



Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра клинической лабораторной диагностики

Иммунологические серологические методы в лабораторной диагностике

- **Иммунитет** (от лат. *immunitas* – освобождение, избавление от чего-либо) – способ защиты организма от генетически чужеродных веществ (антигенов) экзогенного или эндогенного происхождения с целью сохранения и поддержания гомеостаза, структурной и функциональной целостности организма, а также биологической (антигенной) индивидуальности и видовых различий.

Иммунитет

Выделяют иммунитет:

- - естественный (неспецифический, врожденный);
- - приобретенный (специфический, адаптивный).

Факторы естественного иммунитета:

- - Кожа и слизистые оболочки: сальные и потовые железы, мерцательный эпителий слизистых оболочек, пищеварительные ферменты.
- - Гуморальные и клеточные факторы защиты: лизоцим, секреты кожи и слизистых оболочек, комплемент, фибронектин, интерфероны, белки острой фазы, естественные антитела, фагоциты (неспецифический фагоцитоз), НК-клетки, нормальная микрофлора тела.

Факторы приобретенного иммунитета:

- Клеточные и гуморальные факторы защиты
 - В-лимфоциты,
 - – Т-хелперы (Th1, Th2),
 - – цитотоксические Т-лимфоциты,
 - – иммунный фагоцитоз,
 - – антитела (иммуноглобулины).

- Истинными клетками иммунной системы (иммуноцитами) являются только **лимфоциты**, представленные двумя большими популяциями:
 - - **В**-клетками;
 - - **Т**-клетками.

- Остальные клетки, участвующие в иммунном ответе (клетки системы крови – нейтрофилы, моноциты, базофилы, эозинофилы, клетки кровеносных сосудов, дендритные клетки и другие) – лишь способствуют лимфоцитам в выполнении их функции, «сотрудничают» с ними.

- Различают **центральные** и **периферические** органы иммунной системы (здесь развиваются, созревают и дифференцируются клетки иммунной системы).

▶ **ЦЕНТРАЛЬНЫЕ** (синоним **ПЕРВИЧНЫЕ**)

К **ЦЕНТРАЛЬНЫМ** органам иммунной системы относятся:

- **ТИМУС** (образуются тимусзависимые или **T-лимфоциты**) и
- **КОСТНЫЙ МОЗГ** (образуются **B-лимфоциты**, тучные и дендритные клетки).

В центральных органах созревание лимфоцитов происходит без влияния антигенов (антигеннезависимая дифференцировка).

▶ ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ (ВТОРИЧНЫЕ).

- К ПЕРИФЕРИЧЕСКИМ лимфоидным органам относятся: селезенка, лимфатические узлы, миндалины, пейеровы бляшки, червеобразный отросток – аппендикс. Лимфопоэз осуществляется в них при наличии антигенной стимуляции (антигензависимая дифференцировка).

- Периферические органы иммунной системы заселяются Т- и В-лимфоцитами из центральных органов, при этом каждая популяция лимфоцитов мигрирует в определенные области периферических органов, которые называются тимусзависимые или тимуснезависимые зоны.
- **Т-клетки** ответственны за иммунный ответ **клеточного типа**, а **В-клетки** – за иммунный ответ **гуморального типа**.

Адаптивный иммунитет: механизмы

Специфический иммунный ответ

Приобретенный иммунный ответ целиком базируется на функционировании лимфоцитов

Первая фаза:

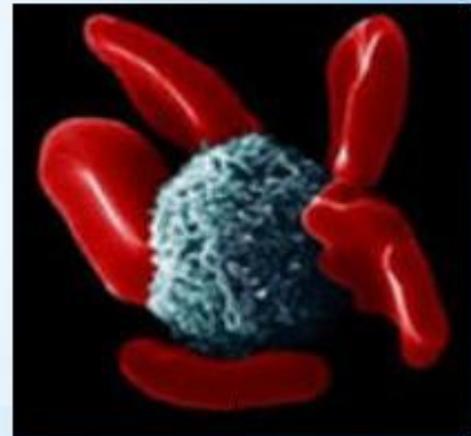
активация лимфоцитов

Вторая фаза:

клональная пролиферация лимфоцитов

Заключительная фаза:

значительная часть лимфоцитов превращается в эффекторные клетки, а оставшаяся часть - в клетки памяти, обеспечивающие **вторичный ответ**



Иммунологическая реактивность

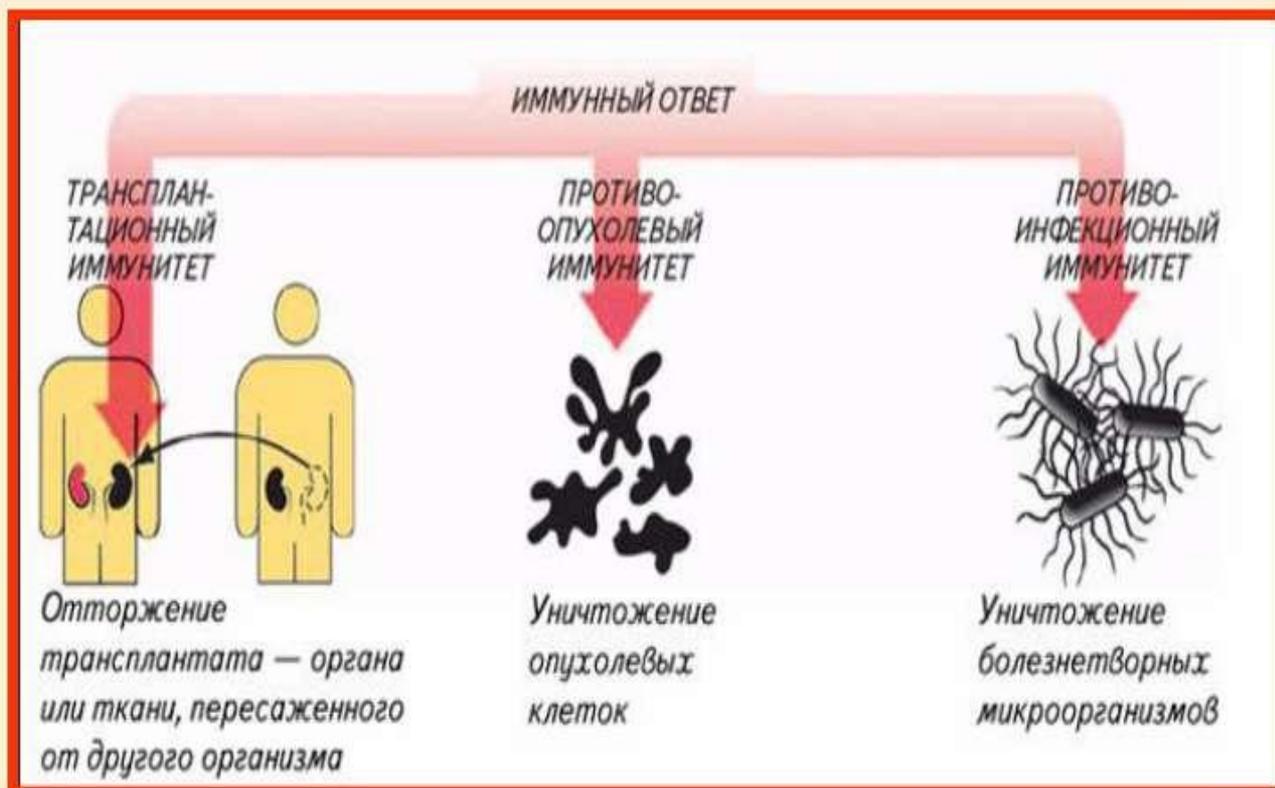
- Это комплекс иммунных реакций специфического ответа на конкретный антиген. К основным видам (типам) иммунных реакций относятся:

Основные формы иммунного ответа

Формы иммунного ответа	Основные эффекторы	Значение для организма
Гуморальный	Зрелые Т-лимфоциты	1.Защита от АГ (синтез АТ) 2.Презентация Аг 3.ГНТ 4.Иммунологическая память
Клеточный	Цитотоксические Т-лимфоциты, Т-НК	1.Цитологический эффект 2.Синтоз цитокинов 3.ГЗТ 4.Отторжение трансплантанта 5. Иммунологическая память
Иммунологическая память	Т- и В-лимфоциты памяти	Устойчивость к повторному внедрению АГ
Иммунологическая толерантность	Т-супрессоры	Отсутствие иммунного ответа к аутоантигенам

- Гуморальный иммунный ответ характеризуется выработкой **антител**, взаимодействующих с определенным антигеном.
- Клеточный – образование **клеток-эффекторов**, так называемых **Т-эффекторов (цитотоксических Т-лимфоцитов)**, которые способны разрушать клеточные антигены (опухолевые клетки, вирусинфицированные клетки, мутировавшие клетки, клетки трансплантата).

Типы иммунных ответов



- Другая субпопуляция Т-лимфоцитов – **Т-хелперы**, координируют иммунный ответ путем контактных межклеточных взаимодействий и выделения растворимых факторов – цитокинов.
- Т-хелперы участвуют в стимуляции как В-лимфоцитов, так и клеточного иммунного ответа.

- - *Гуморальная иммунная реакция*, в конечном результате которой происходит выработка антител – способных связываться с антигеном и способствующих элиминации антигена.
- Антитела, секретлируемые В-лимфоцитами, используются организмом для борьбы с внеклеточными инфекционными агентами.

- Первичный иммунный ответ – иммунный ответ, возникающий при первом контакте с антигеном.
- Вторичный иммунный ответ – иммунный ответ на повторный контакт с одним и тем же антигеном.
- Как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ имеют определенную скорость и при повторном попадании агента развиваются значительно быстрее и имеют качественные особенности.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Проникновение чужеродного антигена в организм человека приводит к развитию трех типов реакций в зависимости от природы антигена

АНТИГЕН

Возбудители детских инфекций
и другие антигены

Вирусы, бактерии
и другие антигены

Пыль, пыльца, запахи,
пищевые продукты, лекарства

РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА

Иммунный ответ

Воспаление

- Циркуляция и размножение возбудителя
- Повышение температуры тела, отек слизистых
- Уничтожение возбудителя
- Иммунологическая память не формируется
- Возможно повторное заболевание

- Циркуляция и размножение возбудителя в кровеносной, лимфатической и иммунной системах
- Повышение температуры тела
- Распознавание возбудителя
- Активизация иммунной системы
- Размножение специфических к возбудителю Т- и В-лимфоцитов
- Синтез антител против возбудителя
- Формирование иммунологической памяти к данному возбудителю
- Повторное заболевание не возникает

Аллергия

Индивидуальная чувствительность организма к антигену

- Быстрое развитие длительной аллергической реакции
- Повторное проникновение антигена вызывает усиление аллергии

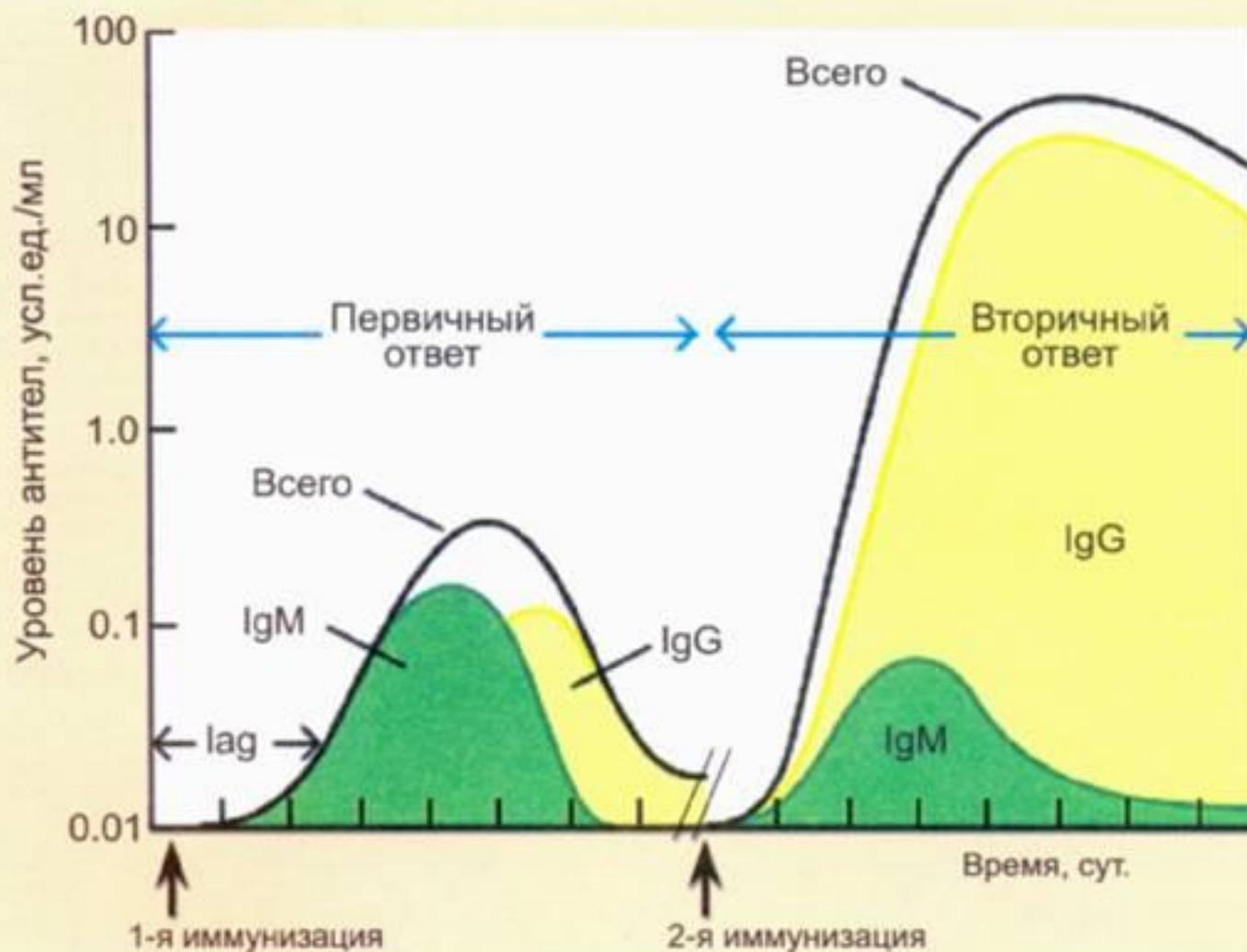


Иммунологическая память

- Это способность лимфоидных клеток сохранять информацию об антигене и отвечать усиленной и ускоренной реакцией на повторную встречу с гомологичным антигеном.

- Важной особенностью первичного иммунного ответа является образование **T- и B-лимфоцитов памяти**, которые могут сохраняться в организме от нескольких дней до десятилетий, и обуславливать иммунологическую память.
- При повторном контакте с антигеном первыми в иммунный ответ вступают клетки памяти.
- При вторичном иммунном ответе латентный период и период логарифмического удвоения титра антител сокращаются примерно вдвое.

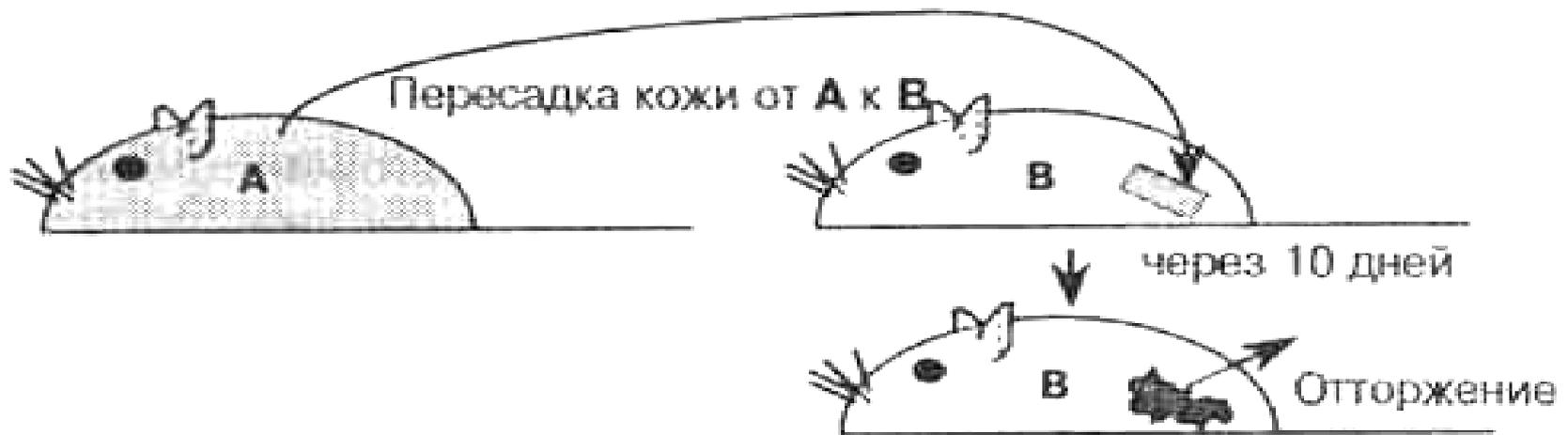
Первичный и вторичный иммунный ответ



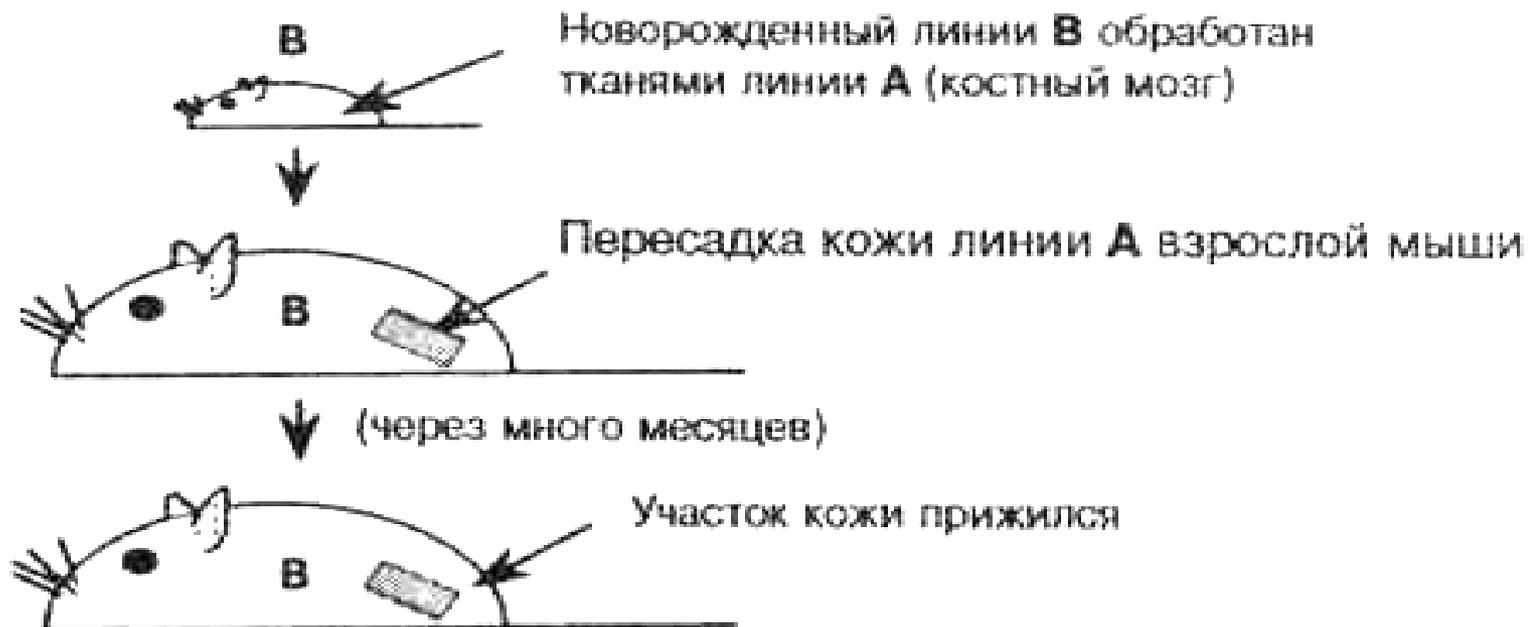
Иммунологическая толерантность (от лат. *tolerantia* – терпение)

- Это состояние специфической иммунологической неответчаемости (ареактивности) в отношении того или иного антигена (т.е. иммунологическое состояние организма, при котором он не способен вырабатывать антитела).
- Важную роль играет толерантность к собственным (аутологичным) антигенам организма, что предотвращает иммунный ответ против собственных тканей.

Нормальное развитие



Неонатальная толерантность



Формы иммунного реагирования:

- 1. Антителообразование.
- 2. Иммунный фагоцитоз.
- 3. Киллерная функция лимфоцитов.
- 4. Аллергические реакции (ГНТ, ГЗТ).
- 5. Иммунологическая память.
- 6. Иммунологическая толерантность.

- **АНТИГЕН** - это генетически чужеродное вещество (белок, полисахарид, липополисахарид, липопротеин, нуклеопротеин и т.д.) с характерными химическими группировками, которое может вызывать в организме антителообразование и другие формы иммунного ответа, а также взаимодействовать с антителами и антигенраспознающими клетками.

Основные свойства,
характеризующие вещество как
антиген, таковы:

- ЧУЖЕРОДНОСТЬ,
- АНТИГЕННОСТЬ,
- ИММУНОГЕННОСТЬ,
- СПЕЦИФИЧНОСТЬ.

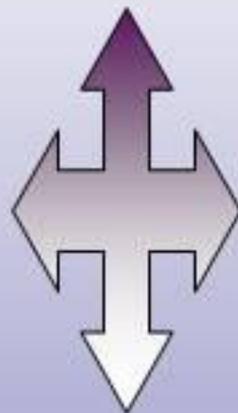
Классификация антигенов

1. По происхождению:

2. По химической природе:

3. По генетическому отношению:

4. По характеру иммунного ответа:



- По происхождению различают экзогенные (возникшие вне организма) и эндогенные (возникшие внутри организма) антигены.
- Среди эндогенных особого внимания заслуживают ауто- и неоантигены.
- Аутоантигены – это структурно неизменные антигены собственного организма, синтезируемые в организме в физиологических условиях. В норме аутоантигены неиммуногенны вследствие сформировавшейся *иммунологической толерантности* (невосприимчивости) либо их недоступности для контакта с факторами иммунитета - это так называемые *забарьерные* антигены.
- Неоантигены, в отличие от аутоантигенов, возникают в организме в результате генетических мутаций или модификаций и всегда чужеродны.

- По природе: биополимеры белковой (протеиды) и небелковой (полисахариды, липиды, липополисахариды, нуклеиновые кислоты и др.) природы.
- По молекулярной структуре: глобулярные (молекула имеет шаровидную форму) и фибриллярные (форма нити).

- По степени иммуногенности:
полноценные (полные) и неполноценные (неполные).
- **Полноценные** антигены обладают выраженной антигенностью и иммуногенностью. Такие вещества, как правило, имеют достаточно большую молекулярную массу (более 10 кД), большой размер молекулы (частицы) в виде глобулы и хорошо взаимодействуют с факторами иммунитета.

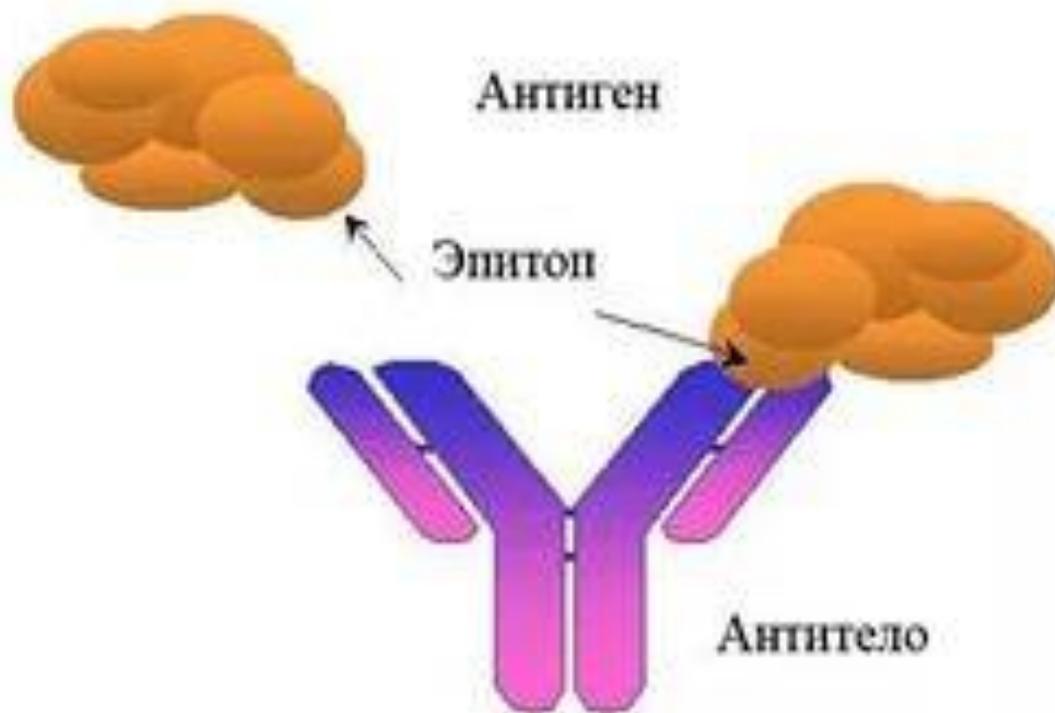
- ***Неполноценные*** антигены, или *гаптены*, обладают антигенностью - способны специфически взаимодействовать с уже готовыми факторами иммунитета (антителами, лимфоцитами), но не способны при введении в нормальных условиях индуцировать в организме иммунный ответ. Чаще всего гаптенами являются низкомолекулярные соединения (молекулярная масса менее 10 кД).

- Если искусственно укрупнить молекулу гаптена - соединить ее прочной связью с достаточно большой белковой молекулой, удастся заставить иммунную систему макроорганизма специфически реагировать на гаптен как на полноценный антиген и вырабатывать факторы иммунитета. Молекула белка-носителя получила название *шлеппера* (тягача).
- Используя для иммунизации конъюгаты, получают антитела к гормонам, лекарственным препаратам и другим низкоиммуногенным соединениям.

- В молекуле полного антигена различают две функционально различные единицы: **АНТИГЕННАЯ ДЕТЕРМИНАНТА** (синоним **ЭПИТОП**) и **НОСИТЕЛЬ**.
- Антиген содержит несколько различных или повторяющихся эпитопов. Эпитоп (антигенная детерминанта) – отличительная часть молекулы антигена, обуславливающая специфичность антител и эффекторных Т-лимфоцитов при иммунном ответе.

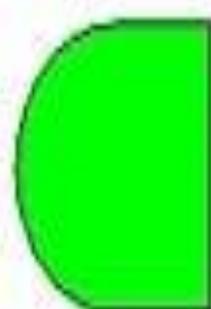
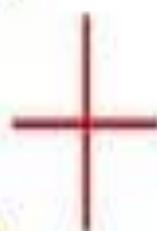
Эпитоп комплементарен активному центру антител или Т-клеточному рецептору.

Связывание антитела и антигена

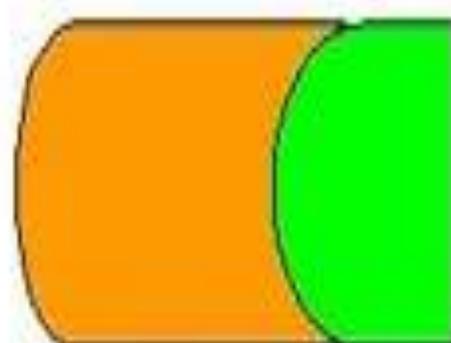




Антиген



Антитело



Иммунный комплекс.
Антиген+антитело

- Иммунологическая специфичность антигенов определяется не всей макромолекулой антигена в целом, а свойствами так называемых **АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ** - определённых химических группировок, находящихся **на поверхности антигена**.
- **НОСИТЕЛЯМИ** в молекулах естественных антигенов чаще всего являются белки и полисахариды, а также липополисахариды и нуклеиновые кислоты.

По степени чужеродности: ксено- и изоантигены.

- **КСЕНОАНТИГЕН** – антиген, имеющий происхождение от представителя другого вида. Например, лошадиная сыворотка является ксеногенным антигеном для человека. Ксеногенные антигены, как правило, являются высоко иммуногенными.
- **ИЗОАНТИГЕНЫ** - тканевые антигены различающиеся внутри вида. Различают эритроцитарные, лейкоцитарные, тромбоцитарные и другие изоантигены.

- Впервые изоантигены эритроцитов описал К.Ландштейнер в 1901 году.
- К изоантигенам человеческих эритроцитов относятся:
- 1) **основные системы – АВО** (4 группы), **резус (С, D, E, с, d, е) – основной D;**

Группы крови	Присутствие белков	
	агглютиногенов	агглютининов
0 (I)	Нет	α и β
A (II)	A	β
B (III)	B	α
AB (IV)	AB	Нет

- **2) минорные** изоантигенные системы:
- - Келл (Kell) – состоит из 2 антигенов, образующих 3 группы крови (K-K, K-k, k-k). По активности стоят на втором месте после системы резус. Они могут вызвать сенсibilизацию при беременности, переливании крови; служат причиной гемолитической болезни.
- - Кидд (Kidd) – включает 2 антигена, образующих 3 группы крови: I_k (a+b-), I_k (A+b+) и I_k (a-b+). Обладают изоиммунными свойствами и могут привести к гемолитической болезни новорожденных и гемотрансфузионным осложнениям.

- - Даффи (Duffy) – включает 2 антигена, образующих 3 группы крови Fy (a+b-), Fy (a+b+) и Fy (a-b+). В редких случаях могут вызвать сенсбилизацию и гемотрансфузионные осложнения.
- - MNSs (из 9 групп крови), могут привести к несовместимости при переливании крови.
- - Льюис, Лютеран, Pp, Джей.
- На сегодняшний день открыто более 120 эритроцитарных антигена.

- При переливании крови: кровь и донора, и реципиента обязательно тестируется на наличие основных эритроцитарных изоантигенов.
- Минорные эритроцитарные изоантигены обычно не учитываются.
- Однако их наличие обуславливает развитие посттрансфузионных реакций особенно при многократном переливании крови пациенту, ведь минорные изоантигенные системы как правило в клинике не тестируются.

- **Лейкоцитарные антигены** называются **HLA** – human leucocyte antigen.
- Набор этих антигенов индивидуален для каждого человека и они находятся на всех ядродержащих клетках человека.
- При переливании крови происходит сенсibilизация реципиента к HLA антигенам донора.

- **ПЕРЕКРЕСТНО — РЕАГИРУЮЩИЕ АНТИГЕНЫ.**
Если на двух различных молекулах антигенов имеются одинаковые или сходные антигенные детерминанты, то антитела вырабатываемые на один антиген будут реагировать и со вторым антигеном. Так наличие общих антигенных детерминант у β -гемолитического стрептококка и соединительной ткани (коллагена) клапанов сердца, обуславливает развитие ревматического поражения клапанного аппарата (ревматического эндокардита) после перенесенной ангины. Это так называемая антигенная мимикрия.

- **АНТИГЕННЫЙ ДРЕЙФ.** Ряд инфекционных агентов, в частности вирусы гриппа, иммунодефицита человека и другие, обладают способностью изменять свою антигенность. Этот феномен постепенного изменения антигенной структуры называется антигенным дрейфом.
- Резкое изменение антигенности, что связано с мутационным процессом и генетическими рекомбинациями, называется **антигенный шифт**. Указанное необходимо учитывать при вакцинации, например, против гриппа, так как вакцинальный иммунитет должен быть против того сероварианта возбудителя, который вызывает заболевание в данном регионе.

- **СУПЕРАНТИГЕНЫ** – особая группа бактериальных и вирусных антигенов, способных одновременно стимулировать большое количество Т-лимфоцитов, т.е. вызывать **поликлональную активацию большого числа Т-клеток**.
- Ряд опухолей на своей поверхности содержат **ОПУХОЛЬАССОЦИИРОВАННЫЕ АНТИГЕНЫ**.
- К ним относятся: вирусные антигены (вирусиндуцированных опухолей); эмбриональные антигены (РЭА – раково-эмбриональный антиген, АФП – альфа-фетопротейн); нормальные клеточные белки, но на малигнизированных клетках экспрессированные в больших количествах (на много больших, чем на нормальных клетках).

- **ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЕ АНТИГЕНЫ** – антигены, появляющиеся на цитоплазматической мембране клеток, в процессе их дифференцировки.
- По этим антигенам (их наличию или отсутствию) можно определить направление развития клетки, функциональную специфичность клетки, её степень зрелости.
- В обычном световом микроскопе все лимфоциты имеют одинаковый вид и форму. Поэтому именно дифференцировочные антигены служат специфическими **маркёрами**, по которым можно различать в частности популяции и субпопуляции лимфоцитов.
- Дифференцировочные антигены обозначаются **CD** от англ. clusters of differentiation (кластеры дифференцировки). Например, Т-лимфоциты, развивающиеся в тимусе, имеют на своей цитоплазматической мембране CD3-антиген.

- **Антитела** – это белки (точнее гликопротеины), которые синтезируются под влиянием антигенов В-лимфоцитами (плазматическими клетками) и специфически с ними реагируют. Это белки гаммаглобулиновой фракции, поэтому их называют **ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ (Ig)**. Содержатся в большом количестве в сыворотке, в межклеточной жидкости и других секретах, обеспечивая гуморальный ответ.

- Молекула Ig состоит из двух **тяжелых** полипептидных цепей, называемых **H-цепями** (от англ. **heavy** – тяжелый) и из двух **легких**, называемых **L-цепями** (от англ. **light** – легкий).
- С помощью физико-химических и иммунологических методов доказано существование 5 классов Ig с молекулярной массой от 150 000 до 900 000 Д (дальтон), обозначаемых Ig A, Ig M, Ig G, Ig E, Ig D.
- Принадлежность иммуноглобулинов к определенному классу определяется **типом тяжелых цепей**. У IgA тяжелые цепи α (альфа), IgM – μ (мю), IgG – γ (гамма), IgE – ϵ (эпсилон), IgD – δ (дельта). У всех иммуноглобулинов легкие цепи могут быть или обе λ (лямбда), или обе κ (каппа).

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ (от лат. serum - сыворотка) РЕАКЦИИ — реакции взаимодействия антигена и антитела, при которых один из ингредиентов неизвестен, протекают в две фазы:

1-я фаза - специфическая — образование комплекса антиген - антитело, видимого изменения нет;

2-я фаза — неспецифическая - комплекс антиген — антитело взаимодействует с неспецифическими факторами среды (электролиты - вещества, проводящие электрический ток [растворы солей]; комплемент - набор иммунных белков, содержащихся в сыворотке крови [кровь без форменных элементов], фагоцит. Результат взаимодействия виден невооруженным глазом (склеивание, растворение, помутнение).

- Для определения наличия комплексов антиген-антитело в биологических средах используются методы иммунохимического анализа, которые можно разделить на следующие группы:

- 1.Прямые методы определения реакции антиген-антитело. Образующийся при этом комплекс антиген-антитело идентифицируется визуально либо с помощью оптических устройств.
- К методам определения растворимых антигенов относятся преципитация в растворе (реакция турбодиметрии и нефелометрии), в геле, на полимерной пленке. К методам определения корпускулярных антигенов (клеточных) относятся агглютинация бактериальных клеток, прямая реакция агглютинации эритроцитов специфическими антителами к этим антигенам.

- 2. Реакции пассивной агглютинации, т. е. агглютинации частиц, поверхность которых sensibilized антигенами или антителами. К этим методам относятся реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) и непрямой гемагглютинации (РНГА), латекс-агглютинации, реакция связывания компонента (РСК).

- 3. Методы, основанные на использовании различного рода меток для выявления реакции антиген-антитело. К ним относятся иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунологический анализ (РИА), иммунофлюоресцентный (ИФ) метод.

Применение серологических реакций:

1. Лабораторная диагностика инфекций:

- 1) для выявления антител в сыворотке больного **(серодиагностика)**;
- 2) для определения вида антигена – выделенный микроорганизм **(идентификация)**.

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

РА — склеивание антителами антигенов (бактерии, эритроциты) в присутствии электролита (изотонического раствора натрия хлорида). При положительной РА образуются хлопья (на предметном стекле) или осадок (в пробирке).

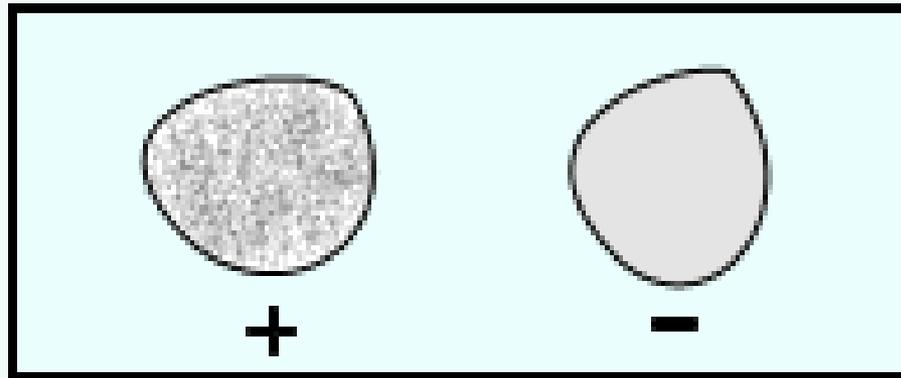
РА используют для серодиагностики брюшного тифа, бруцеллёза (реакция Райта).

Для идентификации кишечных инфекций, коклюша.

Два метода проведения РА: реакция агглютинации на стекле (ориентировочная) и развёрнутая (в пробирках).

Реакция агглютинации на стекле.

На предметном стекле к капле иммунной диагностической сыворотки (взята на второй неделе болезни людей или у выздоровевших, т.к. в ней достаточно АТ или у гипериммунизированных лошадей) добавляют чистую культуру возбудителя, выделенного от больного. Через 1-5 мин в ранее прозрачной капле образуются хлопья, которые состоят из комплексов «АГ- АТ».



Агглютинация
положительная **Контроль**
(нет агглютинации)

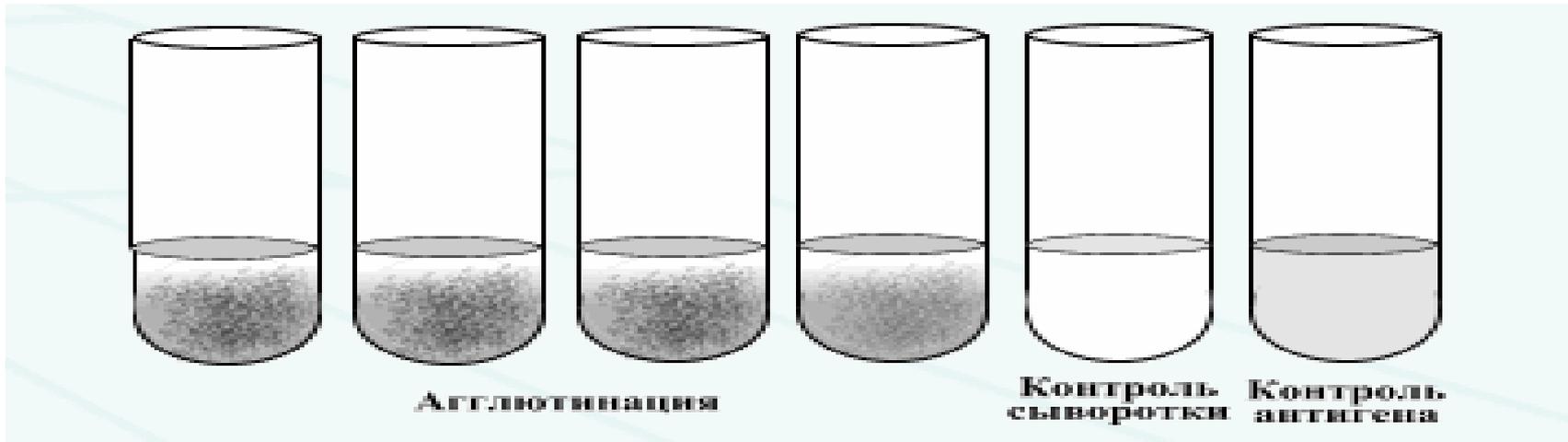
К капле агглютинирующей сыворотки (разведение 1 : 20) добавляют взвесь бактерии, выделенных от больного.

Реакция агглютинации в пробирках.

К разведениям сыворотки крови больного в электролите добавляют взвесь убитых м/о. После инкубации, при 37°C, отмечают наибольшее разведение (титр) сыворотки, при которой произошла агглютинация (образовался осадок).

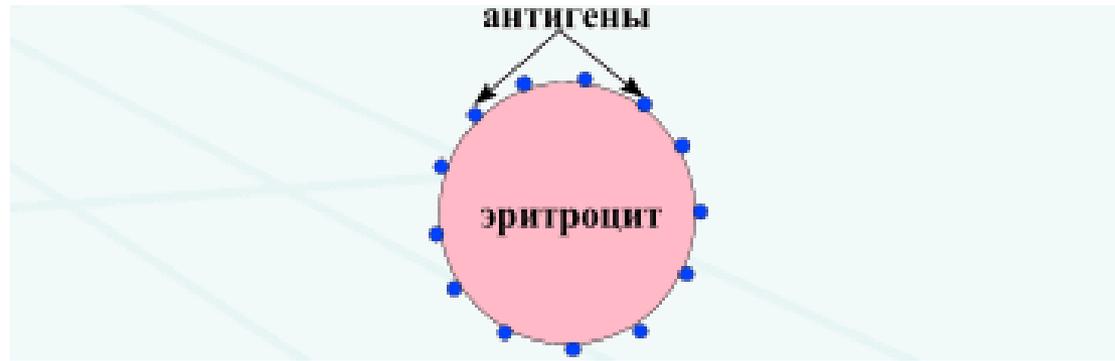
Схема реакции агглютинации:

АТ (иммунная диагностическая сыворотка) + АГ (м/о или эритроциты) + изотонический раствор = хлопья



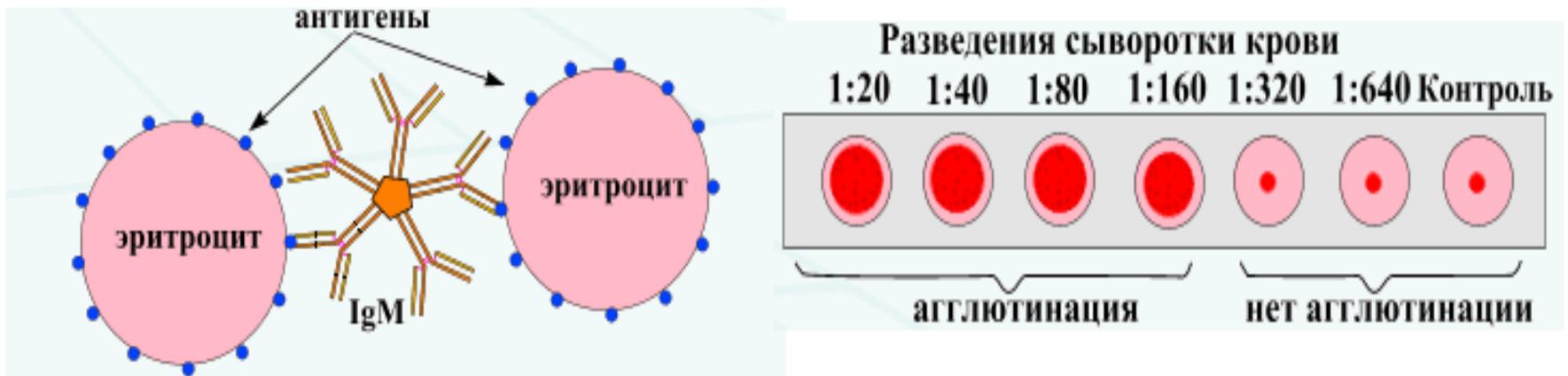
К разведениям сыворотки добавляют диагностикум.

1. Агглютинация с О-диагностикумом (бактерии, убитые нагреванием, сохранившие О- антиген) происходит в виде мелкозернистой агглютинации.
2. Агглютинация с Н - диагностикумом (бактерии, убитые формалином, сохранившие жгутиковый Н- антиген) - крупнохлопчатая и протекает быстрее.



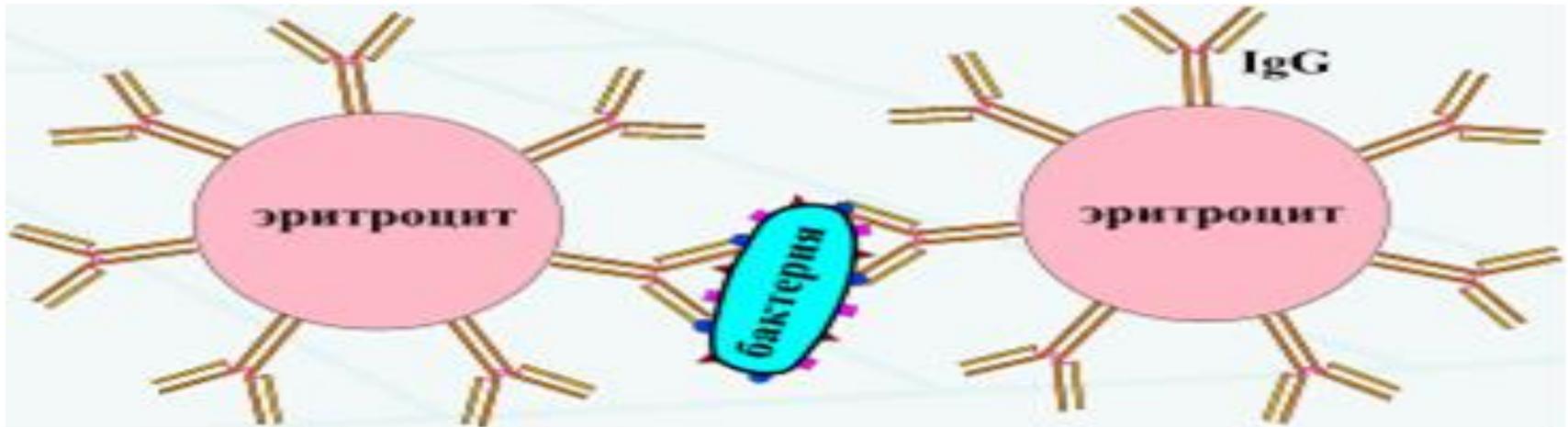
- **АНТИГЕННЫЙ ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ ДИАГНОСТИКУМ**

В РНГА выявляют антитела сыворотки крови с помощью антигенного эритроцитарного диагностикума, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами.

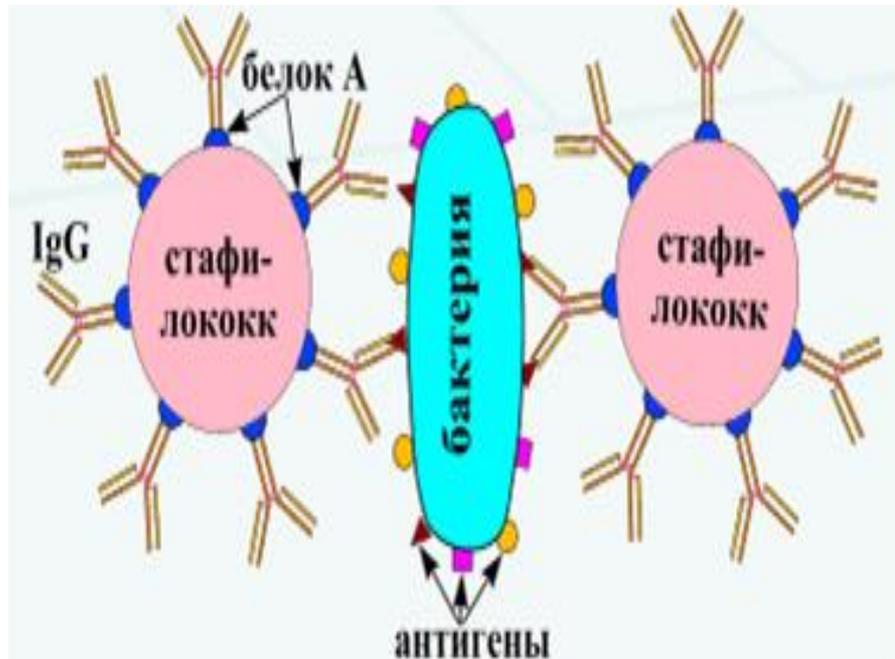
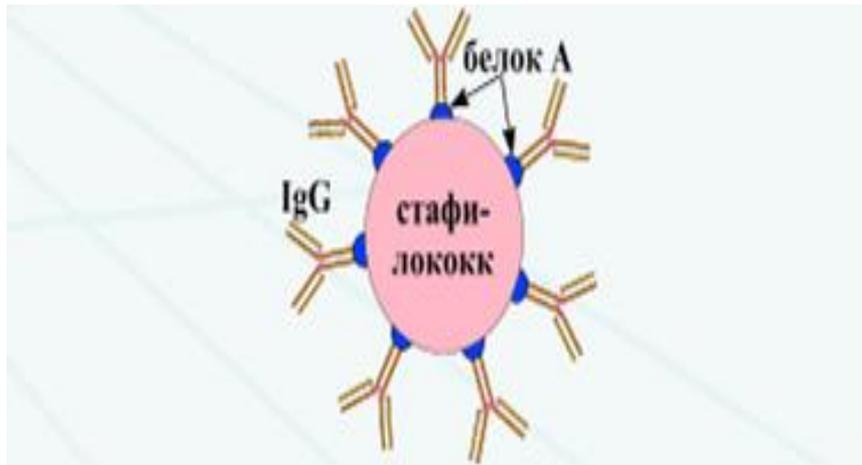


Определение антител сыворотке крови РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ (ПАССИВНОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РНГА, РПГА)

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. РНГА ставят в пластиковых планшетах или в пробирках с разведениями сыворотки крови больного, к которым добавляют эритроцитарный диагностикум.



- **Определение возбудителя РОПГА (РОНГА)**
Иногда применяют антительный эритроцитарный диагностикум - эритроциты, на которых адсорбированы антитела. Например, можно обнаружить ботулинический токсин, добавляя к нему эритроцитарный антительный ботулинический диагностикум (такую реакцию называют реакцией обратной не прямой (пассивной) гемагглютинации)



- **Определение возбудителя РЕАКЦИЮ КОАГГУТИНАЦИИ** применяют для определения антигенов с помощью антител, адсорбированных на белке А клеток стафилококка (антительный диагностикум). Белок А имеет сродство к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, поэтому такие бактерии, обработанные иммунной диагностической сывороткой неспецифически адсорбируют антитела сыворотки, 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 ПРЕЦИПИТАЦИИ

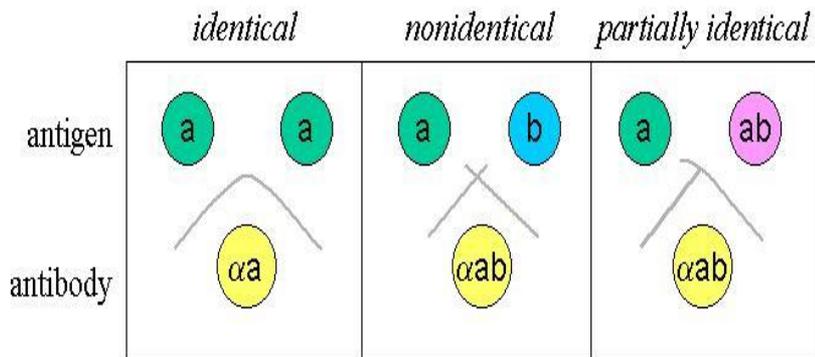
Проводят в пробирках, наслаивая растворённый в электролите АГ на иммунную сыворотку. При оптимальном соотношении АГ и АТ на границе двух растворов образуется непрозрачное кольцо – преципитат. Отличие РП от РА - размер частиц антигена

РП применяют для определения антигена при диагностике инфекций (сибирская язва, менингит); в судебной медицине — для определения **видовой принадлежности крови, спермы**; в санитарно - гигиенических исследованиях — при установлении **фальсификации продуктов**; с её помощью определяют **филогенетическое родство животных и растений**.



- **РЕАКЦИЯ КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ**

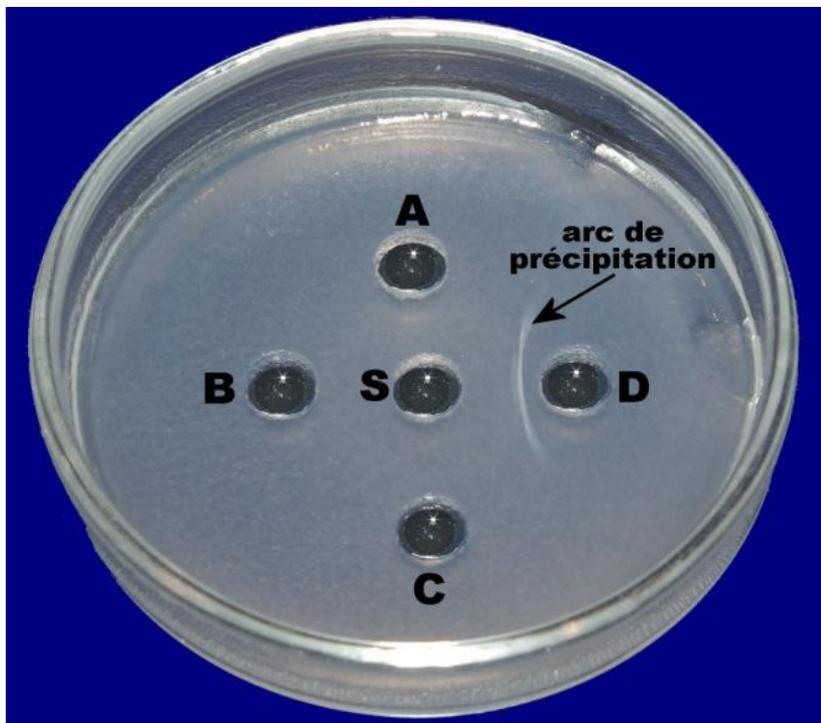
Реакцию проводят в узких преципитационных пробирках: на иммунную сыворотку наслаивают растворимый антиген. При оптимальном соотношении антигена и антител на границе этих двух растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата. Если в качестве антигенов в реакции используют прокипяченные и профильтрованные экстракты тканей, то такая реакция называется реакцией термопреципитации (реакция, при которой выявляют сибиреязвенный антиген)

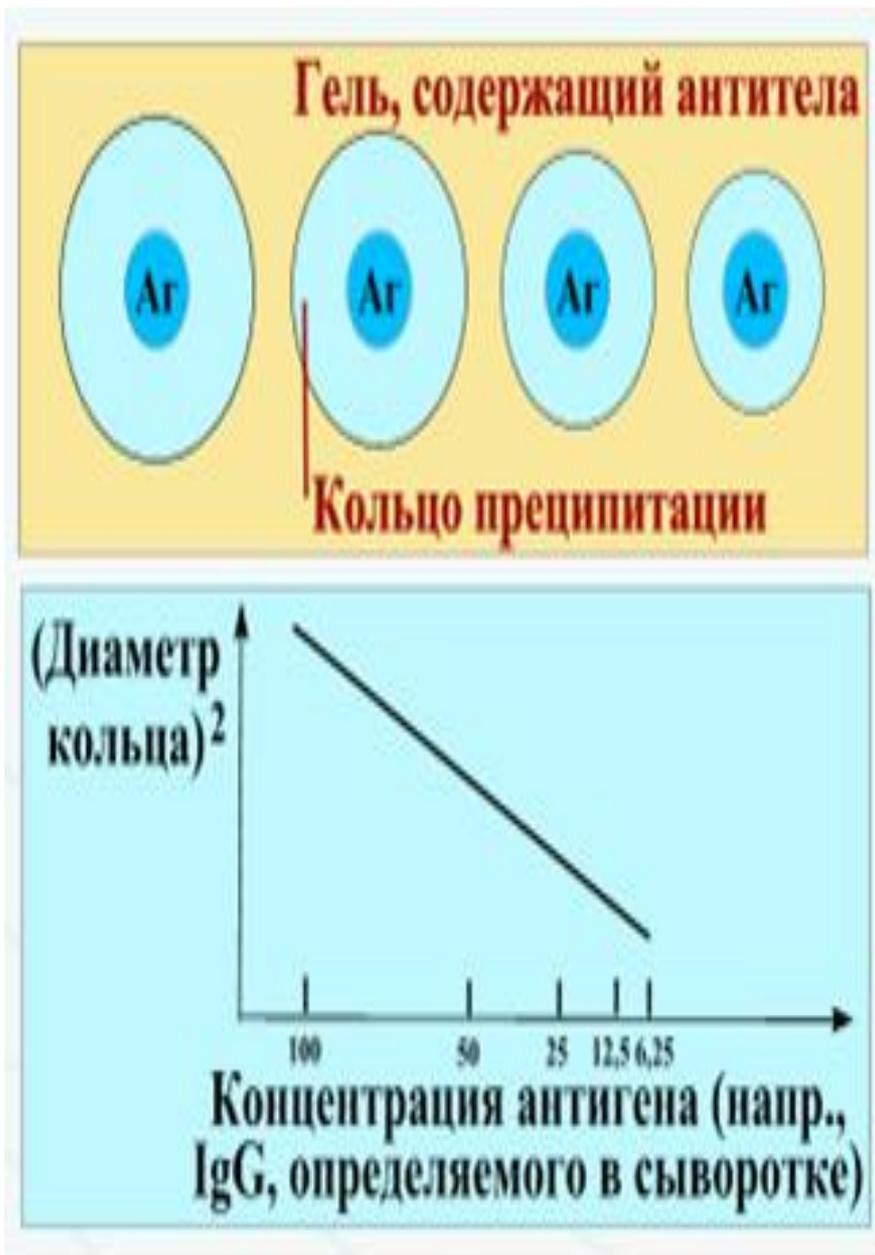


РЕАКЦИЯ ДВОЙНОЙ ИММУНОДИФФУЗИИ ПО ОУХТЕРЛОНИ

Для постановки реакции растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку и после затвердевания в нем вырезают лунки.

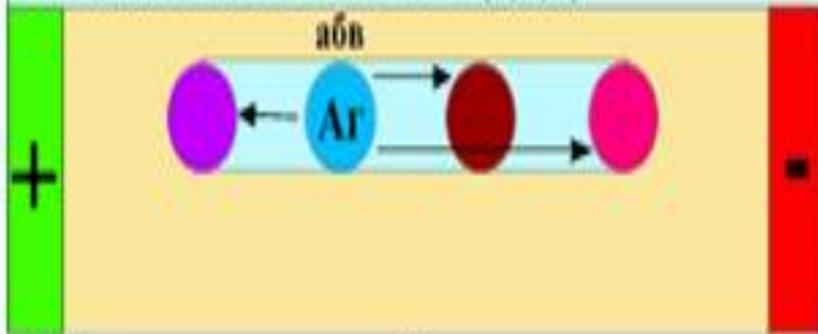
- В лунки геля отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу.
- В месте встречи в эквивалентных соотношениях они образуют преципитат в виде белой полосы.
- В многокомпонентных системах между лунками с антигенами и антителами появляется несколько линий преципитата; у идентичных АГ линии преципитата сливаются; у неидентичных АГ - пересекаются.





- **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 в сыворотке крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента и др.

1. Разделение антигенов (а,б,в)



2. Внесение иммунной сыворотки в канавку



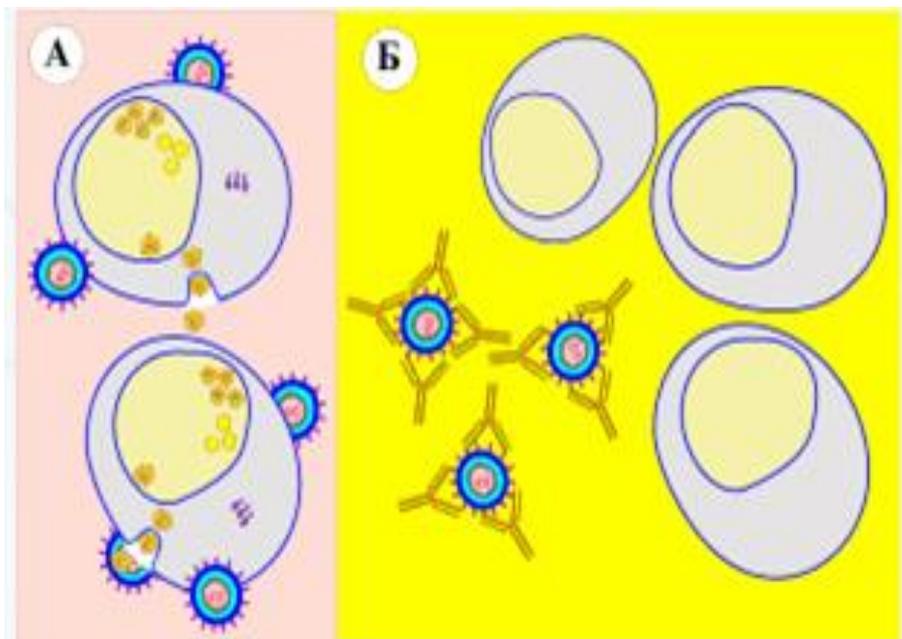
3. Диффузия и преципитация



- **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 преципитации.

РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ (РН).

- РН основана на способности АТ иммунной сыворотки нейтрализовать действие микробов и их токсинов на клетки.
- РН проводят путём введения смеси АГ – АТ животным. При отсутствии у животных повреждающего действия говорят о нейтрализующем действии сыворотки. РН применяют для приготовления антитоксических сывороток.



- **РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ** вирусов в культуре клеток: А - цитопатогенный эффект (ЦПЭ) в результате размножения вирусов; Б - ЦПЭ отсутствует в результате нейтрализации вирусов антителами.

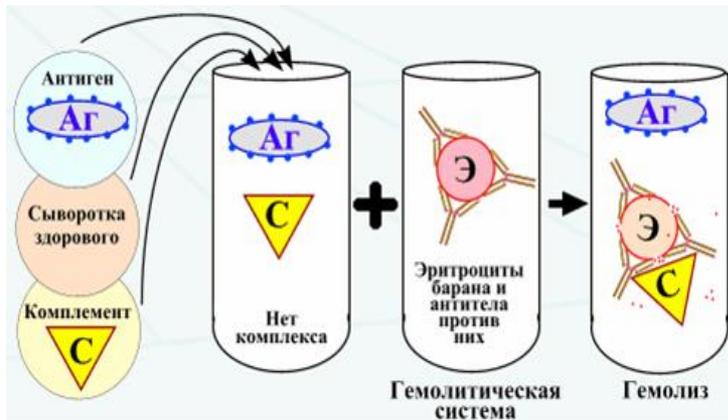
РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

- заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они 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 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.

СХЕМА РСК сывороткой больного



СХЕМА РСК с сывороткой здорового



РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

В 1-й фазе реакции при образовании комплекса антиген - антитело происходит связывание им комплемента, и тогда во 2-й фазе гемолиз сенсibilизированных 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).



- Прямая РИФ

- **РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ)**

Реакция 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.



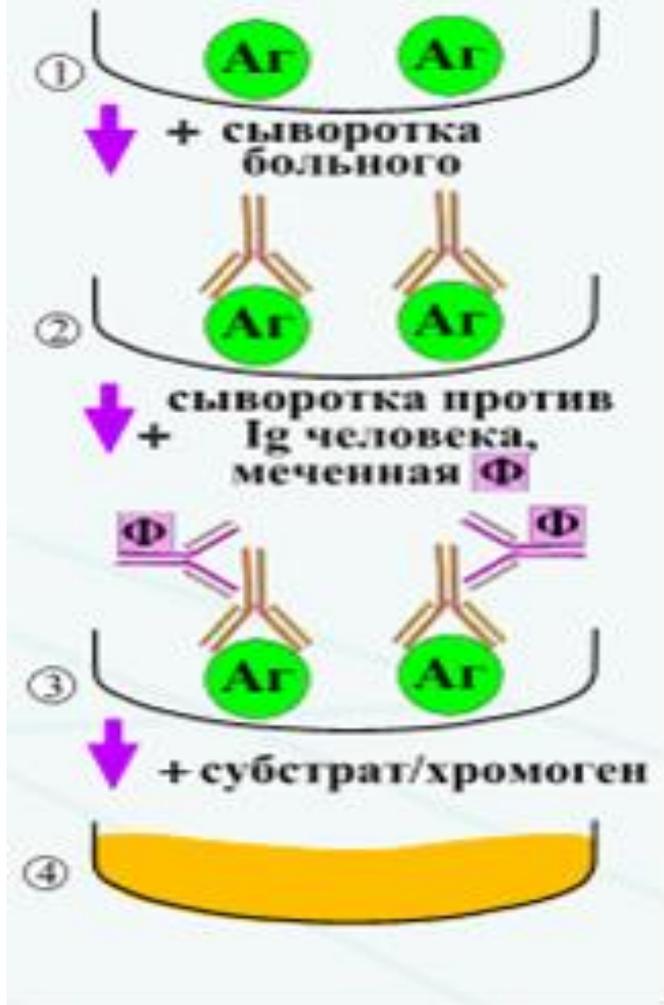
- Непрямая РИФ

- **РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ)**

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 анализ (ИФА)

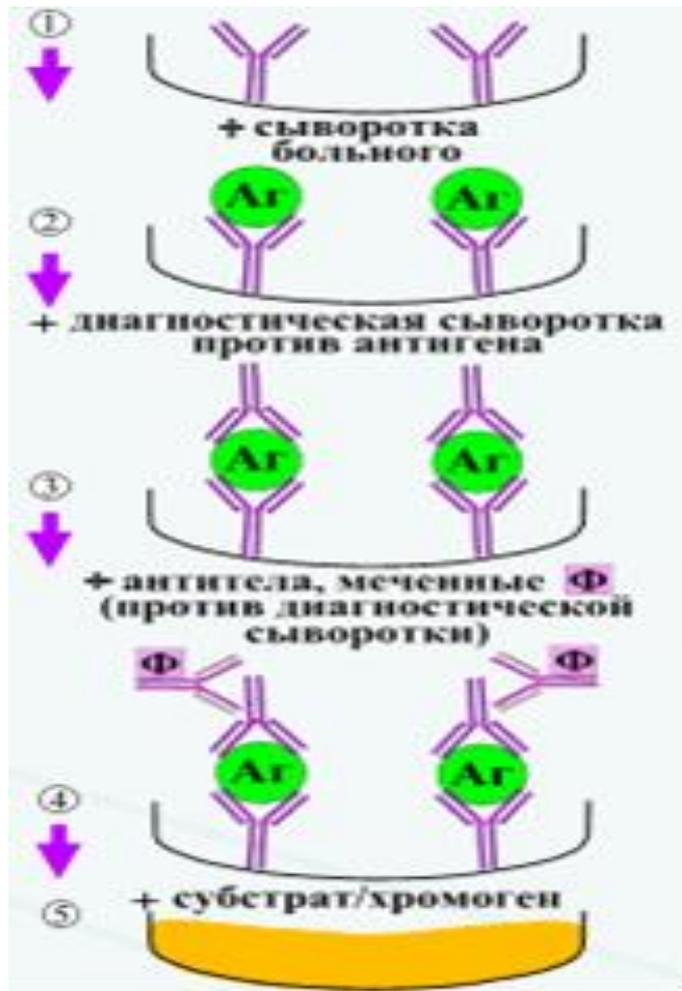
- Метод выявления АГ с помощью АТ, конъюгированных ферментом – меткой (например, щелочная фосфатаза).
- ИФА применяется для диагностики ВИЧ, вирусных гепатитов, герпеса, вируса Эпштейн-Барра, инфекций передаваемых половым путем (сифилис, уреаплазма, хламидии), выявления онкомаркеров, гормонов.



- Определение антител в сыворотке больного

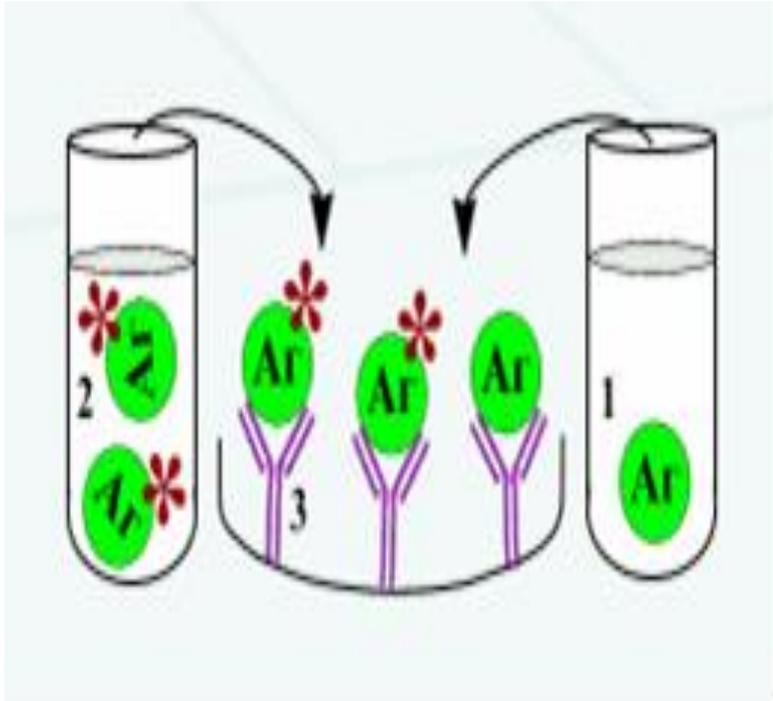
- **ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИФА**

- вариант теста, когда один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе, напр., в лунках планшеток из полистирола. Компоненты выявляют добавлением меченых антител или антигенов. При положительном результате изменяется цвет хромогена. Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют не связавшиеся реагенты путем промывания. I. При определении антител в лунки планшеток с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больного, антиглобулиновую сыворотку, меченную ферментом и субстрат/хромоген для фермента.



- **ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИФА**
- II. При определении антигена в лунки с сорбированными антителами вносят антиген (напр., сыворотку крови с искомым антигеном), добавляют диагностическую сыворотку против него и вторичные антитела (против диагностической сыворотки), меченные ферментом, а затем субстрат/хромоген для фермента.

- Определение антигена в сыворотке больного

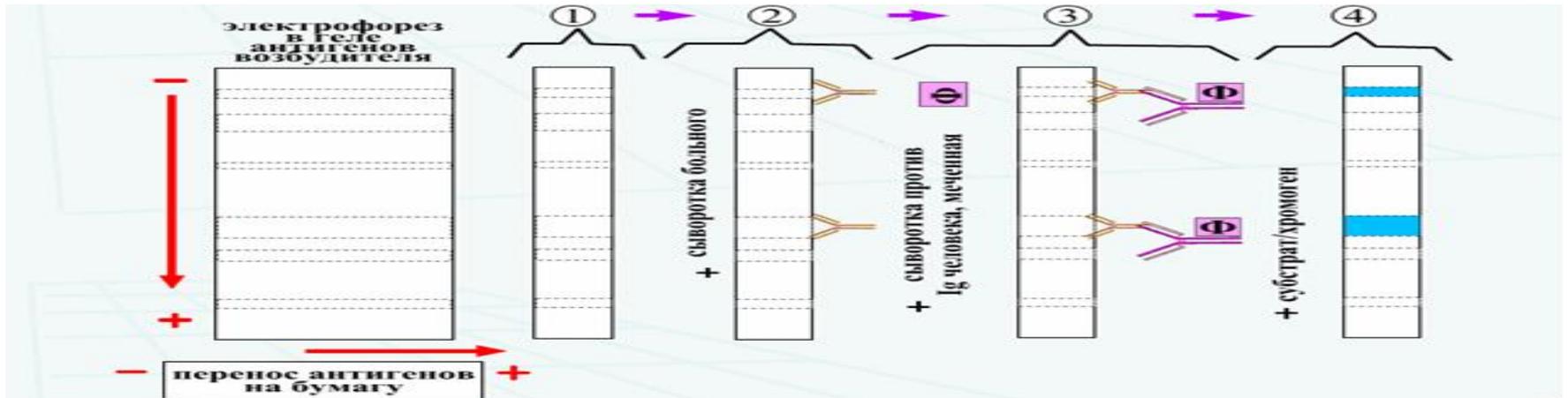


КОНКУРЕНТНЫЙ ИФА

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

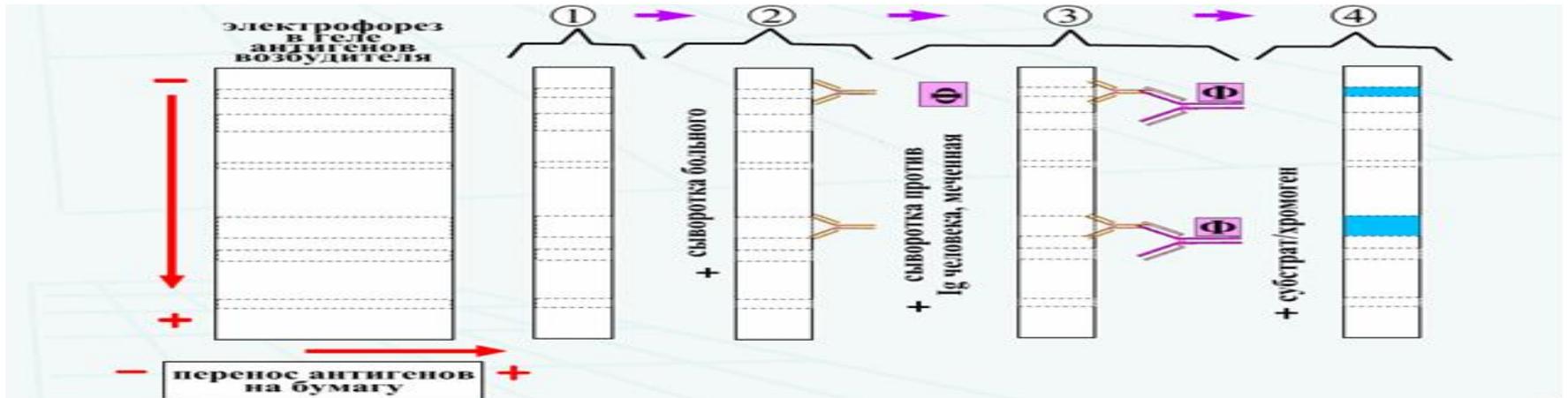
Радиоиммунологический анализ (РИА)

- АГ или АТ помечают радионуклидом. После образования комплекса АГ – АТ радиоактивный комплекс исследуют на радиоактивность, интенсивность излучения прямо пропорционально количеству связавшихся молекул антигена.



• ИММУНОБЛОТТИНГ

- высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА (или РИА). Антигены возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят их (блоттинг - от англ, blot, пятно) из геля на активированную бумагу (1) или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ИФА. Фирмы выпускают такие полоски с "блотами" антигенов*. На эти полоски наносят сыворотку больного (2).



- **ИММУНОБЛОТТИНГ**

- Затем, после инкубации, отмывают от не связавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом (3). Образовавшийся на полоске комплекс [антиген + антитело больного + антитело против Ig человека] выявляют добавлением хромогенного субстрата (4), изменяющего окраску под действием фермента.

- * Метод переноса пятен ДНК первоначально разработал Сазен (Southern) - фамилия означает ЮЖНЫЙ; метод получил название сазенблоттинг (южный перенос). Метод переноса фрагментов ДНК называют нозенблоттинг (северный перенос), а метод переноса фрагментов белка - вестернблоттинг (западный перенос).

- **Определение групп крови**
- Существуют разные виды классификации крови на группы. В основе разделения крови людей на группы в системе АВО лежит наличие в эритроцитах агглютиногенов (А,В), а в плазме крови агглютининов (α , β). При взаимодействии одноименных агглютиногенов и агглютининов происходит реакция гемагглютинации, то есть склеивание эритроцитов.

- **Определение групп крови**
- Агглютиногены возникают у человека и животных еще в эмбриональном периоде развития. Агглютинины появляются позже, и титр их в сыворотке крови у детей первых недель после рождения очень низок.
- В зависимости от наличия в эритроцитах агглютиногенов А и В, а в сыворотке соответствующих им агглютининов α и β , все люди разделены на четыре группы:

- **Определение групп крови**

- Группа O (I) – в эритроцитах агглютиногенов нет, в сыворотке агглютинины α и β .
- Группа A (II) – в эритроцитах агглютиноген A, в сыворотке агглютинин β .
- Группа B (III) – в эритроцитах агглютиноген B, в сыворотке агглютинин α .
- Группа AB (IV) – в эритроцитах агглютиногены A и B, агглютининов в сыворотке нет.
- Антиген A не является однородным, существует два основных его подтипа. В соответствии с этим группа A (II) имеет две подгруппы $A(I)$ и $A_2(I)$, а группа AB(IV) – $AB(IV)$ и $A_2B(IV)$.

- **Определение групп крови**
- Групповой антиген В отличается большей однородностью, хотя описаны редкие его варианты. Однако существенного клинического значения это не имеет.
- Под термином «совместимость» понимают сочетание крови донора и реципиента по антигенам и антителам, не вызывающее иммунологических взаимодействий.

- **Определение групп крови**
- Групповая принадлежность крови по системе АВО определяется с помощью реакции агглютинации. В настоящее время используют три способа определения групп крови по системе АВО:
- 1. По стандартным изогемагглютинирующим сывороткам. Суть метода сводится к обнаружению в испытуемой крови групповых антигенов А и В с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток.

- **Определение групп крови**
- 2. По стандартным изогемагглютинирующим сывороткам и стандартным эритроцитам (перекрестный способ). Суть метода состоит в определении наличия или отсутствия в исследуемой крови групповых антигенов А и В с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток, а также групповых антител α и β с помощью стандартных эритроцитов.

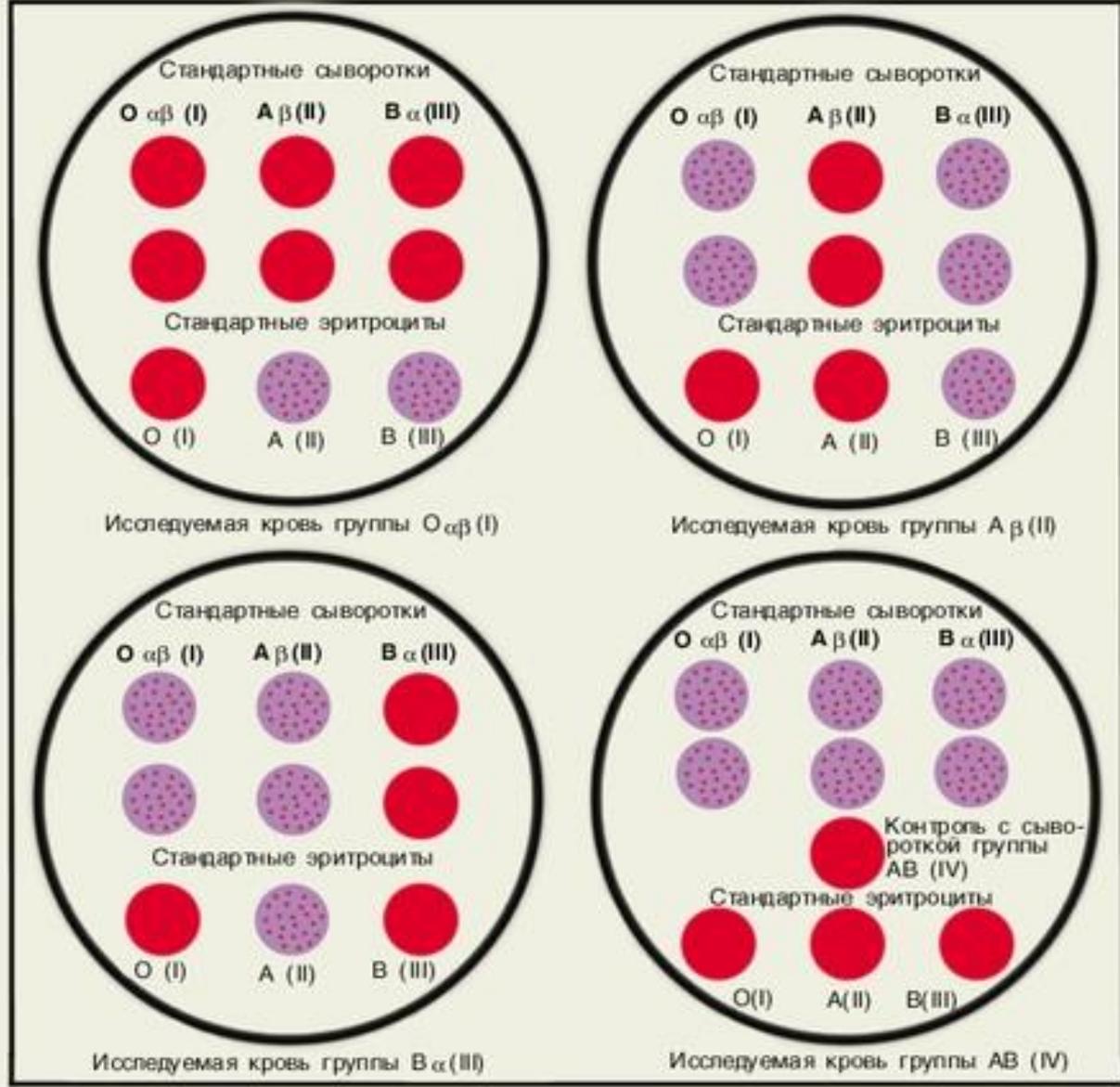
- **Определение групп крови**
- 3. С помощью моноклональных антител (целиклонов анти-А и анти-В). Для определения группы крови используются моноклональные антитела, для получения которых применяется гибридная биотехнология.
- При плановом исследовании врач стационара определяет группу крови по стандартным изогемагглютинирующим сывороткам или с помощью целиклонов, после чего посылает кровь в серологическую лабораторию для проверки группы перекрестным методом.

Результат реакции со стандартными сыворотками группы:			Исследуемая кровь принадлежит к группе:
O αβ (I)	A β (II)	B α (III)	
			O (I)
			A (II)
			B (III)
			AB (IV)
Контроль с сывороткой группы AB (IV)			

1

Реакция отрицательная

Реакция положительная



2

Спасибо за внимание!

