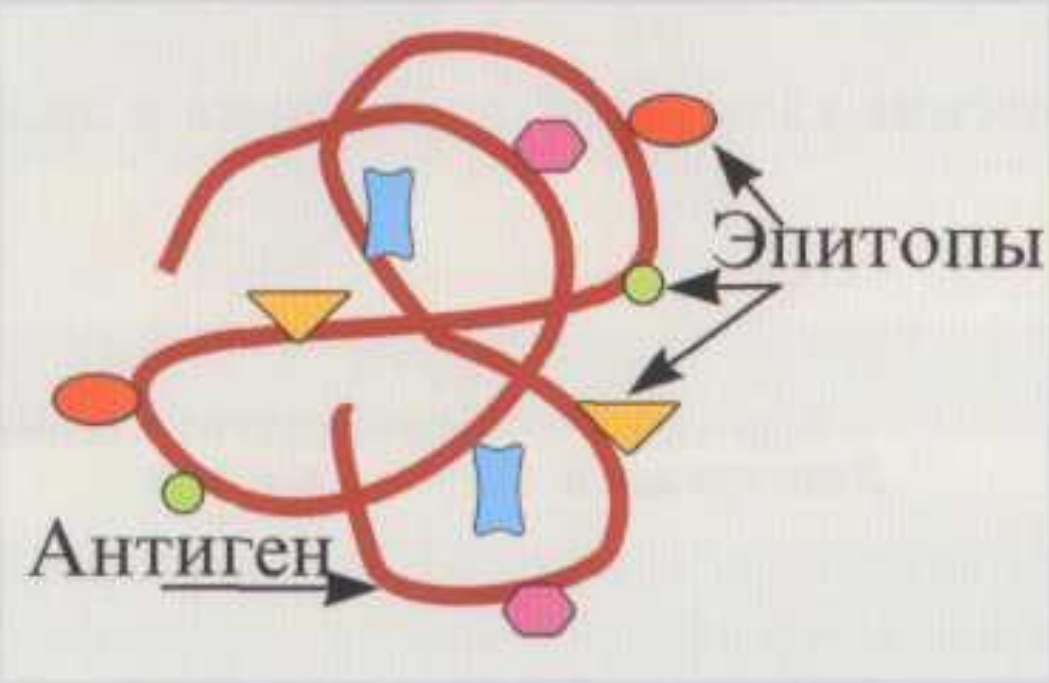
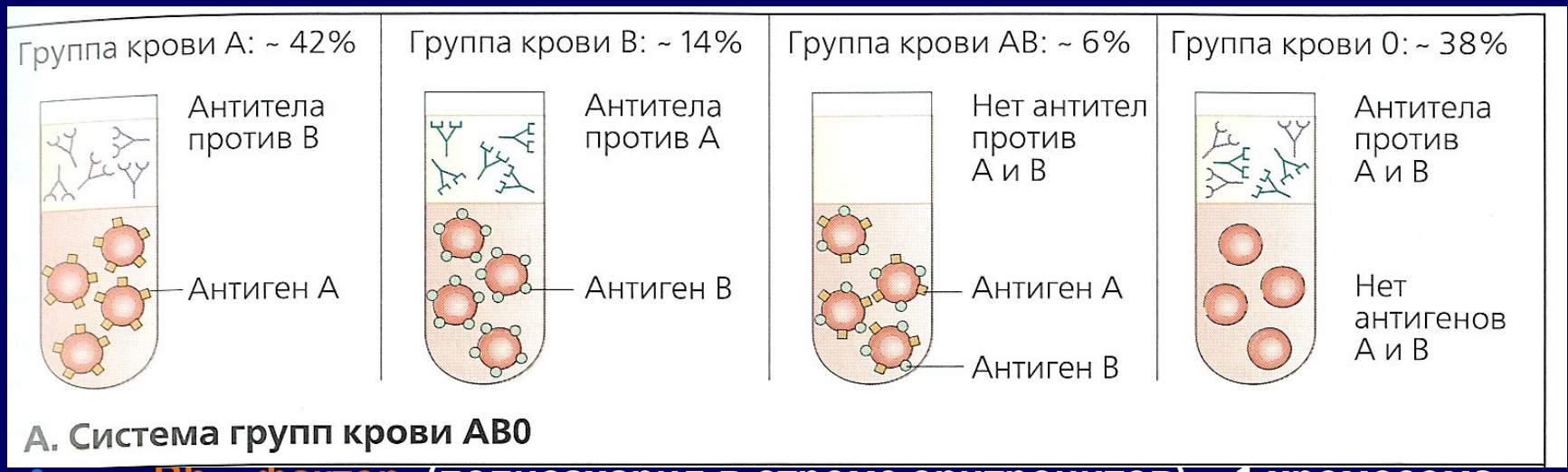



**Рис. 7.3.** Эпитопы антигена: антиген содержит несколько различных или повторяющихся эпитопов

# Антигены организма человека

1. **АГ групп крови – система АВО (гены расположены в 9 хромосоме)**
   - **0 (I), A (II), B (III), AB (IV)**



А. Система групп крови АВ0

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

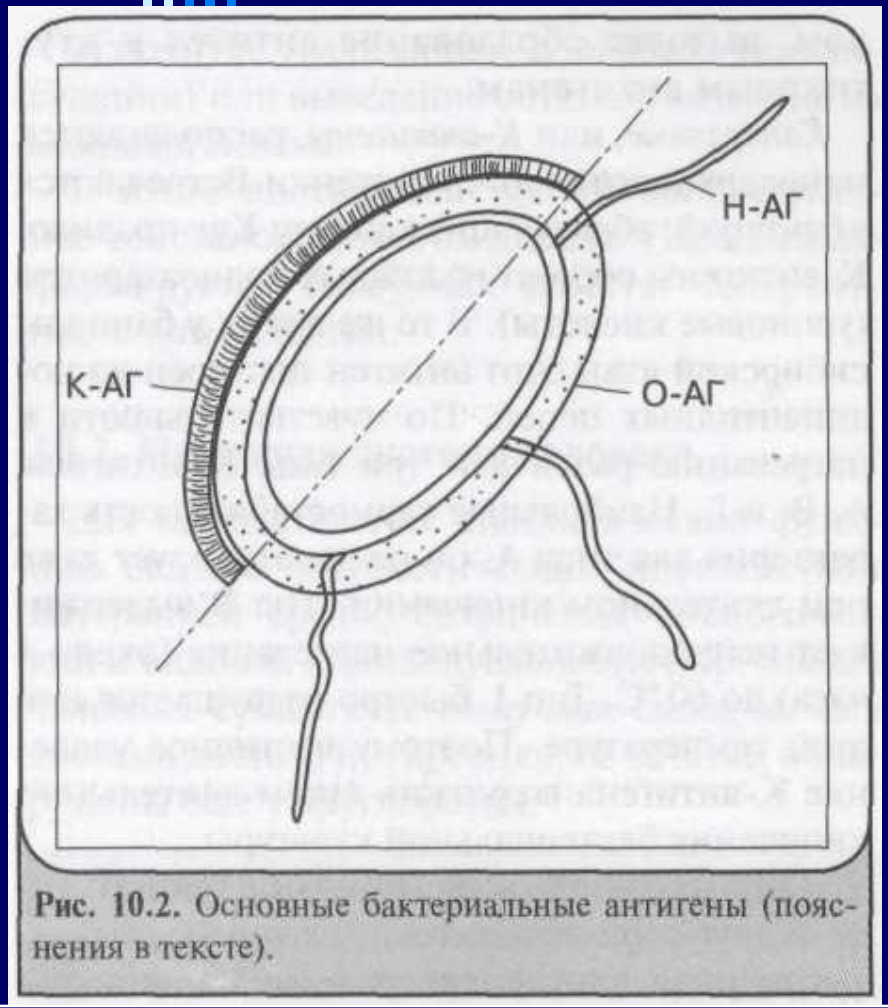



**Рис. 10.2.** Основные бактериальные антигены (пояснения в тексте).

- К - антиген
- Н - антиген
- L,B, Vi - антигены
- A, M – антигены
- О - антиген
- Экзотоксины

# Антигены вирусов

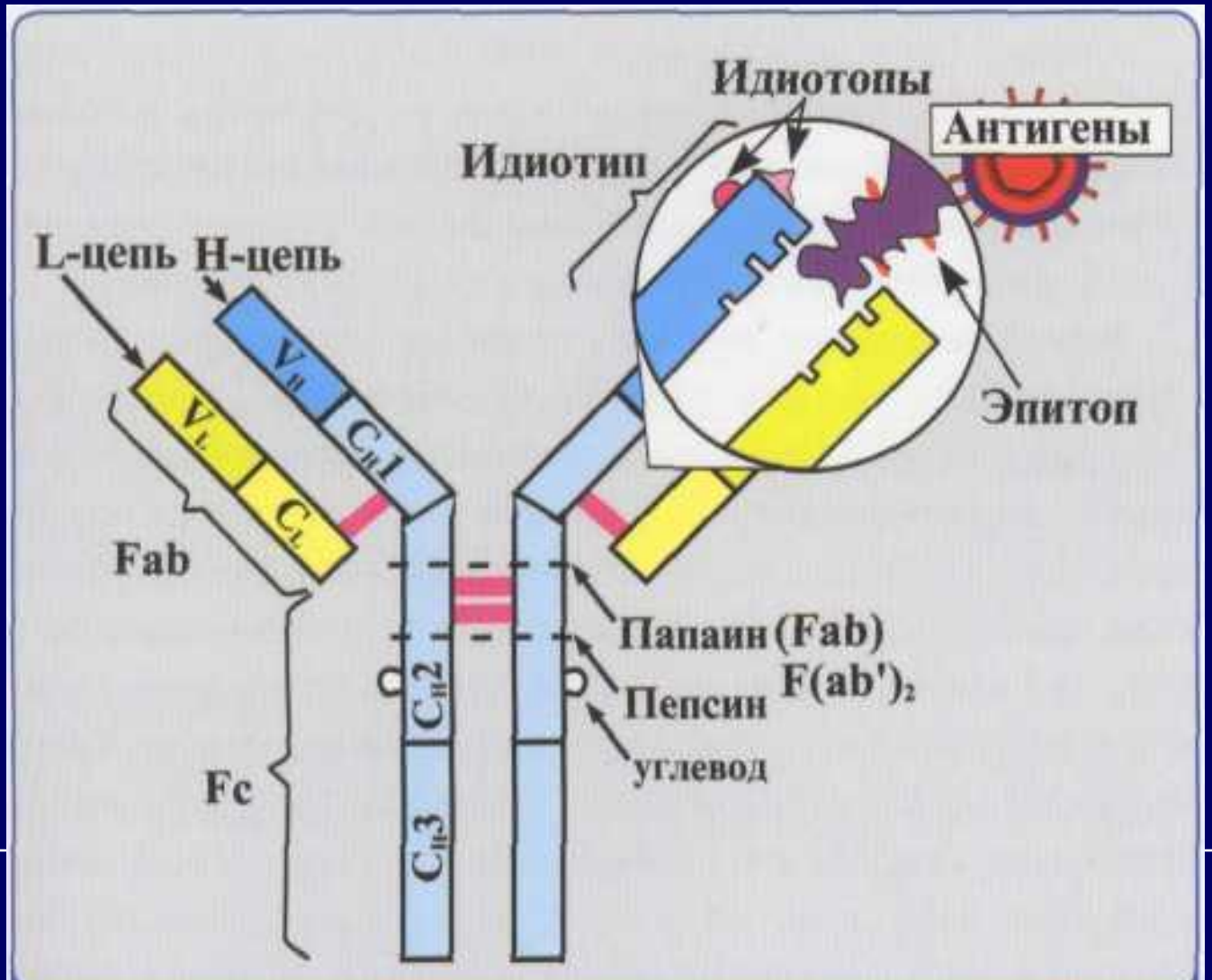
- S – антиген (нуклеокапсид)
  - Коровые или ядерные
  - Капсидные
- V - антигены (поверхностные)
  - H – гемагглютинин
  - N – нейраминидаза (экзофермент)
- Суперкапсидные

# Антитела

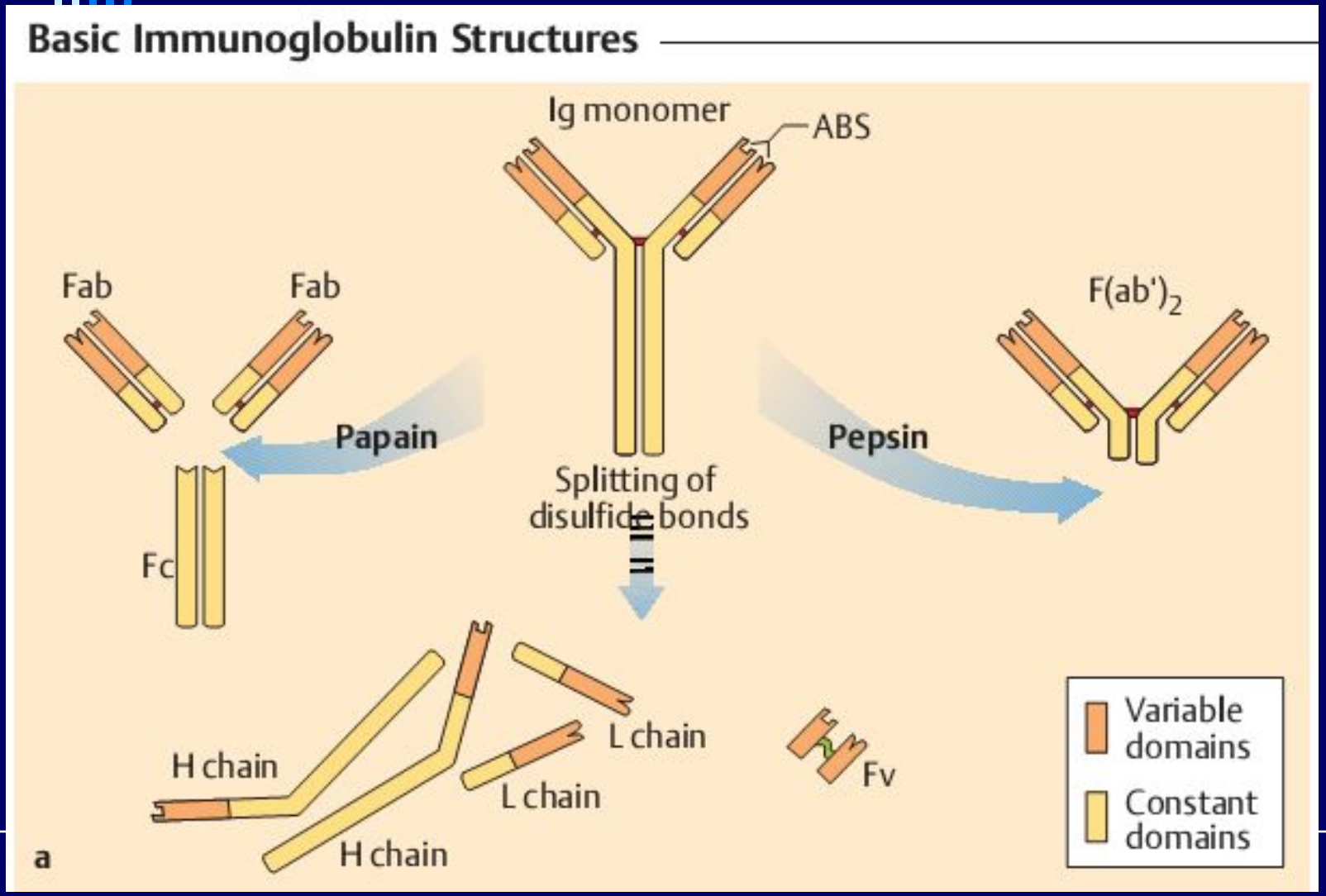
– белки сыворотки крови (иммуноглобулины), вырабатываются в ответ на введение антигена, способны специфически связываться с антигеном и участвовать во многих иммунологических реакциях.

Синтезируются В лимфоцитами.

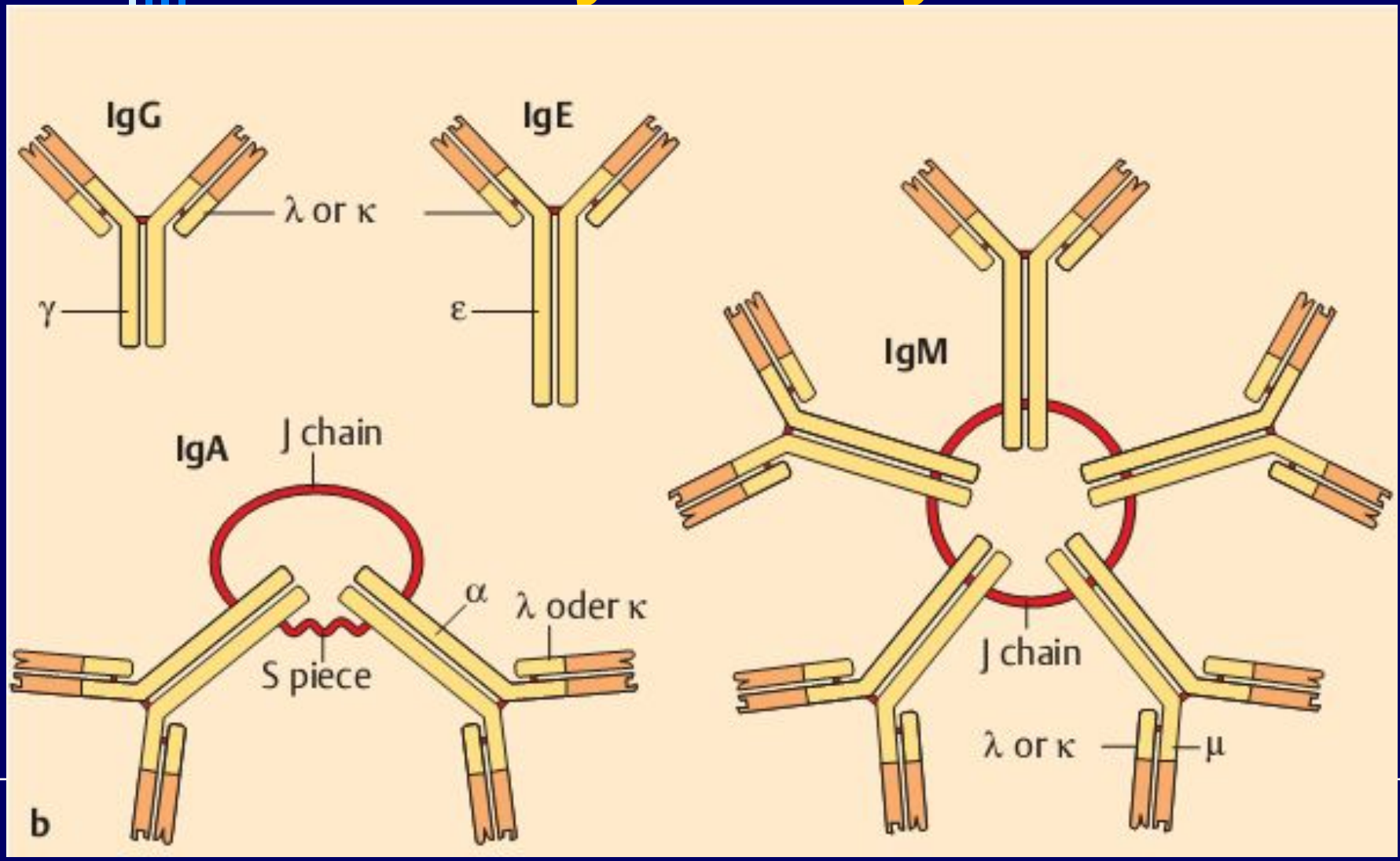
# Структура иммуноглобулинов



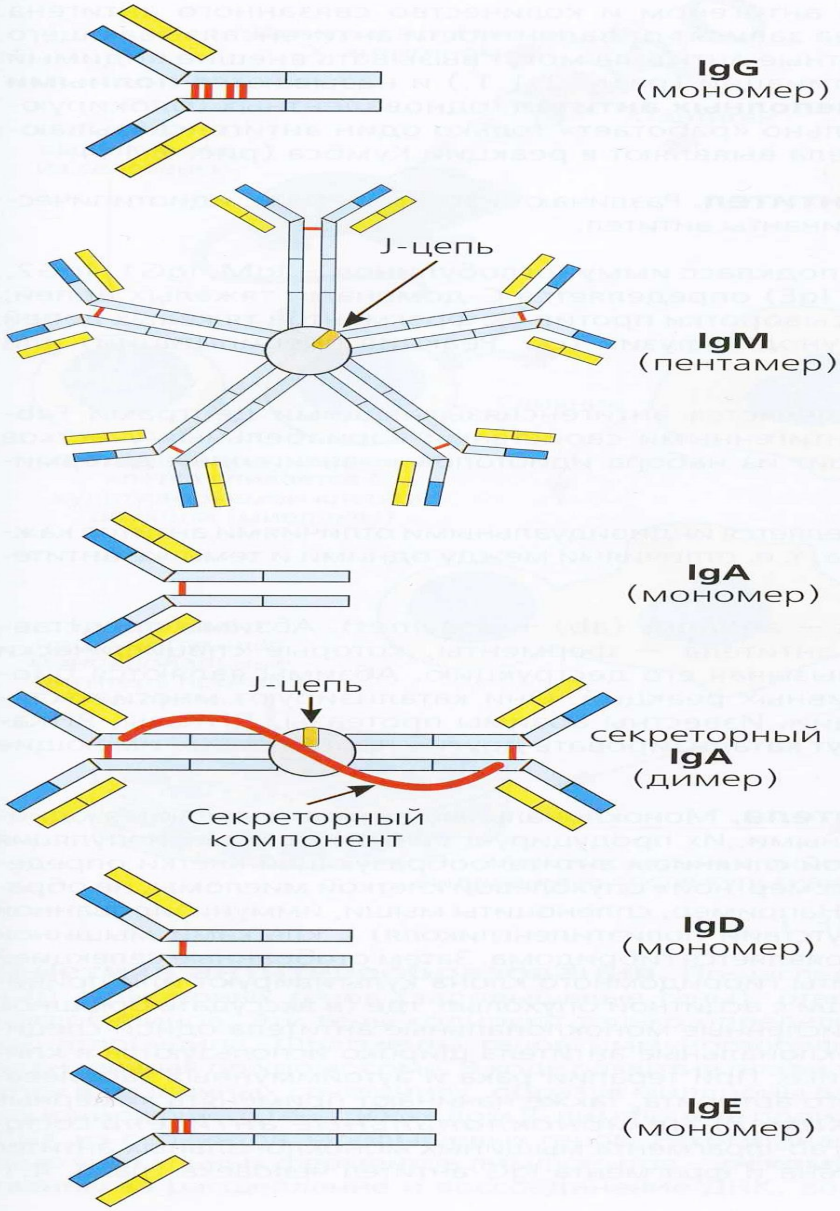
# Строение антитела



# 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 B-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.

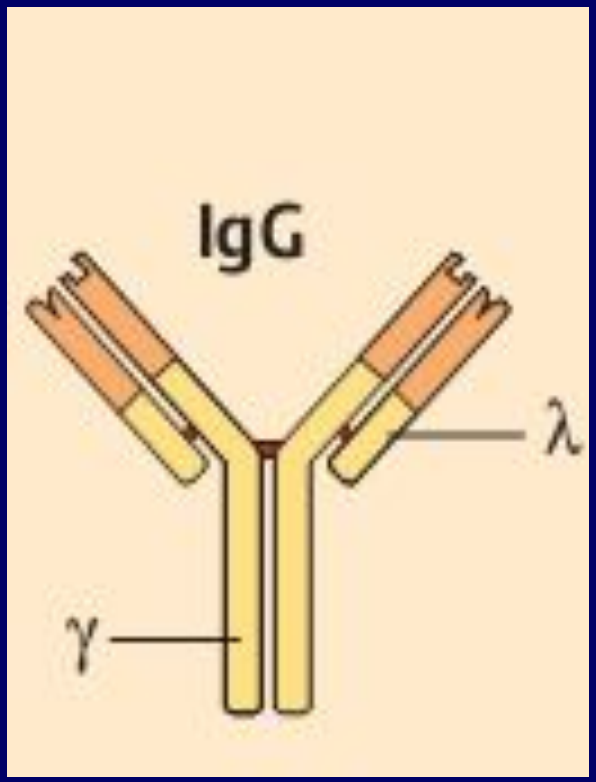
**IgD** (иммуноглобулин D составляет около 0,1 % антител сыворотки крови):

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

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

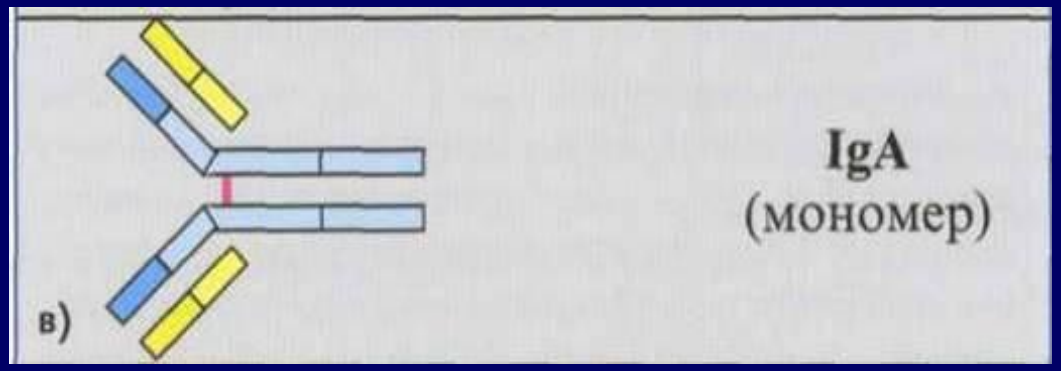
1. Период полураспада около 2 дней.
2. Мономер, 2 эпитопсвязывающих участка.
3. Участвует в противопаразитарном иммунитете и в ответе на аллергены.
4. Fc-фрагмент связывается с тучными клетками и базофилами; последующее взаимодействие с аллергеном запускает аллергическую реакцию.

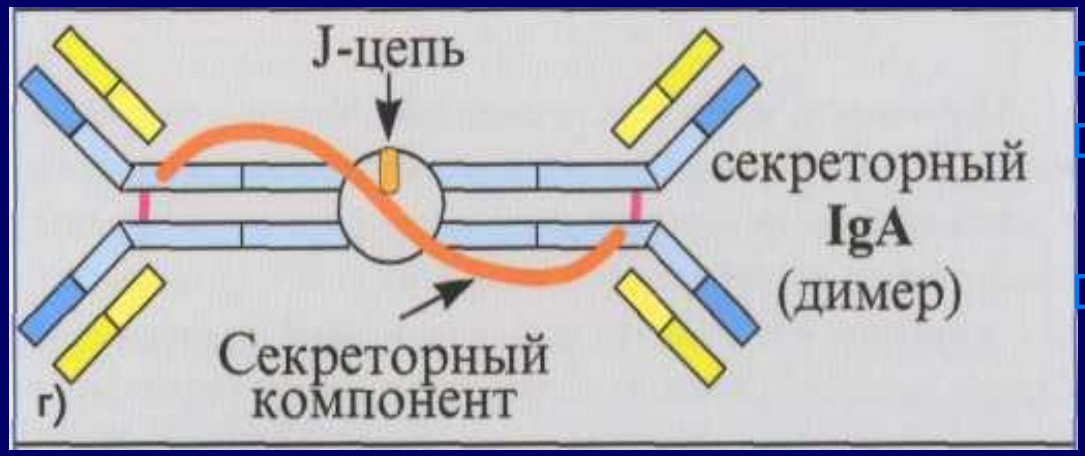
# Иммуноглобулин G




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

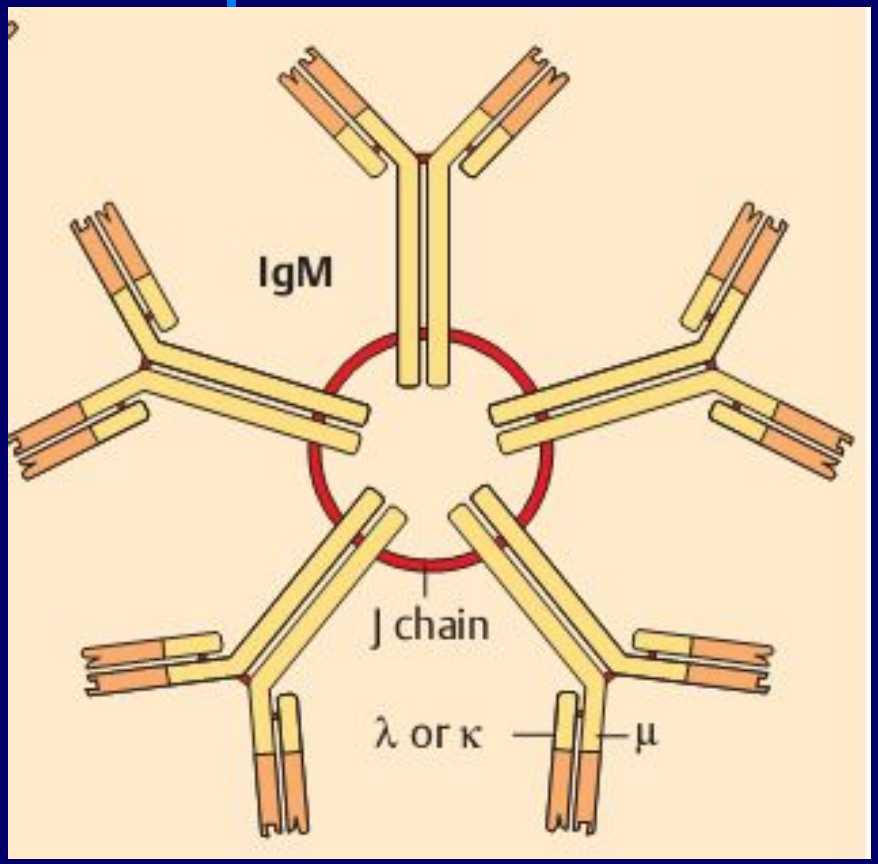
# Иммуноглобулин А



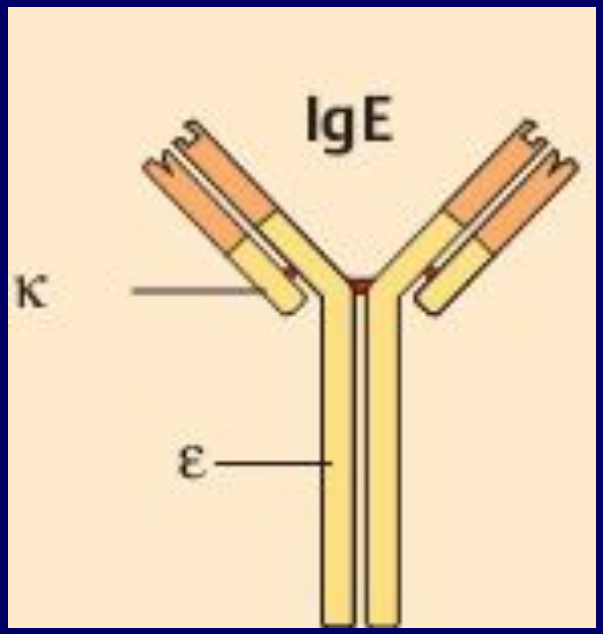

- **Сывороточный IgA – 2 паратопа.**
- **10-15%**
- **1,3-5,1г/л**
- **Секреторный sIgA**
- **4-6 паратопов**
- **Содержит S-и J-пептиды**
- **Устойчив к действию протеаз**

# Иммуноглобулин М

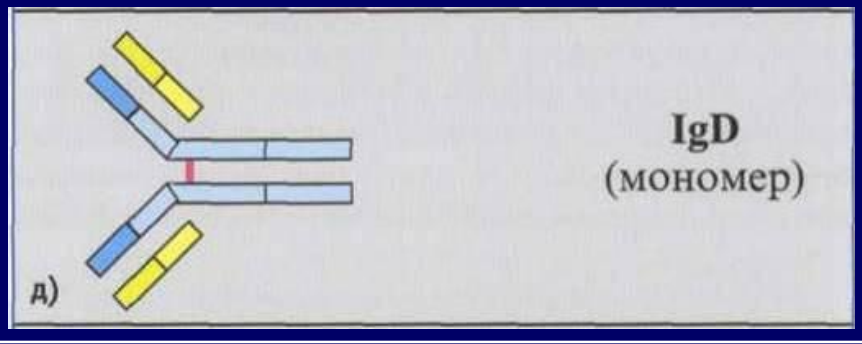



- Пентамер
- 10 паратопов
- 5-10% всех иммуноглобулинов
- М1 иМ2
- 0,8 – 1,7 г/л
- Образуется первым на антигенный стимул
- Не проходит через плаценту

# 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

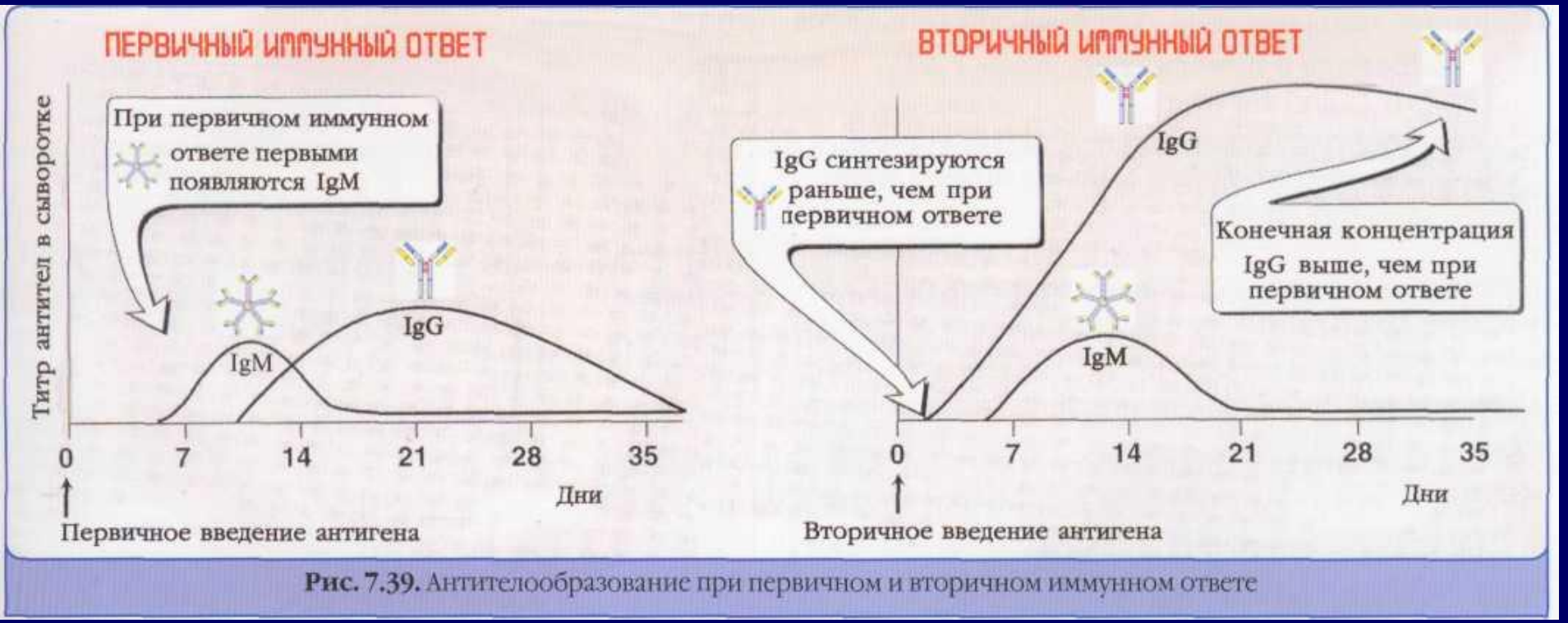



**Рис. 7.39.** Антителообразование при первичном и вторичном иммунном ответе

# 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).

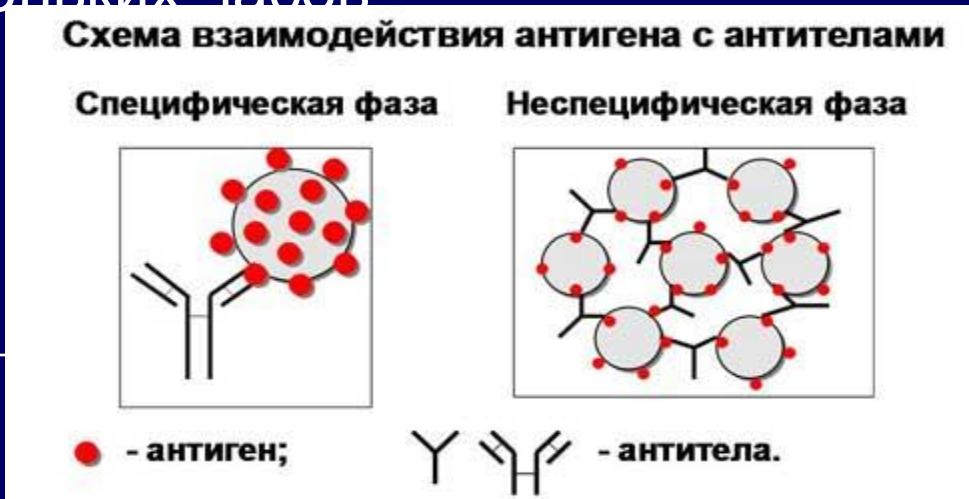
# Серодиагностика

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

# Фазы :

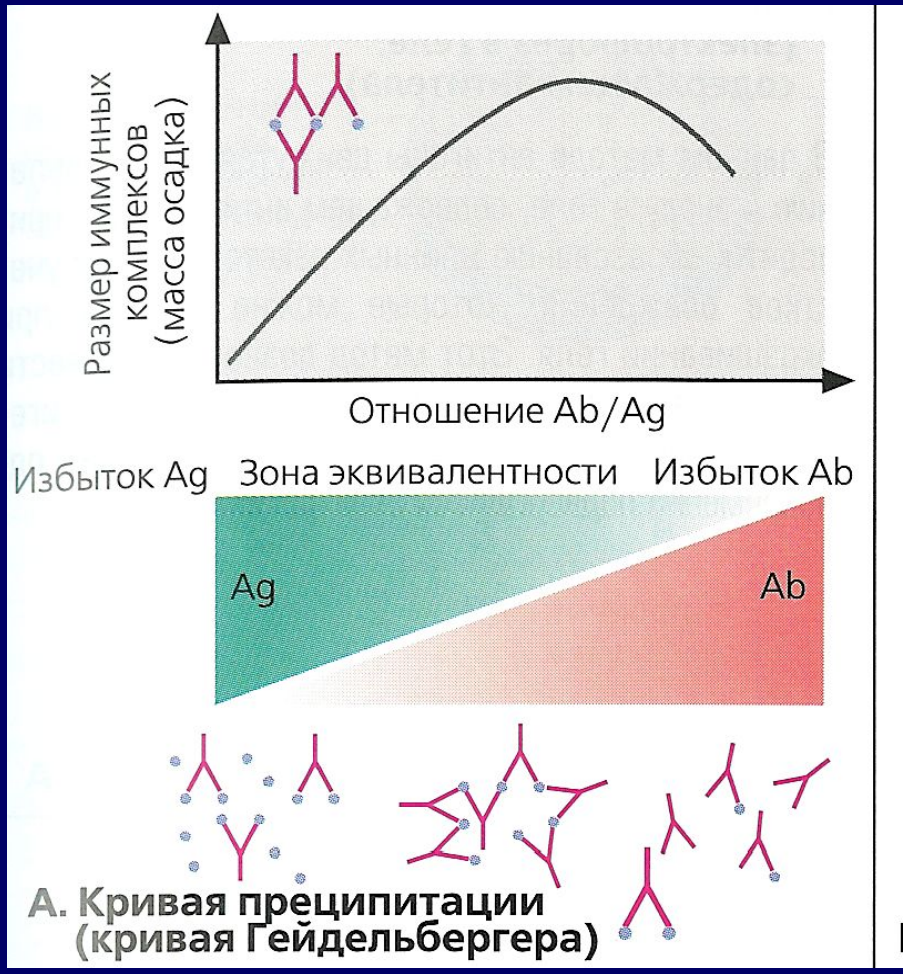
1) ***специфическая*** - фаза взаимодействия, в которой происходит комплементарное соединение активных центров антител (паратопов) и эпитопов антигена. Обычно эта фаза длится несколько секунд или минут;

2) ***неспецифическая*** - фаза проявления, характеризуется внешними признаками образования иммунных комплексов. Эта фаза может развиваться от нескольких минут до нескольких часов



- 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.

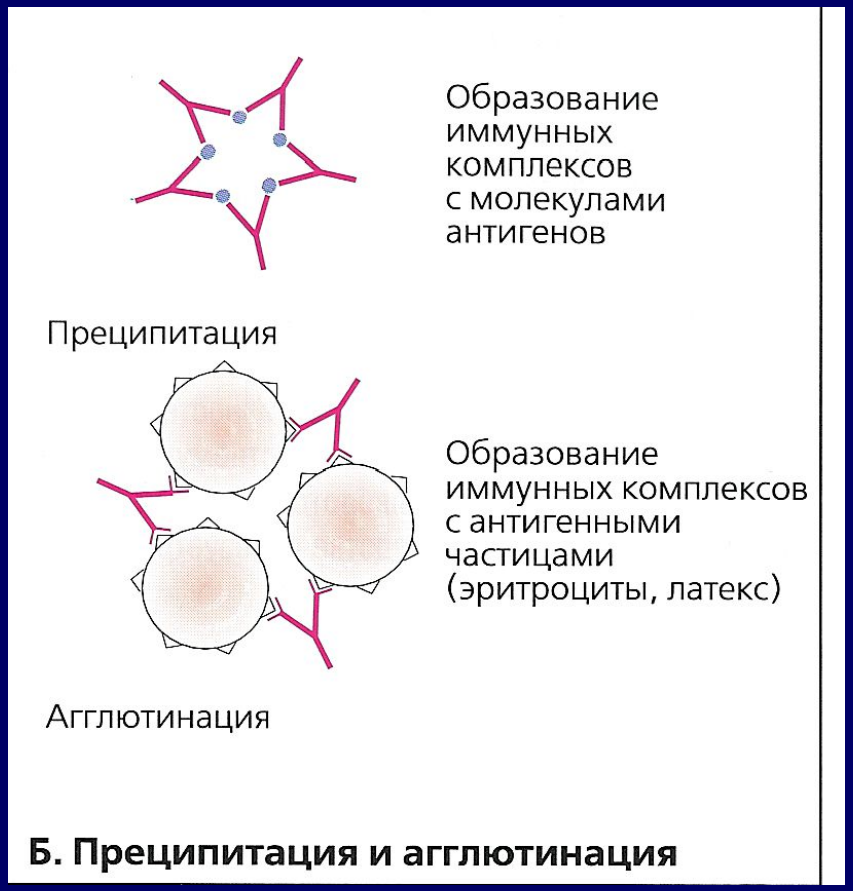


# Чувствительность методов серологических реакций.

| 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***




**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)

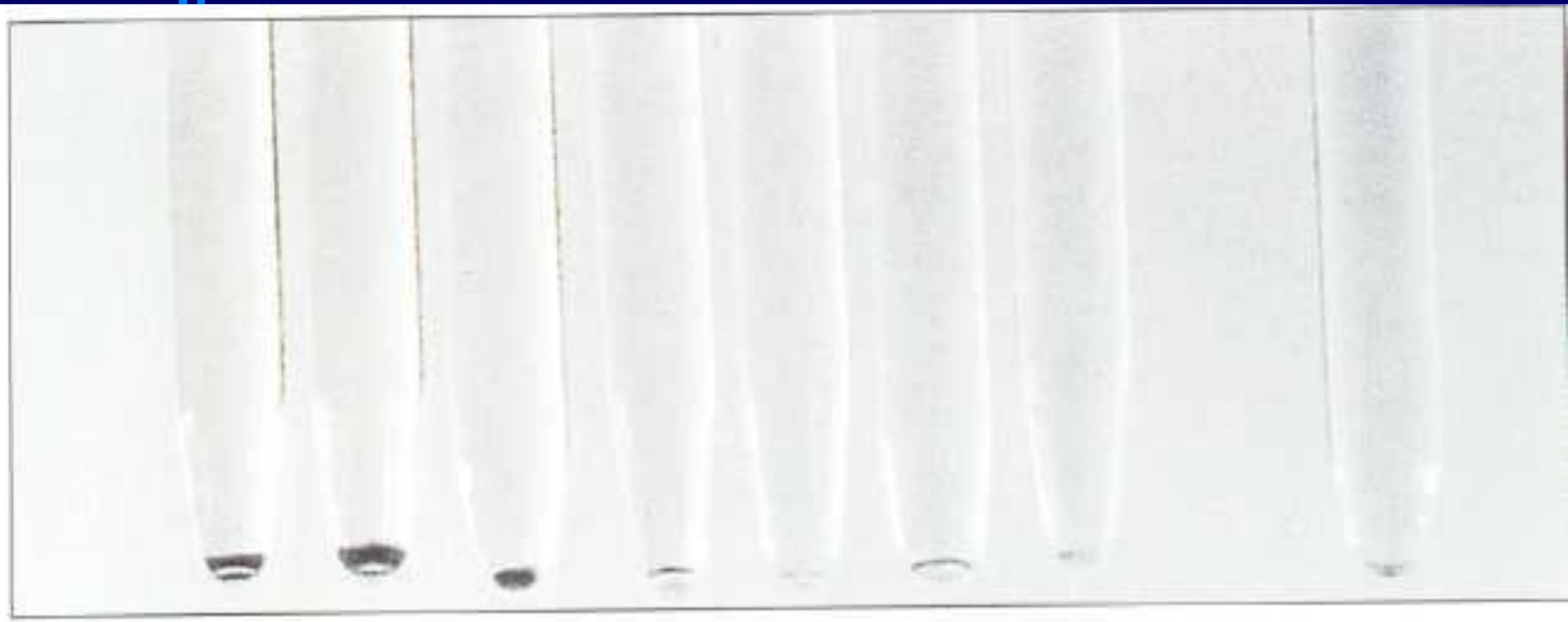
- Ставится  на предметном стекле при комнатной температуре.
- Пастеровской  пипеткой на стекло наносят раздельно каплю сыворотки в разведении 1:10 - 1:20 и контрольную каплю изотонического раствора натрия хлорида.
- В ту и другую бактериологической петлей вносят колонии или суточную культуру бактерий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

# Ориентировочная реакция агглютинации (РА)

- Реакции учитывают через несколько минут визуально, иногда с помощью лупы (х5). При положительной РА в капле с сывороткой отмечают появление крупных и мелких хлопьев, при отрицательной - сыворотка остается равномерно мутной.

1 - контроль; 2 – агглютинат (хлопья) положительная реакция.

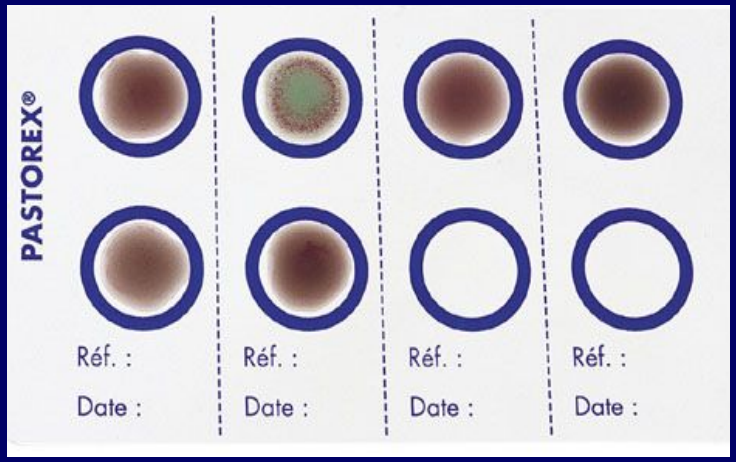
# Линейная агглютинация



**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




BIO-RAD

# 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 агглютининами в обычных РА увидеть не удается

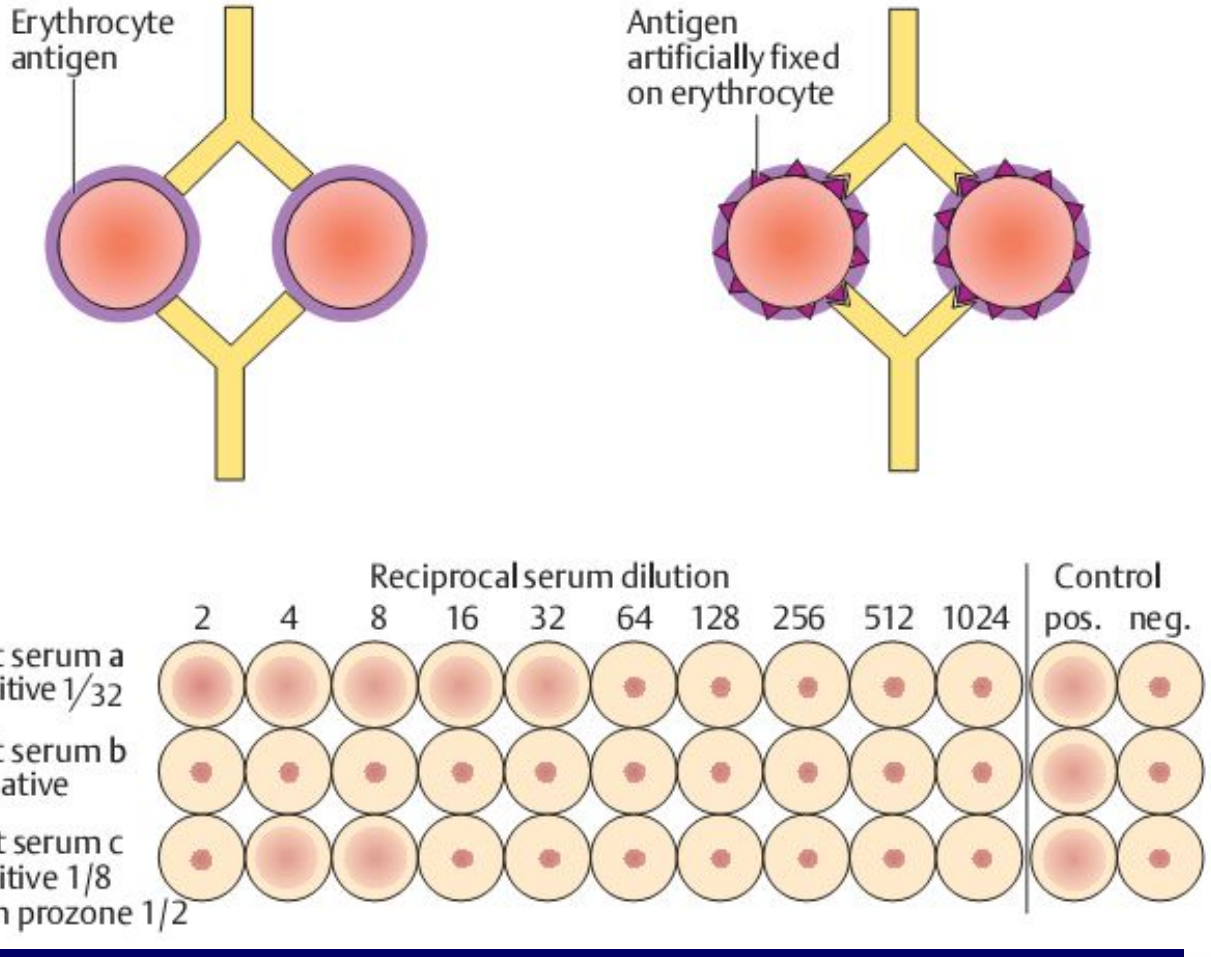
- 2) для выявления антител в сыворотках больных к этим высокодисперстным веществам и мельчайшим микроорганизмам.

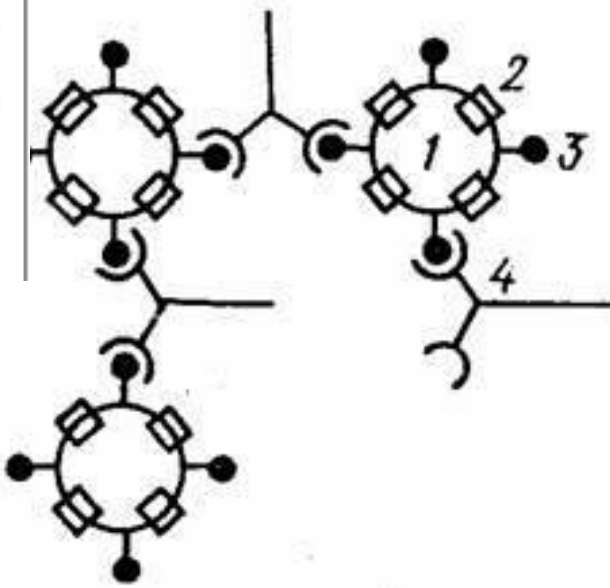
- **Под непрямой, или пассивной, агглютинацией понимают реакцию, в которой антитела взаимодействуют с антигенами, предварительно адсорбированными на инертных частицах** (латекс, целлюлоза, полистерол, оксид бария и др. или эритроциты барана, I(0)-группы крови человека)

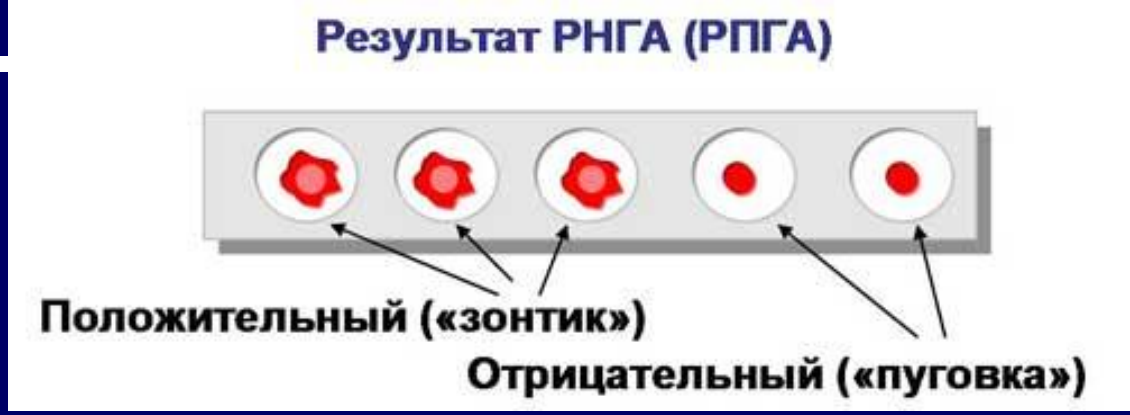
# Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА)

- 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.
- Сенсибилизированные 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



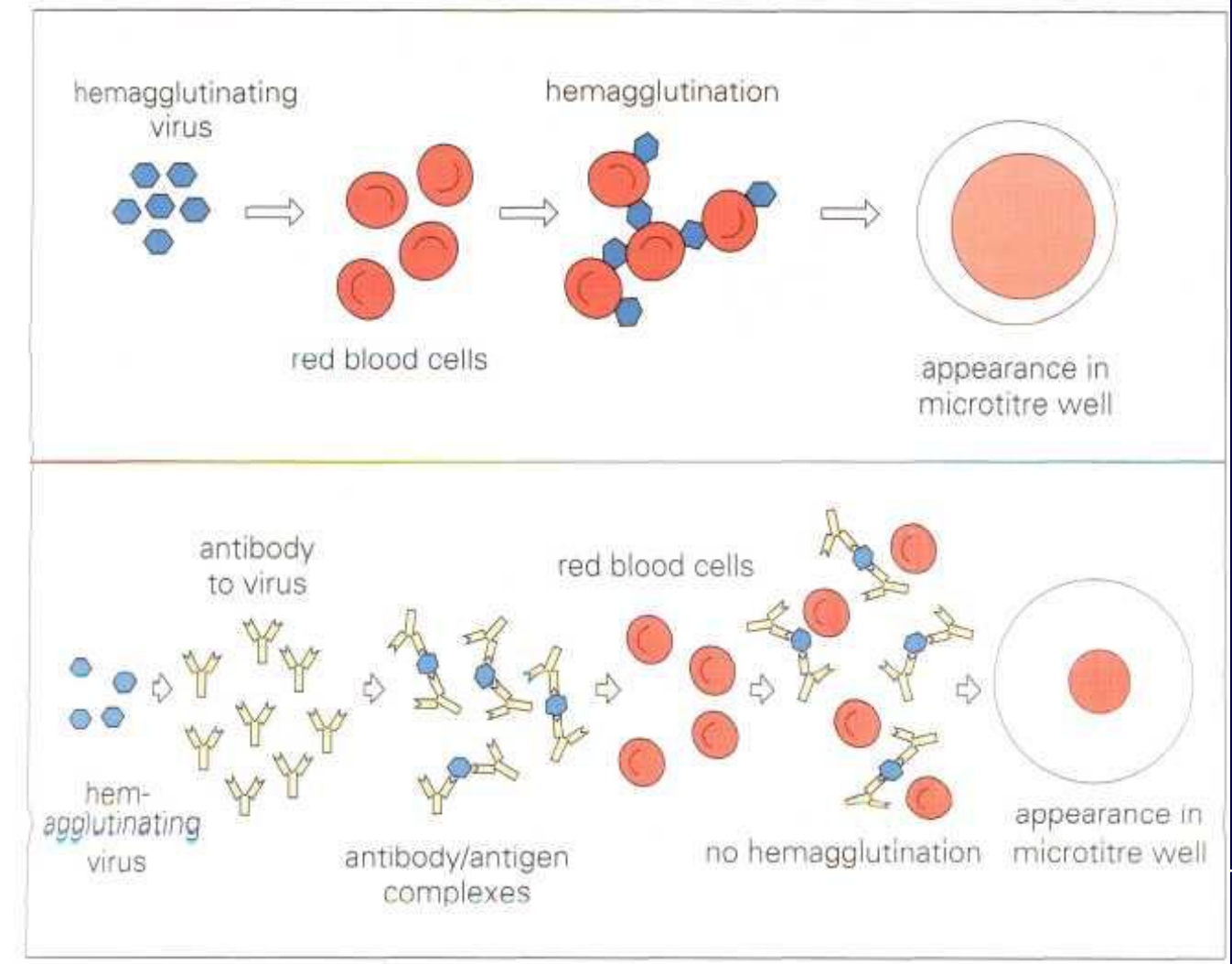



***Постановка***.

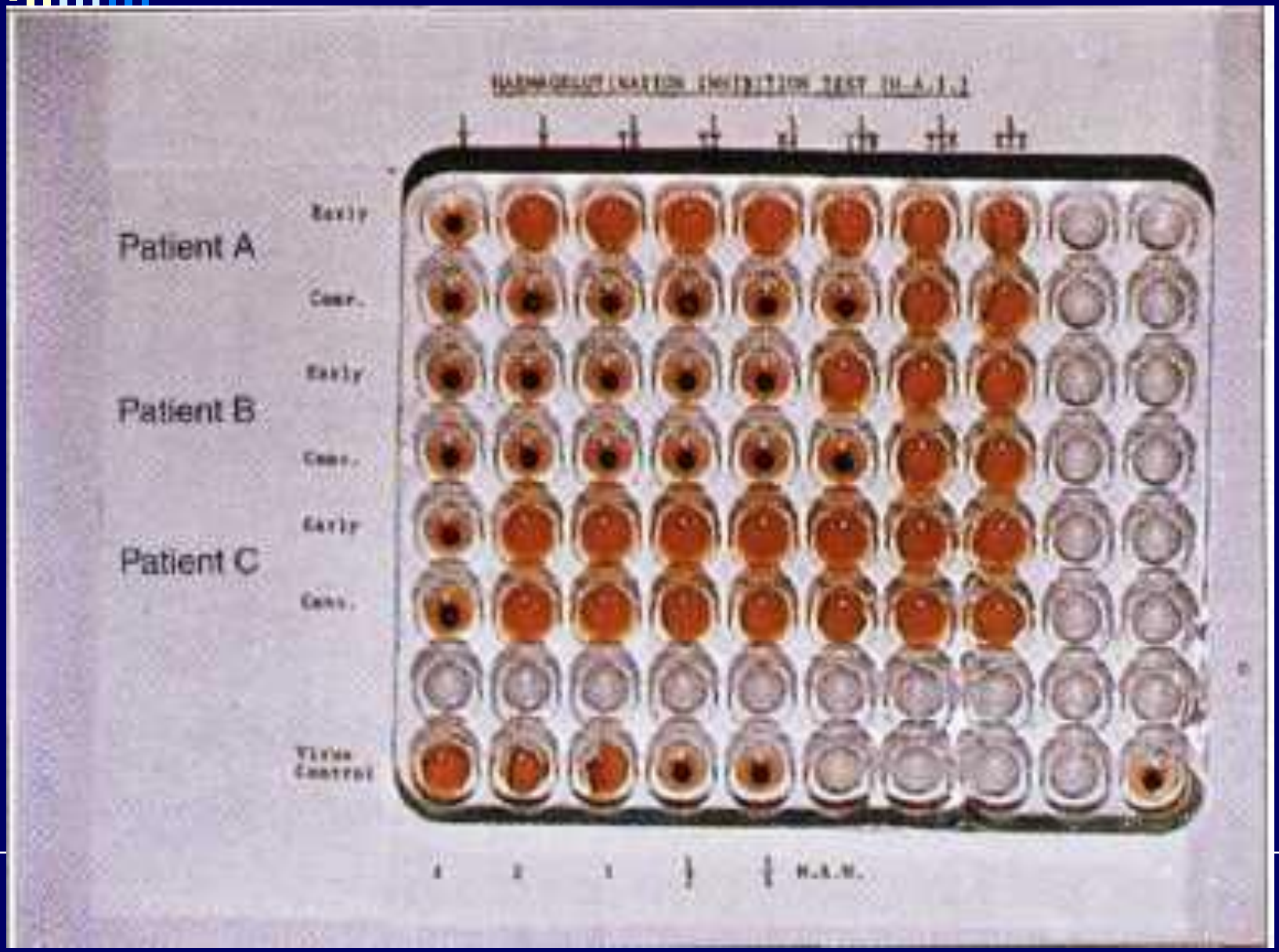
- В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных разведений сыворотки.
- В предпоследнюю лунку вносят - 0,5 мл заведомо положительной сыворотки и в последнюю 0,5 мл физиологического раствора (контроли).
- Затем во все лунки добавляют по 0,1 мл разведенного эритроцитарного диагностикума,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

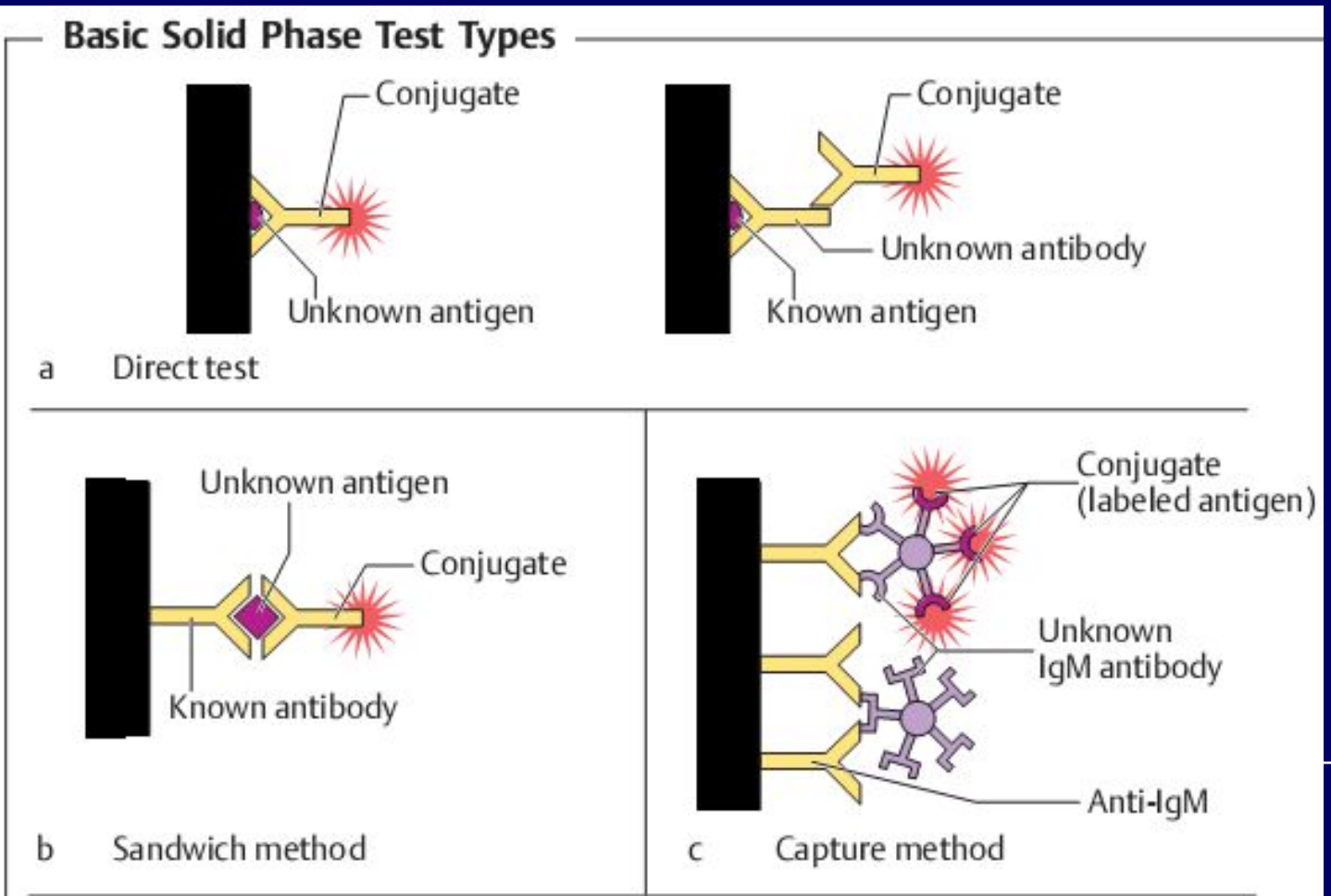
# Реакция торможения ГА (РТГА)



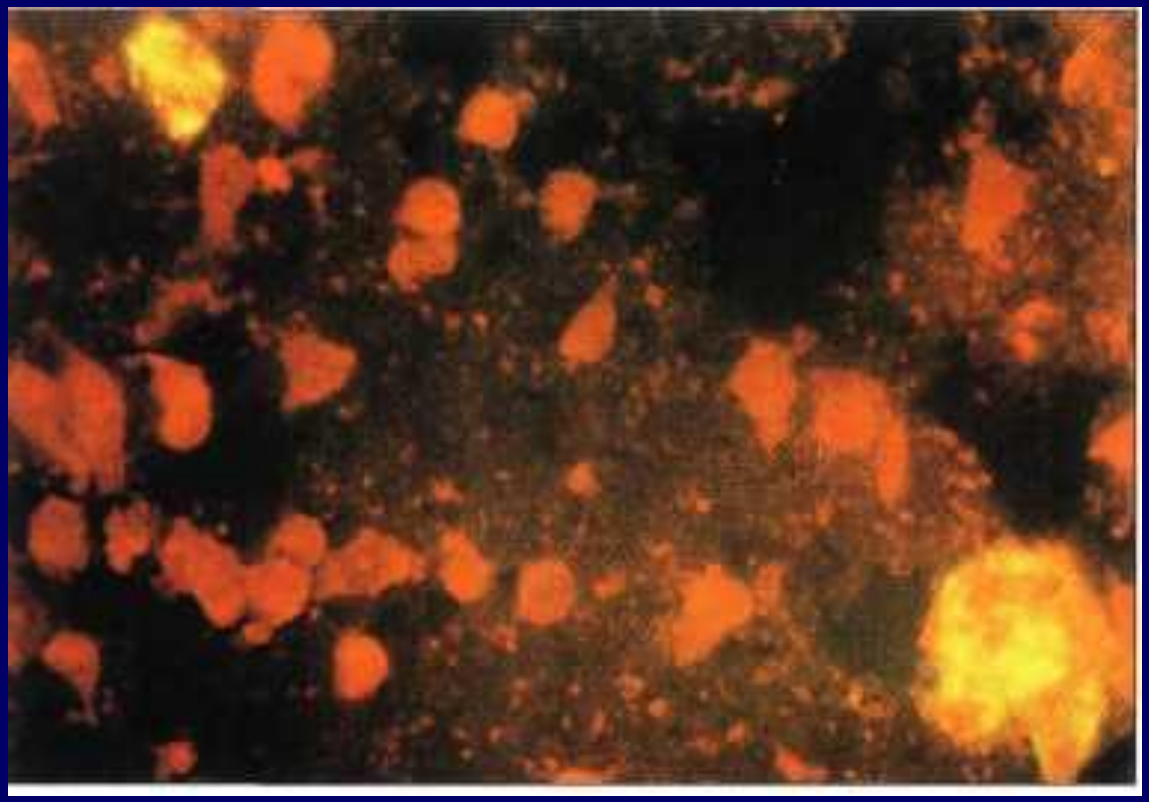
# РТГА


Patient A
Early
Conv.
Patient B
Early
Conv.
Patient C
Early
Conv.
Virus Control

# Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)



# 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.

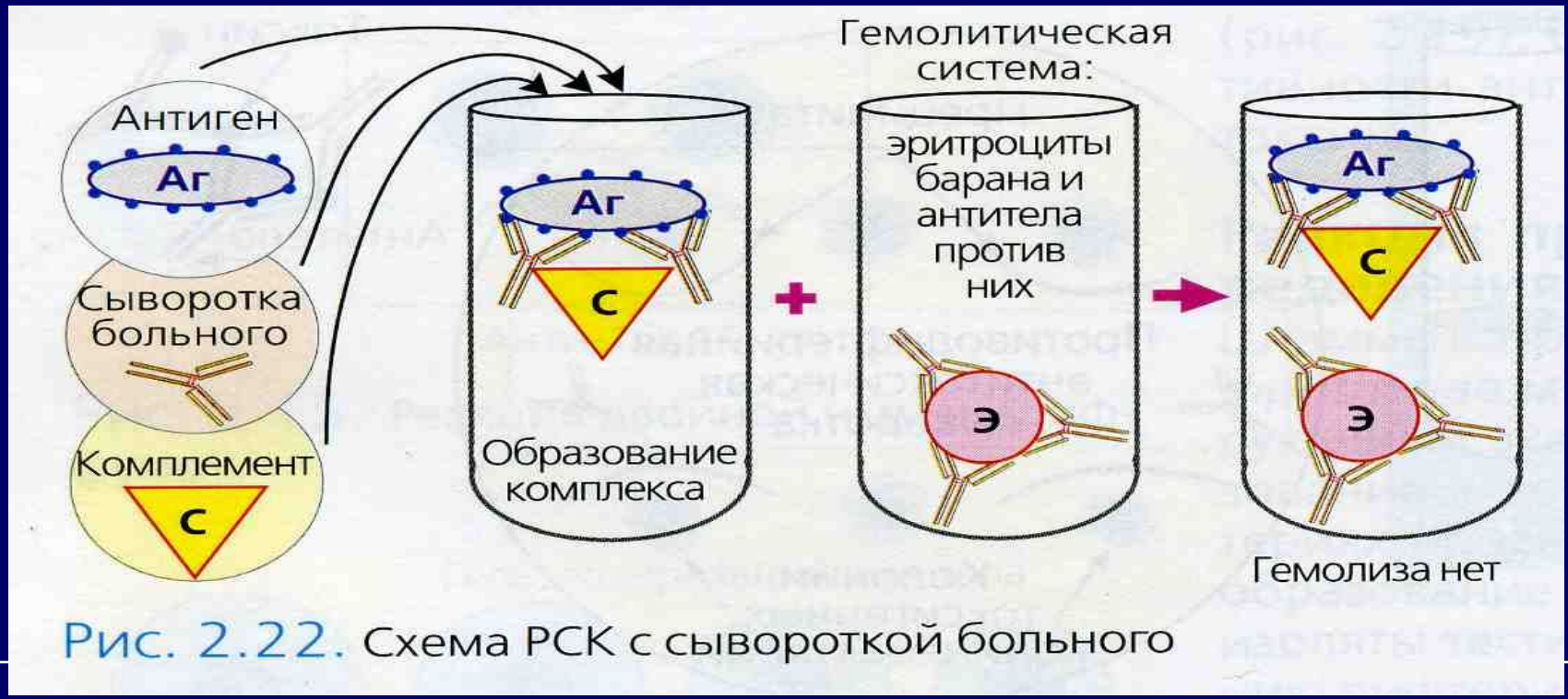



Рис. 2.22. Схема РСК с сывороткой больного

**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.

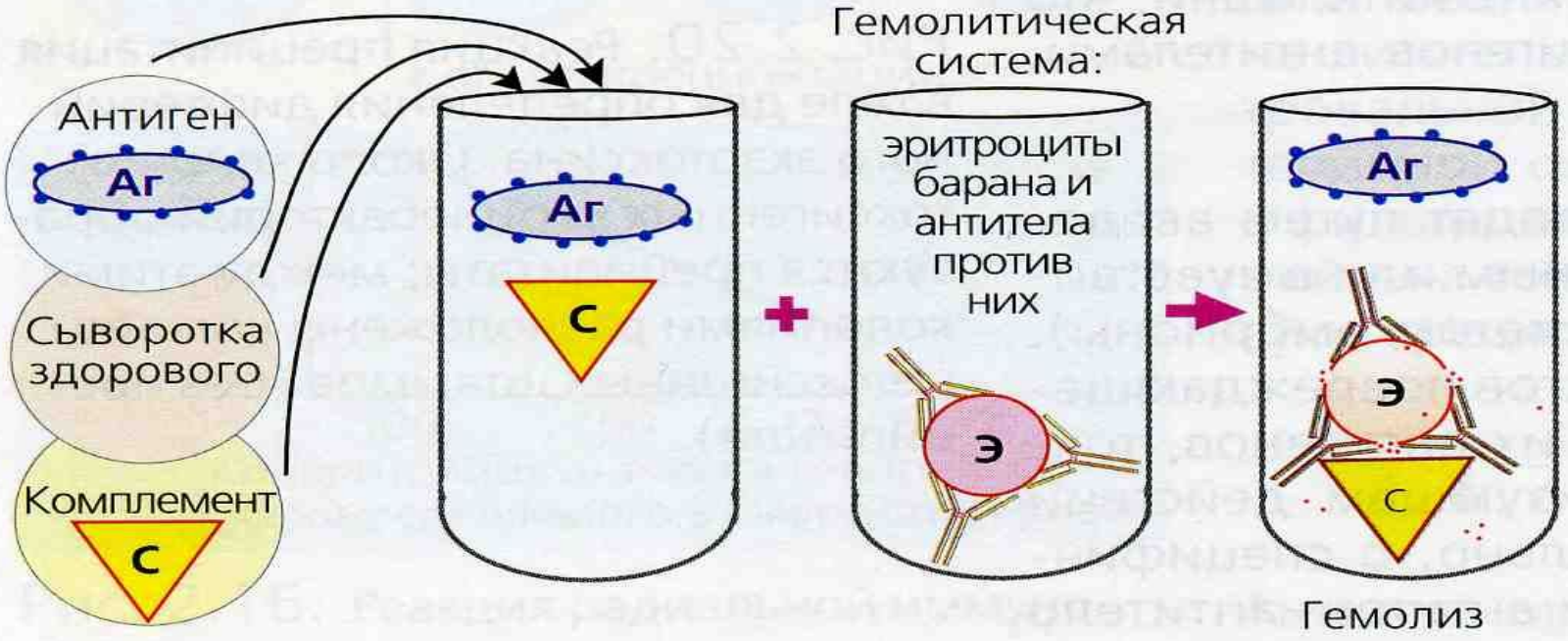
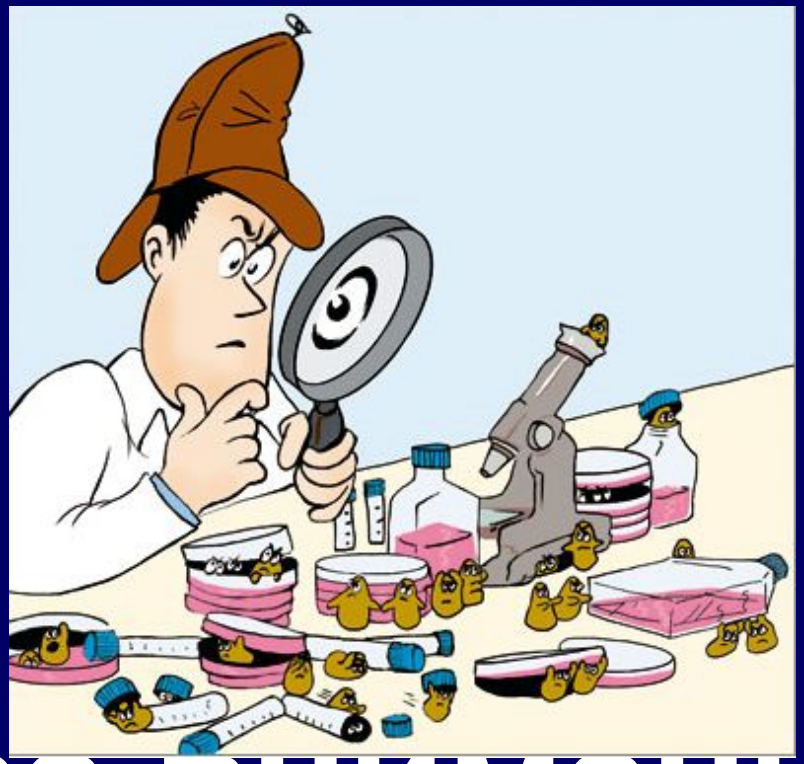



Рис. 2.23. Схема РСК с сывороткой здорового

# Благодарю



# за внимание!