

## Тема занятия «Серологический метод исследования».

1. Серологический метод исследования, общее понятие, объекты выявления, принцип взаимодействия АГ и АТ, основные группы реакций.
2. Реакции агглютинации, принцип, разновидности(ориентировочная, развернутая, пассивная (РПГА)).
3. Реакции преципитации, принцип, разновидности (кольцепреципитация, преципитация в полужидком агаре, реакция радиальной иммунодиффузии ).
4. Реакция связывания комплемента, принцип, основные фазы. Реакция Вассермана.
5. Реакции нейтрализации, принцип, особенности.
6. Реакции с использованием меченых АТ или АГ.
7. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).
8. Иммуноферментный анализ (прямой, непрямой), метки, модификации
9. Радиоиммунологический анализ (РИЗ).
10. Иммуноблоттин, принцип, особенности метода.

Серологический метод основан на определении антител (реже антигена) в биологических жидкостях (чаще крови) с целью выявления факта контакта микроорганизма с макроорганизмом, стадии заболевания или идентификации микроорганизма. В основе реакции антиген – антитело.

### Реакции антиген—антитело

Особенности взаимодействия антитела с антигеном являются основой диагностических реакций в лабораториях.

**Реакция *in vitro* между антигеном и антителом состоит из:**

1. специфической
2. неспецифической фазы.

**В специфическую фазу** происходит быстрое специфическое связывание активного центра антитела с детерминантой антигена.

Затем наступает **неспецифическая фаза** — более медленная, которая проявляется **видимыми физическими явлениями**, например образованием хлопьев (феномен

агглютинации) или преципитата в виде помутнения. Эта фаза требует наличия определенных условий (электролитов, оптимального pH среды).

С этой целью применяют **серологические методы** (от лат. *serum* — сыворотка и *logos* — учение), т. е. методы изучения антител и антигенов с помощью реакций антиген—антитело, определяемых в сыворотке крови и других жидкостях, а также тканях организма.

При выделении микроба от больного проводят идентификацию возбудителя путем изучения его антигенных свойств с помощью иммунных диагностических сывороток, т. е. сывороток крови гипериммунизированных животных, содержащих специфические антитела. Это так называемая **серологическая идентификация** микроорганизмов.

### **Реакции агглютинации**

**Реакция агглютинации — РА** (от лат. *agglutinatio* — склеивание) — простая по постановке реакция, при которой происходит связывание антителами корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов или других клеток, нерастворимых частиц с адсорбированными на них антигенами, а также макромолекулярных агрегатов). Она протекает при наличии электролитов, например при добавлении изотонического раствора натрия хлорида.

Применяются различные **варианты реакции агглютинации**:

1. развернутая,
2. ориентировочная,
3. непрямая и др.

Реакция агглютинации **проявляется образованием хлопьев** или осадка (клетки, «склеенные» антителами, имеющими два или более антигенсвязывающих центра).

#### **РА используют для:**

**1) определения антител в сыворотке крови больных**, например, при бруцеллезе (реакции Райта, Хеддельсона), брюшном тифе и паратифах (реакция Видаля) и других инфекционных болезнях;

**2) определения возбудителя**, выделенного от больного;

**3) определения групп крови** с использованием моноклональных антител против алло-антигенов эритроцитов.

Для определения у больного количества **АНТИТЕЛ** ставят **развернутую реакцию агглютинации**: к разведениям сыворотки крови больного добавляют **диагностикум** (взвесь убитых микробов,) и через несколько часов инкубации при 37 °С отмечают наибольшее разведение сыворотки (титр сыворотки), при котором произошла агглютинация, т. е. образовался осадок.

Характер и скорость агглютинации зависят от вида антигена и антител. Примером являются особенности взаимодействия диагностикумов (О- и К-антигенов) со специфическими антителами. Реакция агглютинации с **О-диагностикумом** (бактерии, убитые нагреванием, сохранившие термостабильный **О-антиген**) происходит в виде мелкозернистой агглютинации. Реакция агглютинации с **Н-диагностикумом** (бактерии, убитые формалином, сохранившие термолабильный жгутиковый **Н-антиген**) — крупнохлопчатая и протекает быстрее.

Если необходимо определить возбудитель, выделенный от больного, ставят **ориентировочную реакцию агглютинации**, применяя диагностические антитела (агглютинирующую сыворотку), т. е. проводят серотипирование возбудителя. Ориентировочную реакцию проводят на предметном стекле. К капле диагностической агглютинирующей сыворотки в разведении 1:10 или 1:20 добавляют чистую культуру возбудителя, выделенного от больного. Рядом ставят контроль: вместо сыворотки наносят каплю раствора натрия хлорида. При появлении в капле с сывороткой и микробами хлопьевидного осадка ставят **развернутую реакцию агглютинации** в пробирках с увеличивающимися разведениями агглютинирующей сыворотки, к которым добавляют по 2—3 капли взвеси возбудителя. Агглютинацию учитывают по количеству осадка и степени просветления жидкости. **Реакцию считают положительной**, если агглютинация отмечается в разведении, близком к титру диагностической сыворотки. Одновременно учитывают контроли: сыворотка, разведенная изотоническим раствором натрия хлорида, должна быть прозрачной, взвесь микробов в том же растворе — равномерно мутной, без осадка.

Разные родственные бактерии могут агглютинироваться одной и той же диагностической агглютинирующей сывороткой, что затрудняет их идентификацию. Поэтому пользуются *адсорбированными агглютинирующими сыворотками*, из которых удалены перекрестнореагирующие антитела путем адсорбции их родственными бактериями. В таких сыворотках сохраняются антитела, специфичные только к данной бактерии. Получение таким способом моnoreцепторных диагностических агглютинирующих сывороток было предложено А. Кастелляни (1902).

**Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА)** основана на использовании эритроцитов (или латекса) с адсорбированными на их поверхности антигенами или антителами, взаимодействие которых с соответствующими антителами или антигенами сыворотки крови больных вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка.

При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговки». Обычно в РНГА выявляют антитела с помощью антигенного эритроцитарного диагностикума, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами. Иногда применяют антительные эритроцитарные диагностикумы, на которых адсорбированы антитела. Например, можно обнаружить ботулинический токсин, добавляя к нему эритроцитарный антительный ботулинический диагностикум (такую реакцию называют **реакцией обратной непрямой гемагглютинации — РОНГА**). РНГА применяют для диагностики инфекционных болезней, определения гонадотропного гормона в моче при установлении беременности, для выявления повышенной чувствительности к лекарственным препаратам, гормонам и в некоторых других случаях.

**Реакция коагглютинации.** Клетки возбудителя определяют с помощью стафилококков, предварительно обработанных иммунной диагностической сывороткой. Стафилококки, содержащие белок А, имеющий сродство к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, неспецифически адсорбируют антимикробные антитела, которые затем взаимодействуют активными центрами с

соответствующими микробами, выделенными от больных. В результате коаггутинации образуются хлопья, состоящие из стафилококков, антител диагностической сыворотки и определяемого микроба.

**Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)** основана на блокаде, **подавлении антигенов вирусов** антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты. РТГА применяют для диагностики многих вирусных болезней, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита и др.) могут агглютинировать эритроциты различных животных.

**Реакцию агглютинации для определения антирезусных антител (непрямую реакцию Кумбса)** применяют у больных при внутрисосудистом гемолизе. У некоторых таких больных обнаруживают антирезусные антитела, которые являются неполными, одновалентными. Они специфически взаимодействуют с резус-положительными эритроцитами, но не вызывают их агглютинации. Наличие таких неполных антител определяют в непрямой реакции Кумбса. Для этого в систему анти-резусные антитела + резус-положительные эритроциты добавляют антиглобулиновую сыворотку (антитела против иммуноглобулинов человека), что вызывает агглютинацию эритроцитов. С помощью реакции Кумбса диагностируют патологические состояния, связанные с внутрисосудистым лизисом эритроцитов иммунного генеза, например гемолитическую болезнь новорожденных: эритроциты резус-положительного плода соединяются с циркулирующими в крови неполными антителами к резус-фактору, которые перешли через плаценту от резус-отрицательной матери.

### **Реакции преципитации**

**Реакция преципитации — РП** (от лат. *praeci-pito* — осаждать) — 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.

Реакции преципитации ставят **в пробирках (реакция кольцепреципитации)**, в гелях, питательных средах и др.

Широкое распространение получили разновидности реакции **преципитации в полужидком геле агара: двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, радиальная**

*иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и др.*

**Реакция кольцепреципитации.** Реакцию проводят в узких преципитационных пробирках с иммунной сывороткой, на которую наслаивают растворимый антиген. При оптимальном соотношении антигена и антител на границе этих двух растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата. Избыток антигена не влияет на результат реакции кольцепреципитации вследствие постепенной диффузии реагентов к границе жидкости. Если в качестве антигенов в реакции кольцепреципитации используют прокипяченные и профильтрованные водные экстракты органов или тканей, то такая реакция называется **реакцией термопреципитации** (*реакция Асколи*, при сибирской язве)

**Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони.** Для постановки реакции растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку и после его затвердевания в нем вырезают лунки размером 2-3 мм. В эти лунки отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу. В месте встречи в эквивалентных соотношениях они образуют преципитат в виде белой полосы. У многокомпонентных систем между лунками с разными антигенами и антителами сыворотки появляется несколько линий преципитата; у идентичных антигенов линии преципитата сливаются; у неидентичных—пересекаются (рис. 13.6).

**Реакция радиальной иммунодиффузии.** Иммунную сыворотку с расплавленным агаровым гелем равномерно наливают на стекло. После застывания в геле делают лунки, в которые помещают антиген в различных разведениях. Антиген, диффундируя в гель, образует с антителами кольцевые зоны преципитации вокруг лунок. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена. Реакцию используют для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента и др.

**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, диффундируя в гель, образуют в месте «встречи» с антигеном линии преципитации.

**Реакция флоккуляции** (по Рамону) (от лат. *floccus* — хлопья шерсти)— появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммуно-реципитации) в пробирке при реакции токсин—антитоксин или анатоксин—антитоксин. Ее применяют для определения активности антитоксической сыворотки или анатоксина.

**Иммунная электронная микроскопия** — электронная микроскопия микробов, чаще вирусов, обработанных соответствующими антителами. Вирусы, обработанные иммунной сывороткой, образуют иммунные агрегаты (**микропреципитаты**). Вокруг вирионов образуется «венчик» из антител, контрастированный фосфорновольфрамовой кислотой или другими электронно-оптически плотными препаратами.

### **Реакции с участием комплемента**

**Реакции с участием комплемента** основаны на активации комплемента комплексом антиген—антитело (реакция связывания комплемента, радиального гемолиза и др.).

**Реакция связывания комплемента (РСК)** заключается в том, что **при соответствии друг другу антигены и антитела образуют иммунный комплекс**, к которому **через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (C)**, т. е. происходит **связывание комплемента комплексом антиген—антитело**.

Если же **комплекс антиген—антитело не образуется**, то **комплемент остается свободным**.

#### **РСК проводят в две фазы:**

**1-я фаза** — инкубация смеси, содержащей три компонента **антиген + антитело + комплемент**;

**2-я фаза (индикаторная)** — **выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана, и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним**. В 1-й фазе реакции при образовании комплекса антиген—антитело происходит связывание им комплемента, и тогда во 2-й фазе гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет; реакция положительная. Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исследуемом образце нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз; реакция отрицательная.

РСК применяют для диагностики многих инфекционных болезней, в частности

сифилиса (**реакция Вассермана**).

**Реакцию радиального гемолиза (РРГ)** ставят в лунках геля из агара, содержащего эритроциты барана и комплемент. После внесения в лунки геля гемолитической сыворотки (антител против эритроцитов барана) вокруг них (в результате радиальной диффузии антител) образуется зона гемолиза. Таким образом можно определить активность комплемента и гемолитической сыворотки, а также антитела в сыворотке крови у больных гриппом, краснухой, клещевым энцефалитом. Для этого на эритроцитах адсорбируют соответствующие антигены вируса, а в лунки геля, содержащего данные эритроциты, добавляют сыворотку крови больного. Противовирусные антитела взаимодействуют с вирусными антигенами, адсорбированными на эритроцитах, после че-

го к этому комплексу присоединяются компоненты комплемента, вызывая гемолиз.

**Реакция иммунного прилипания (РИП)** основана на активации системы комплемента корпускулярными антигенами (бактериями, вирусами), обработанными иммунной сывороткой. В результате образуется активированный третий компонент комплемента (СЗЬ), который присоединяется к корпускулярному антигену в составе иммунного комплекса. На эритроцитах, тромбоцитах, макрофагах имеются рецепторы для СЗЬ, благодаря чему при смешивании этих клеток с иммунными комплексами, несущими СЗЬ, происходят их соединение и агглютинация.

### **Реакция нейтрализации**

Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие микробов или их токсинов на чувствительные клетки и ткани, что связано с блокадой микробных антигенов антителами, т. е. их *нейтрализацией*.

**Реакцию нейтрализации (РН)** проводят путем введения смеси антиген—антитело животным или в чувствительные тест-объекты (культуру клеток, эмбрионы). При отсутствии у животных и тест-объектов повреждающего действия микроорганизмов или их антигенов, токсинов говорят о нейтрализующем действии иммунной сыворотки и, следовательно, о специфичности взаимодействия комплекса антиген—антитело.

### **Реакции с использованием меченых антител или антигенов**

Реакция иммунофлюоресценции — **РИФ** (метод Кунса)

Различают три основные разновидности метода:

1. прямой,
2. непрямой
3. с компонентом.

Реакция Кунса является **методом экспресс-диагностики** для выявления антигенов микробов или определения антител.

**Прямой метод РИФ** основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными 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, меченной флюорохромом*. Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется *комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом*. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.

### **Иммуноферментный метод, или анализ (ИФА)**

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

*После соединения антигена с меченной 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.*

**Твердофазный ИФА** — наиболее распространенный вариант иммунологического

теста, когда один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитела) сорбирован на твердом носителе, например в лунках планшеток из полистирола ).

При определении антител в лунки планшеток с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больного, антиглобулиновую сыворотку, меченную ферментом, и субстрат (хромоген) для фермента.

Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют несвязавшиеся реагенты путем тщательного промывания. При положительном результате изменяется цвет раствора хромогена. Твердофазный носитель можно сенсibilизировать не только антигеном, но и антителами. Тогда в лунки с сорбированными антителами вносят искомый антиген, добавляют иммунную сыворотку против антигена, меченную ферментом, а затем субстрата для фермента.

**Конкурентный вариант ИФА:** искомый антиген и меченный ферментом антиген конкурируют друг с другом за связывание ограниченного количества антител иммунной сыворотки. Другой тест — искомые антитела и меченые антитела конкурируют друг с другом за антигены.

**ИФА применяют** для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней в частности для диагностики ВИЧ-инфекций, гепатита В и др., а также определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях —  $10^{10}$ — $10^{12}$  г/л.

#### **Радиоиммунологический метод, или анализ (РИА)**

***Высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген—антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом*** ( $^{125}\text{J}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  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.

При ***твердофазном варианте РИА*** один из компонентов реакции (антиген или антитела) сорбирован на твердом носителе, например в лунках микропанелей из полистирола. Другой вариант метода — ***конкурентный РИА***: искомый антиген и меченный радионуклидом антиген конкурируют друг с другом за связывание ограниченного количества антител иммунной

сыворотки. Этот вариант используют для определения количества антигена в исследуемом материале.

**РИА применяют** для выявления антигенов микробов, определения гормонов, ферментов, лекарственных веществ и иммуноглобулинов, а также иных веществ, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях —  $10^{12}$ — $10^{15}$  г/л. Метод представляет определенную экологическую опасность.

### **Иммуноблоттинг**

Иммуноблоттинг (ИБ) — высокочувствительный метод, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА.

*Антиген выделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят его (блоттинг — от англ. blot, пятно) из геля на активированную бумагу или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ИФА.* Фирмы выпускают такие полоски с «блота́ми» антигенов. На эти полоски наносят сыворотку больного. Затем после инкубации отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом. *Образовавшийся на полоске комплекс антиген + антитело больного + антитело против Ig человека выявляют добавлением субстрата/хромогена, изменяющего окраску под действием фермента*

**ИБ используют** как диагностический метод при ВИЧ-инфекции и др.