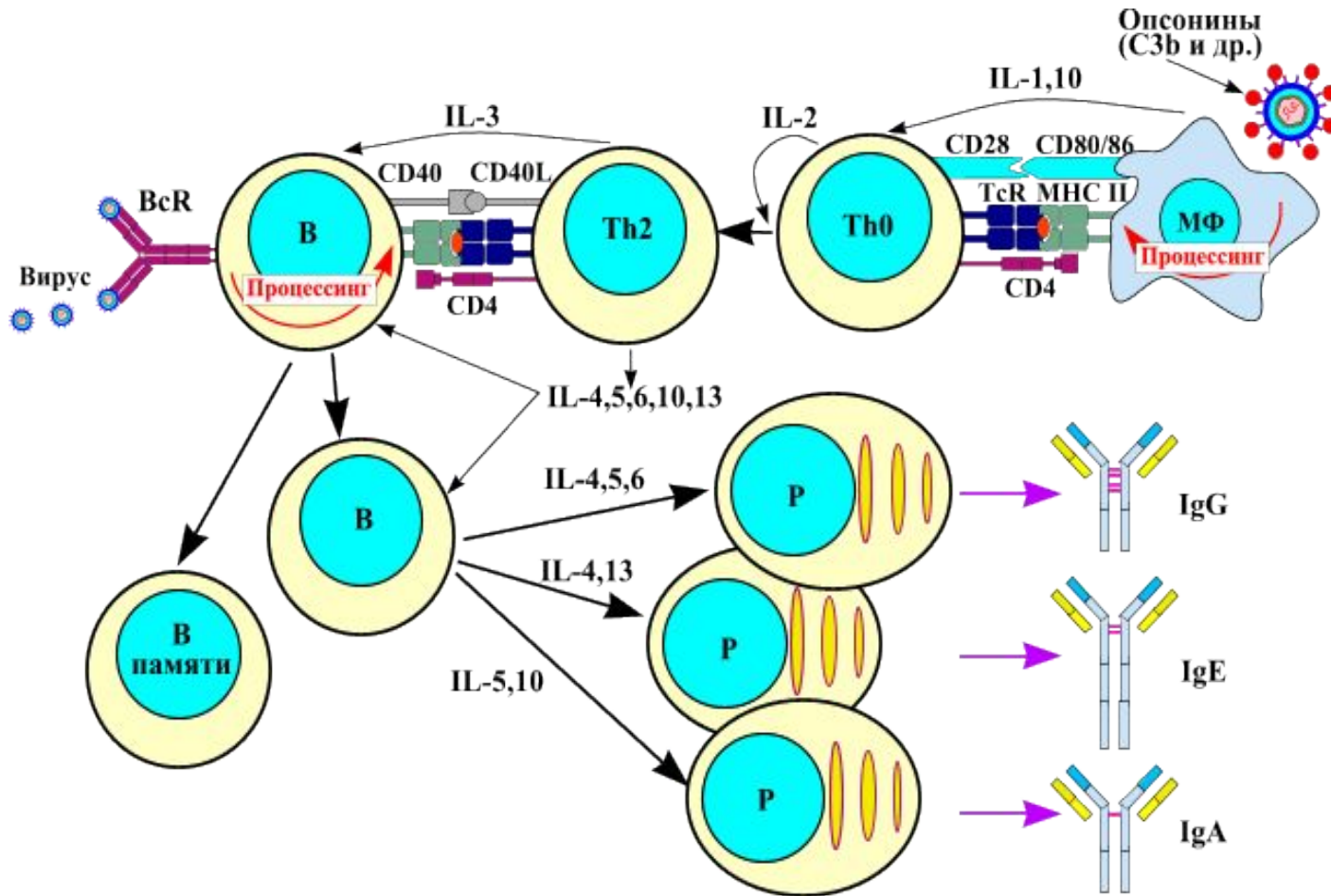
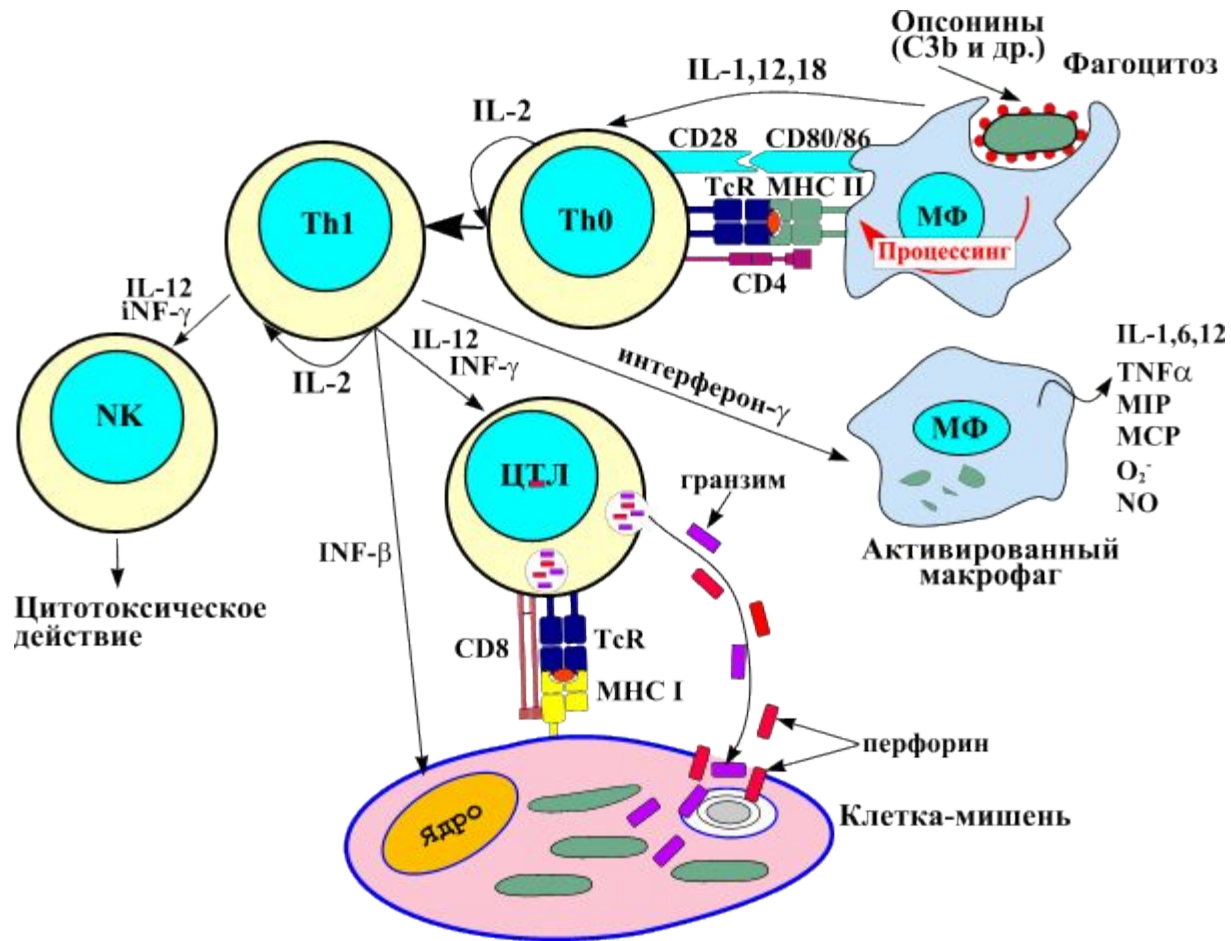


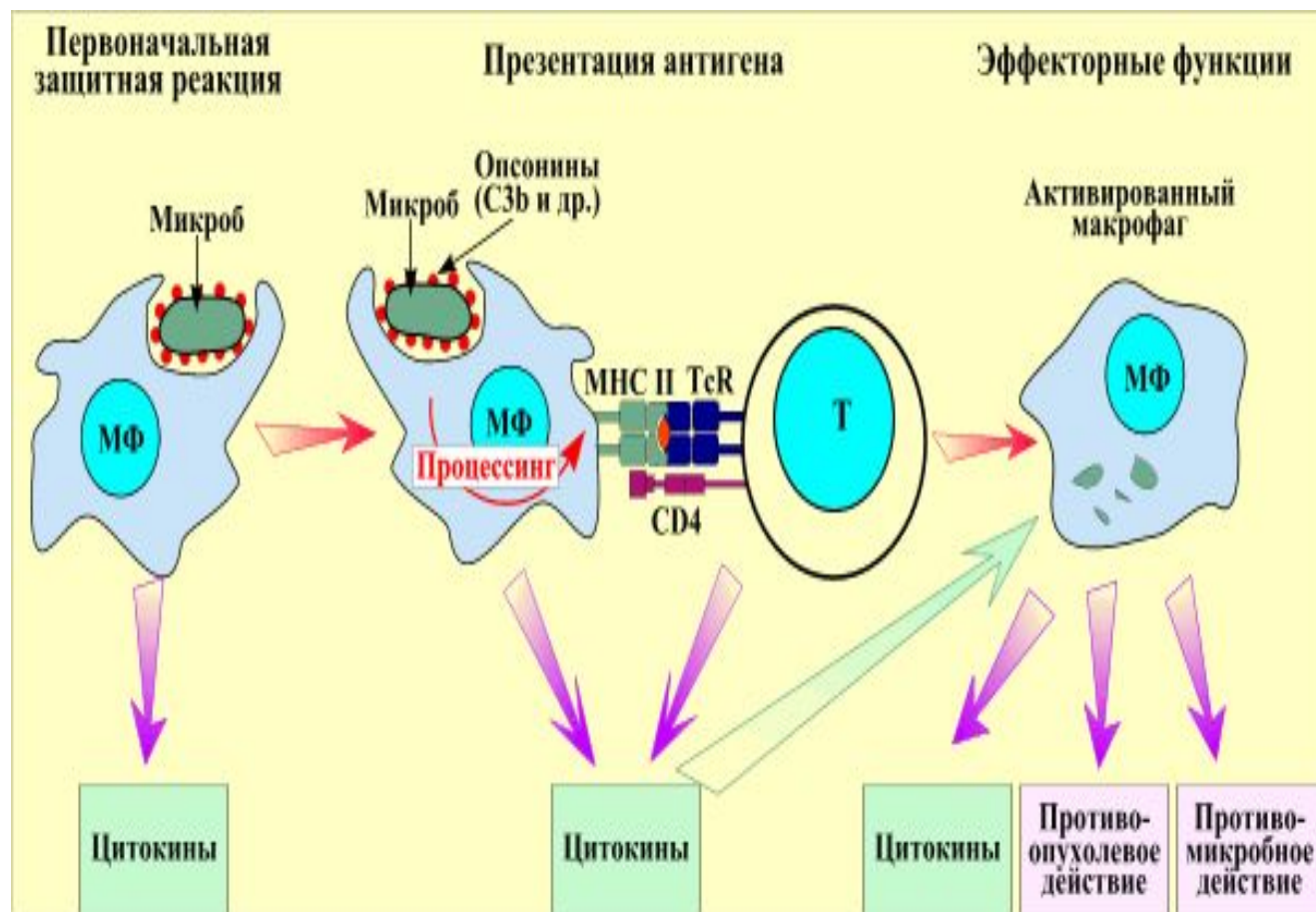
Схема гуморального ответа



Клеточный иммунный ответ



Центральная роль макрофага в иммунитете



Иммунодиагностические реакции (реакции антиген — антитело)

- **Иммунные реакции** используют при диагностических и иммунологических исследованиях у больных и здоровых людей.
- 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. Обнаружение в сыворотке крови больного антител против антигенов возбудителя позволяет поставить диагноз болезни. Серологические исследования применяют также для идентификации антигенов микробов, различных биологически активных веществ, групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, иммунных комплексов, рецепторов клеток и др. 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.

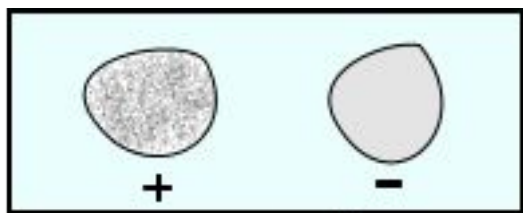
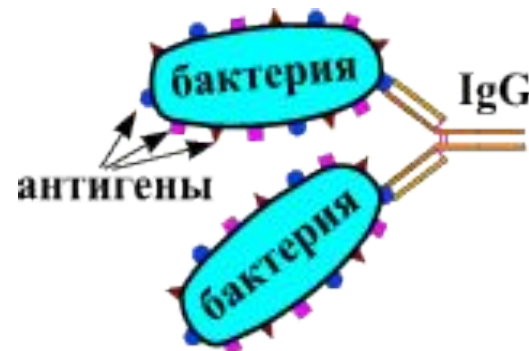
•

Иммунологические реакции

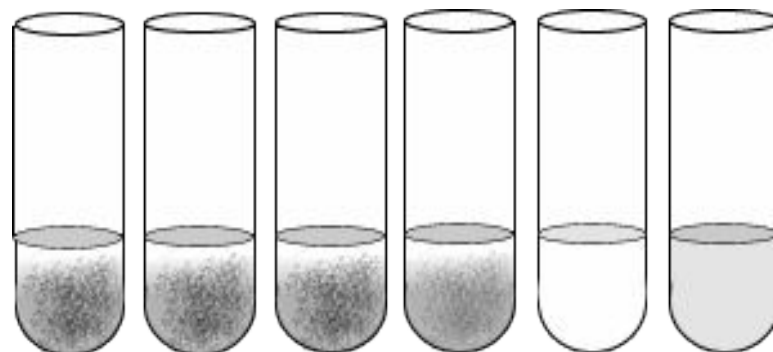
- реакция агглютинации (РА);
реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации [РНГА (РПГА)];
реакция коагглютинации (РКА);
реакция Кумбса (РК);
реакция торможения гемагглютинации (РТГА);
реакция преципитации (РП);
реакция нейтрализации (РН);
реакция связывания комплемента (РСК);
реакция радиального гемолиза (РРГ);
реакция иммуноприлипания (РИП);
реакция иммунофлюоресценции (РИФ);
иммуноферментный анализ (ИФА);
радиоиммунный анализ (РИА);
иммуноблоттинг (ИБ);
иммунная электронная микроскопия (ИЭМ).
-

Реакция агглютинации (от лат. agglutinatio – склеивание) – склеивание корпускул (бактерий, эритроцитов и др.) антителами в присутствии

электролитов – натрия хлорида ■



Агглютинация положительная Контроль (нет агглютинации)



Агглютинация

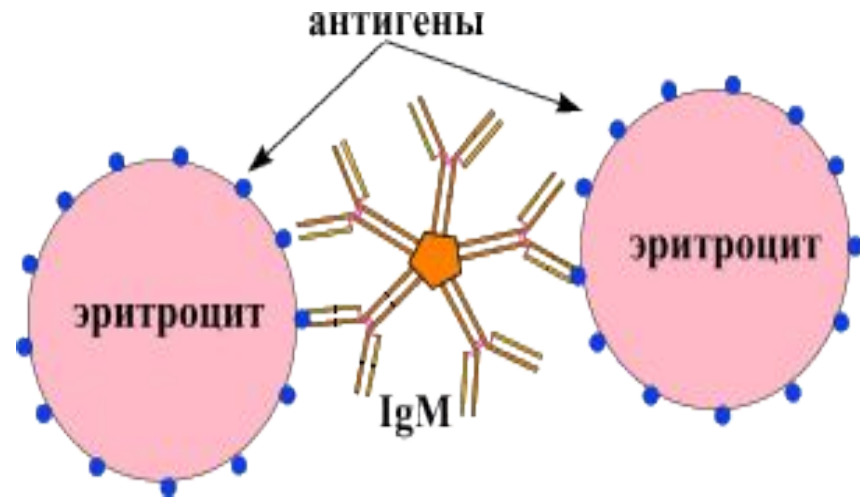
Контроль сыворотки Контроль антигена

РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ (ПАССИВНОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РНГА, РПГА)

- **РНГА** выявляют антитела сыворотки крови с помощью **антигенного эритроцитарного диагностикума**, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами. **Антигенный эритроцитарный диагностикум**
- **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**

Реакция непрямой (пассивной) агглютинации

- Антигенный эритроцитарный
- диагностикум



Разведения сыворотки крови

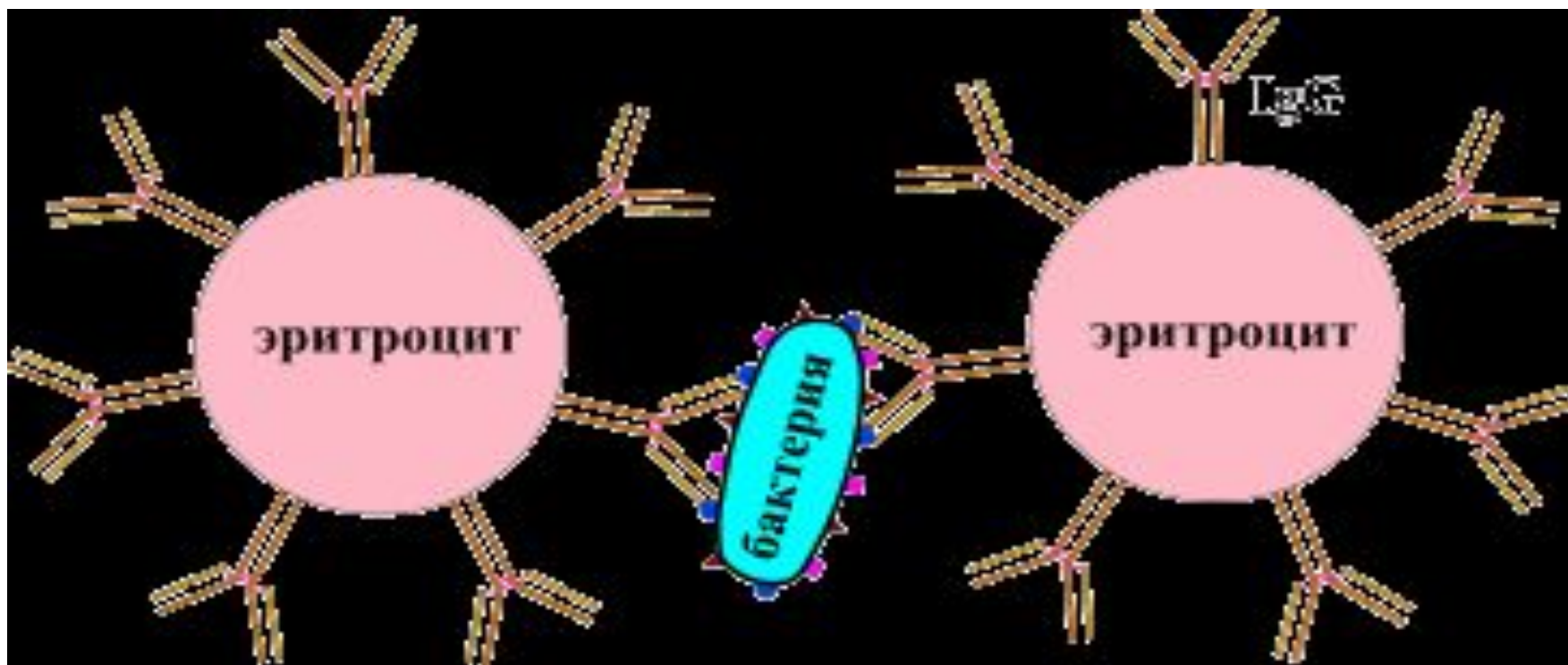
1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 Контроль



агглютинация

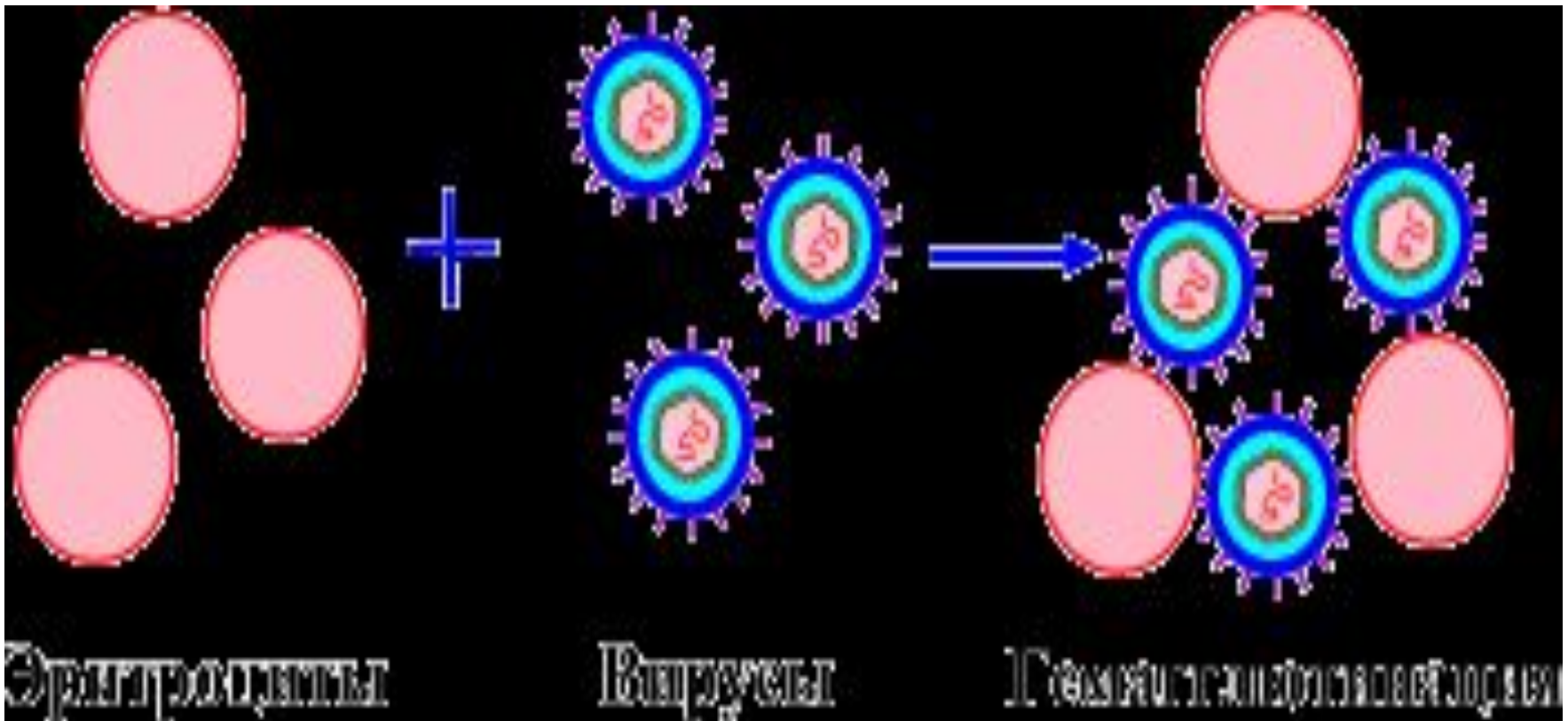
нет агглютинации

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 непрямой гемагглютинации – **РОНГА**).



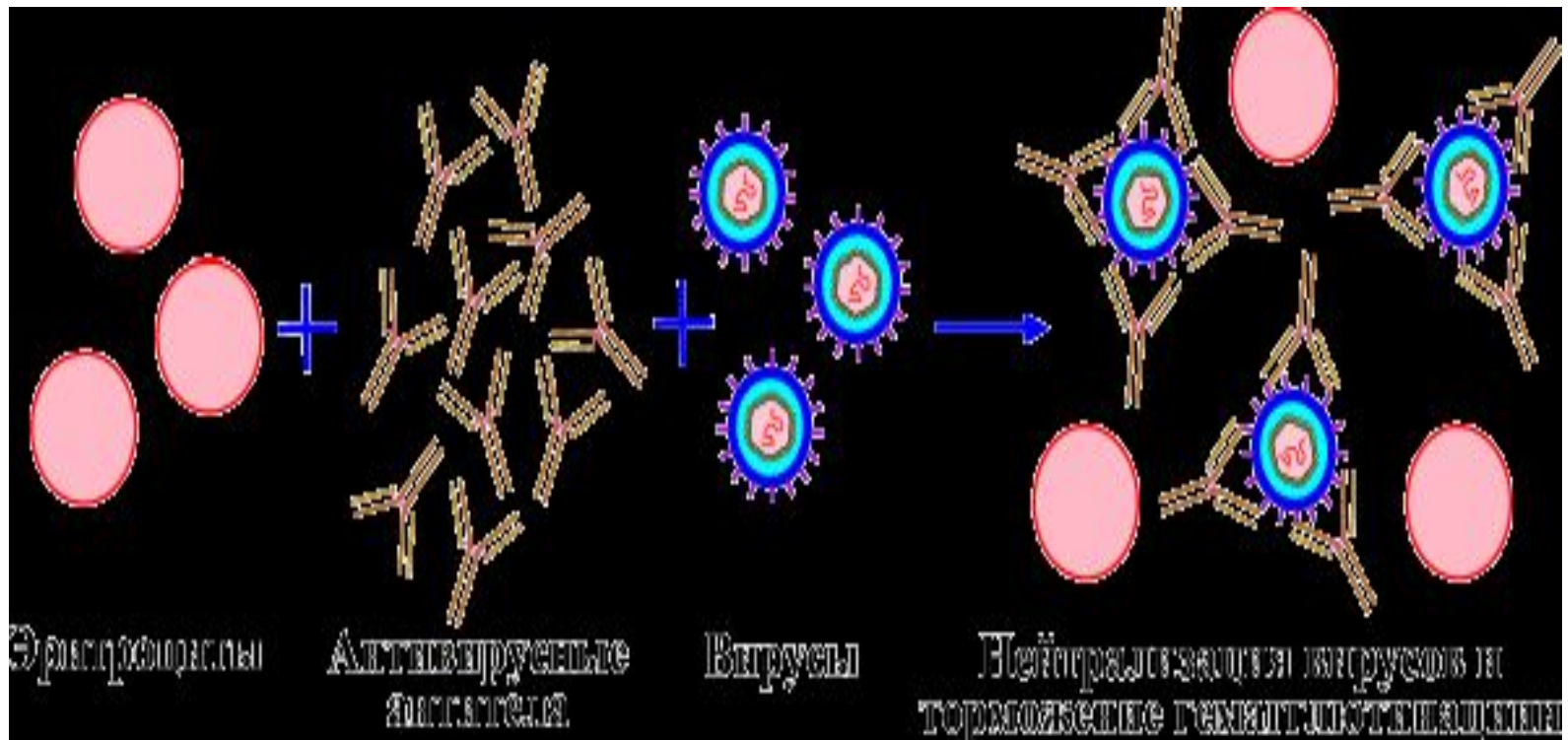
РЕАКЦИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РГА)

Гемагглютинины вирусов склеивают эритроциты. Это свойство используют в реакции гемагглютинации для индикации и титрования вирусов, что необходимо для последующей постановки РТГА.



РЕАКЦИЯ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РТГА)

Реакция торможения гемагглютинации основана на блокаде, подавлении антигенов (гемагглютининов) вирусом 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.



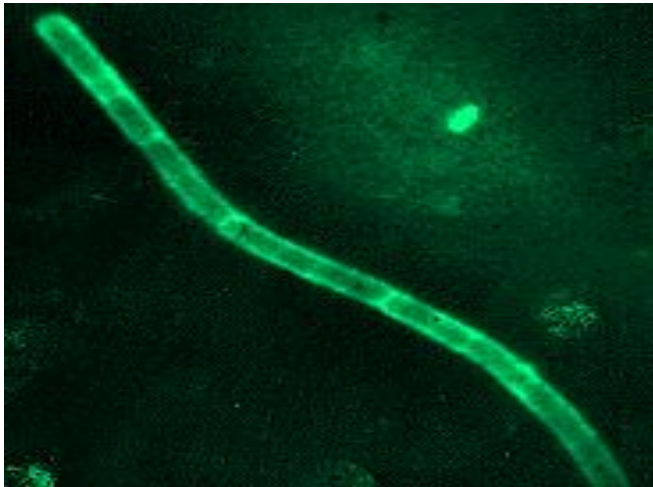
Реакция иммунофлюоресценции — РИФ (метод Кунса).

- Различают три разновидности метода: прямой, непрямой, с комплементом. 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, меченными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета

Прямая РИФ

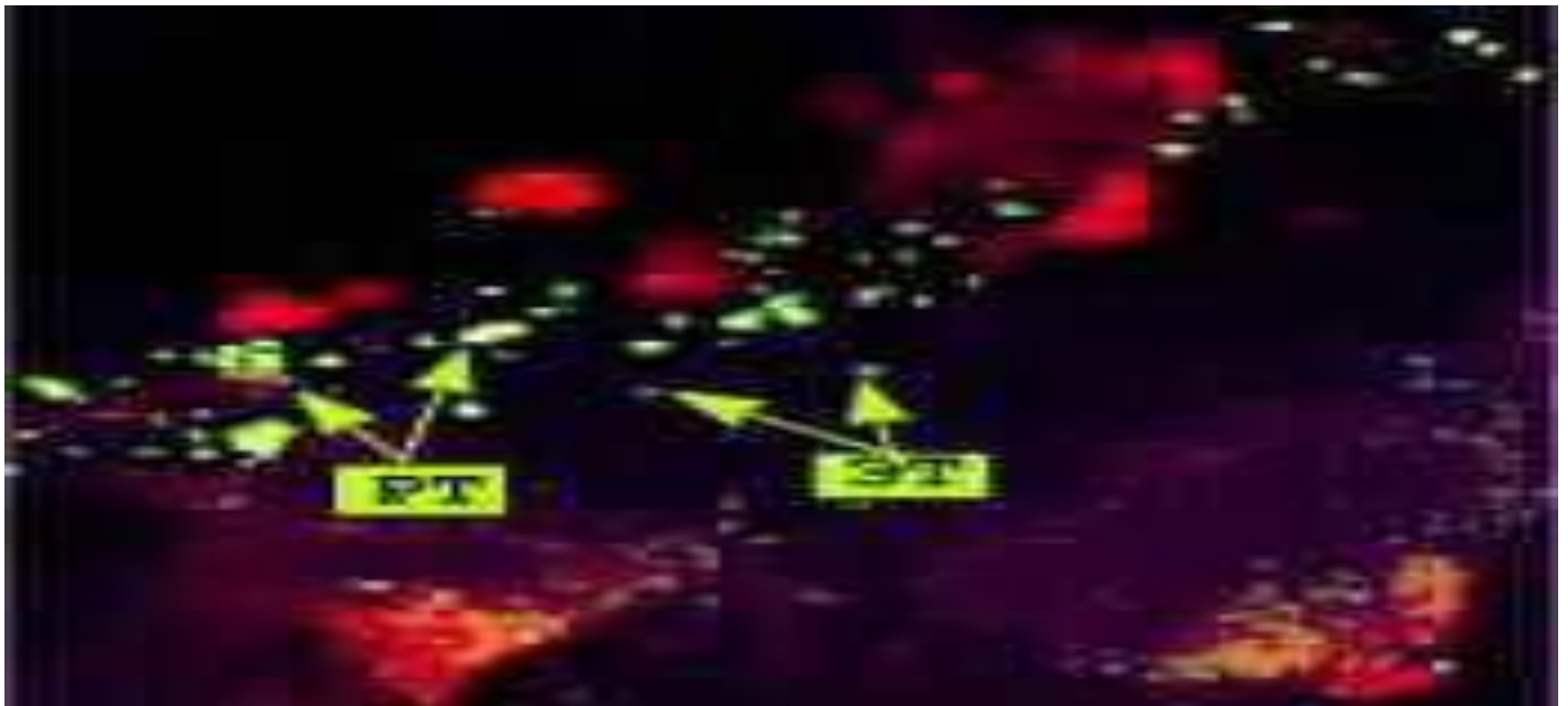
-

РИФ
(*B.anthras*)



Элементарные (ЭТ) и ретикулярные тельца (РТ) в соскобе из уrogenитального тракта больного. Окраска флюоресцирующими моноклональными антителами (прямой метод РИФ).

Контрастирование — синька Эванса.



Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген — антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом.

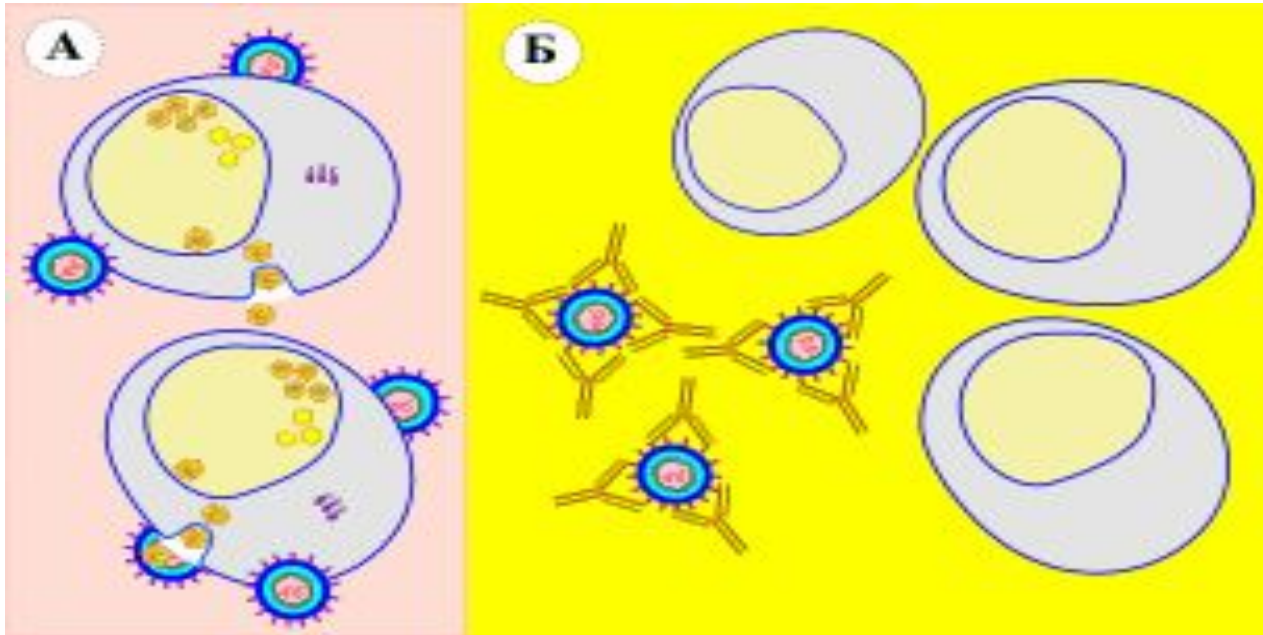
Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом



Реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток:

А - цитопатогенный эффект (ЦПЭ) в результате размножения вирусов;

Б - ЦПЭ отсутствует в результате нейтрализации вирусов антителами



РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ (РН)

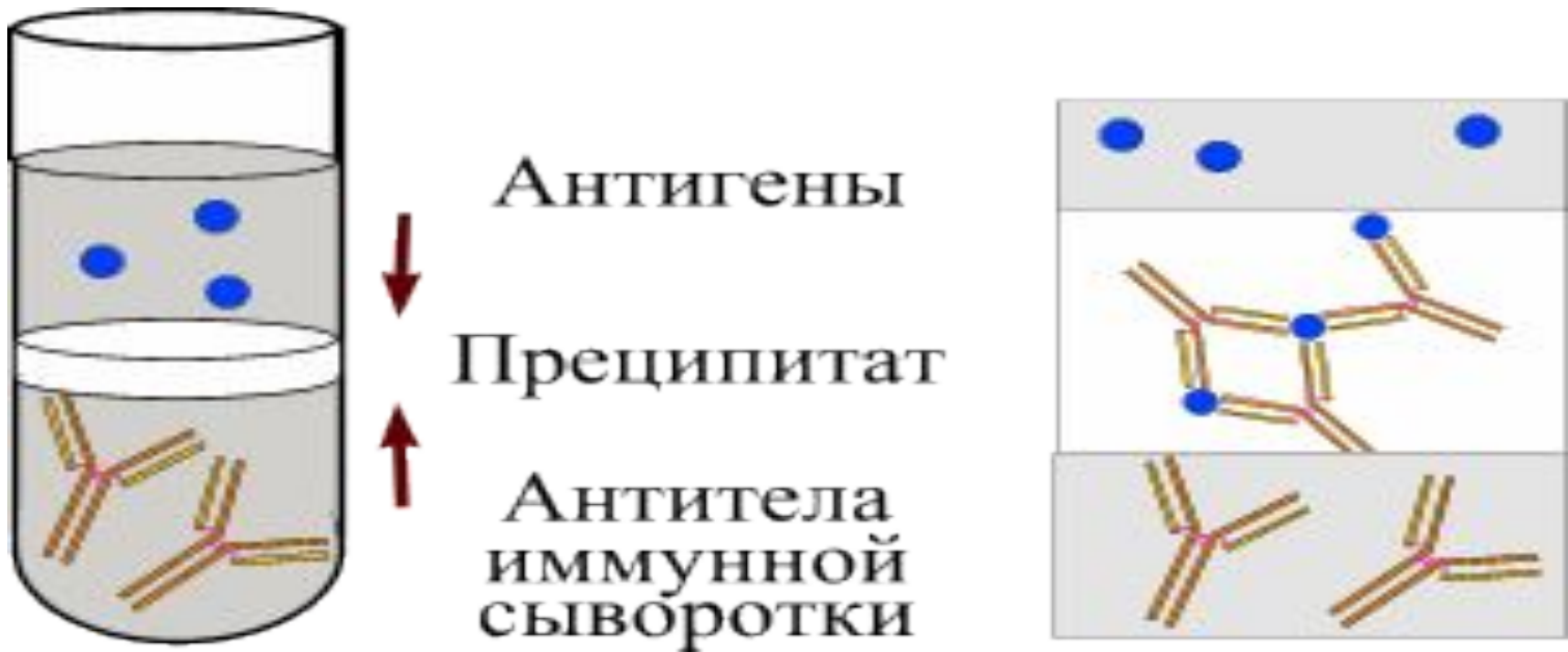
- Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие микробов или их токсинов на чувствительные клетки и ткани, что связано с блокадой микробных антигенов антителами, т.е. их нейтрализацией.
- Реакцию нейтрализации (РН) проводят путем введения смеси антиген — антитело животным 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

РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ (РП)

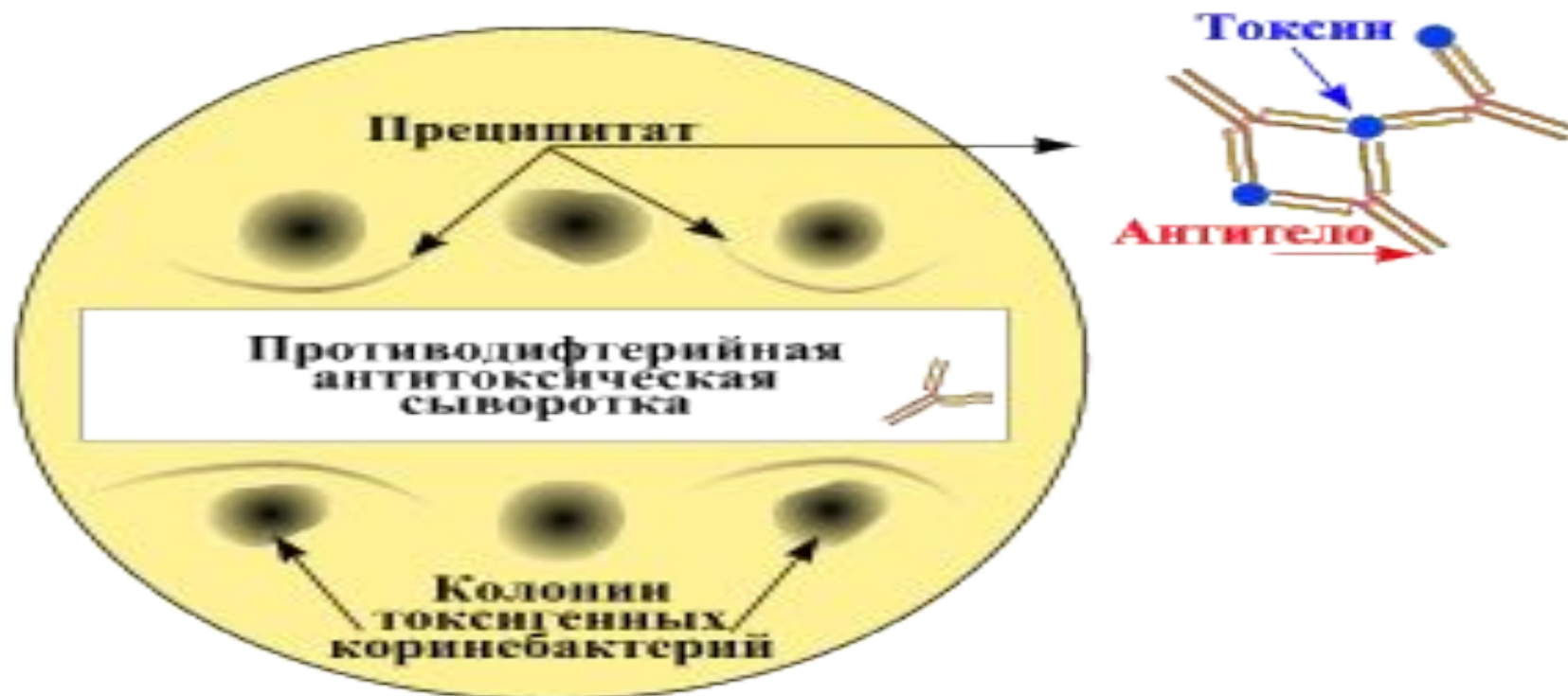
- **Реакция преципитации - РП** (от лат. praecipito *осаждать*) — это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого *преципитатом*.
- Он образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах; избыток одного из них снижает уровень образования иммунного комплекса. Реакцию преципитации ставят в пробирках (реакция кольцепреципитации), в гелях, питательных средах и др.
- Широкое распространение получили разновидности реакции преципитации в полужидком геле агара или агарозы: *двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез* и др.

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 precipитата**.



Штаммы **C.diphtheriae** могут быть токсигенными (продуцирующими экзотоксин) и нетоксигенными. Образование экзотоксина зависит от наличия в бактериях профага, несущего tox-ген, кодирующий образование экзотоксина. При заболевании все изоляты тестируются на токсигенность - продукцию дифтерийного экзотоксина.



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

Г-реакция связывания комплемента (Г-СК)

заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (С), 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.
- 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**).

РСК

- 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).

РСК с сывороткой больного

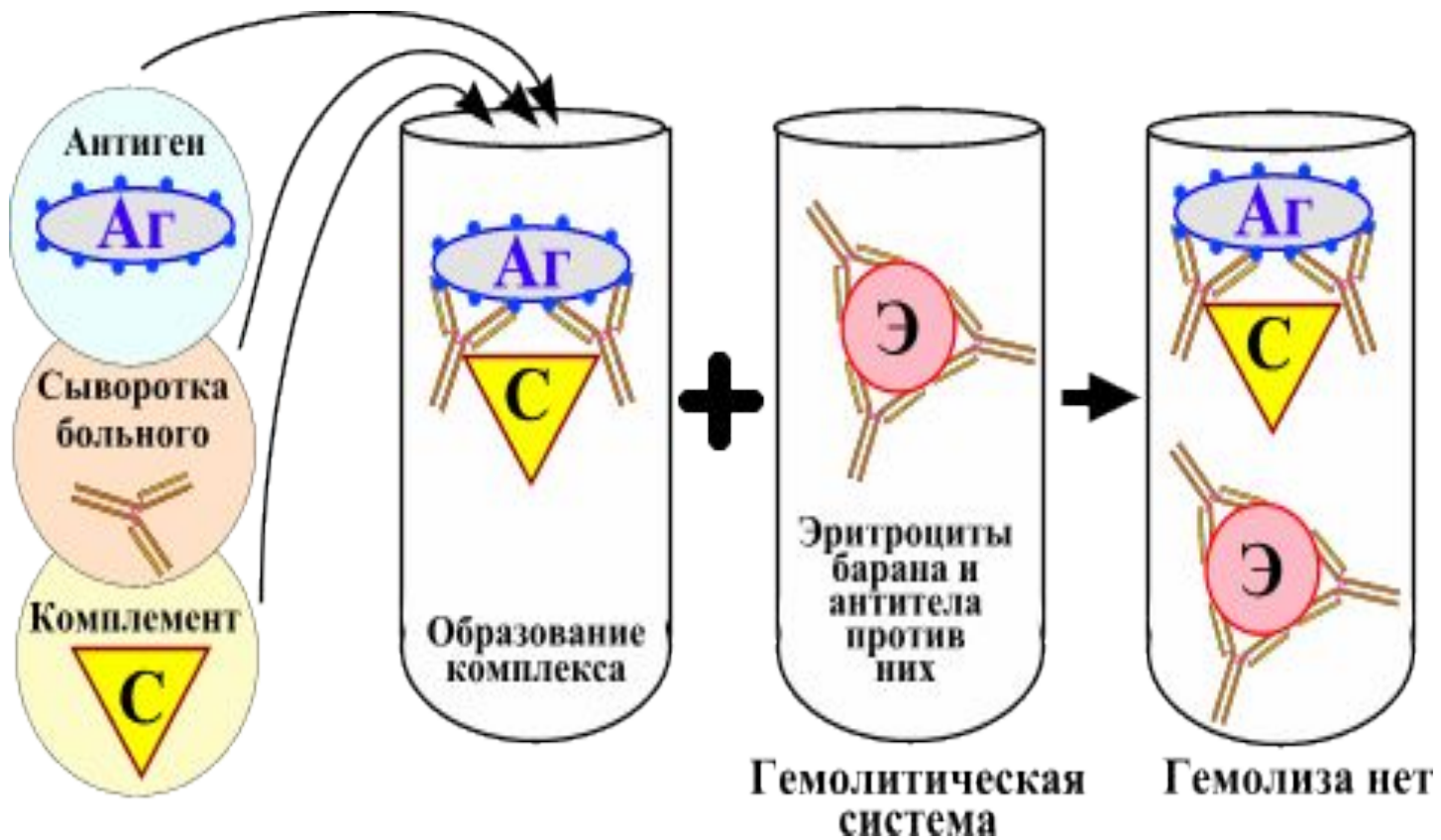
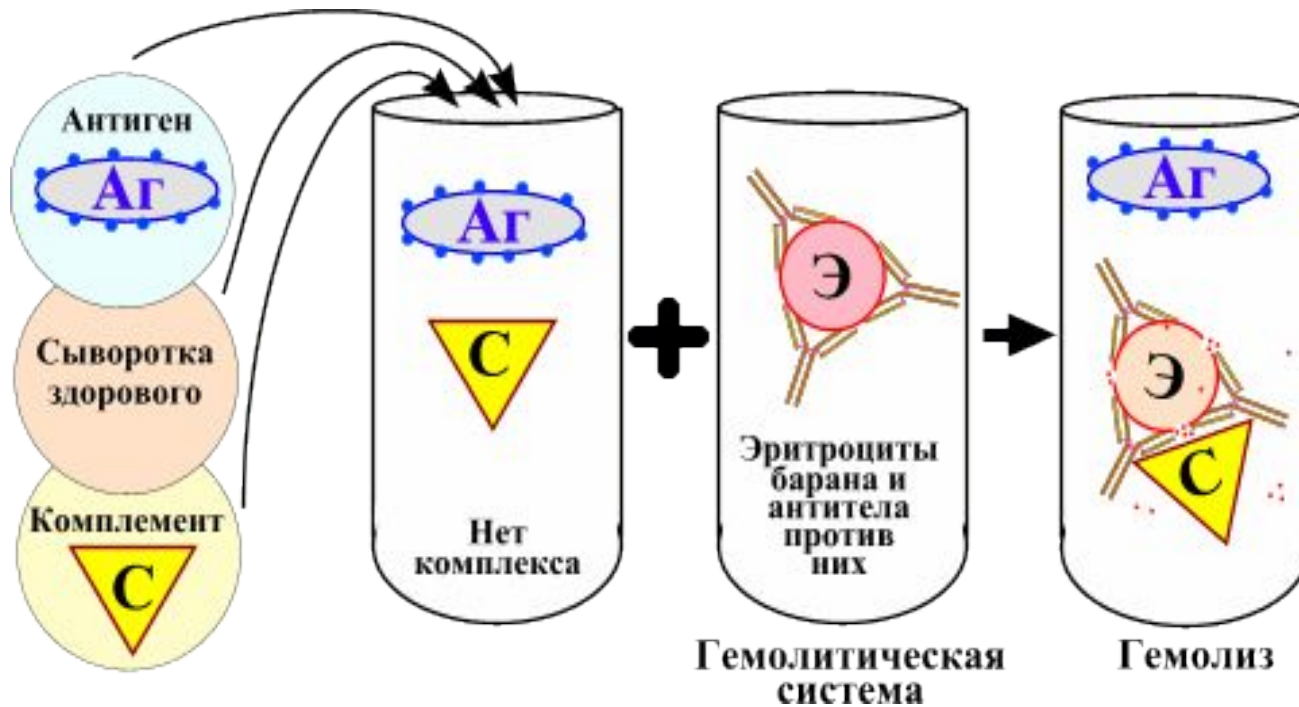


Схема РСК с сывороткой здорового



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

После соединения антигена с меченой 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.

ИФА

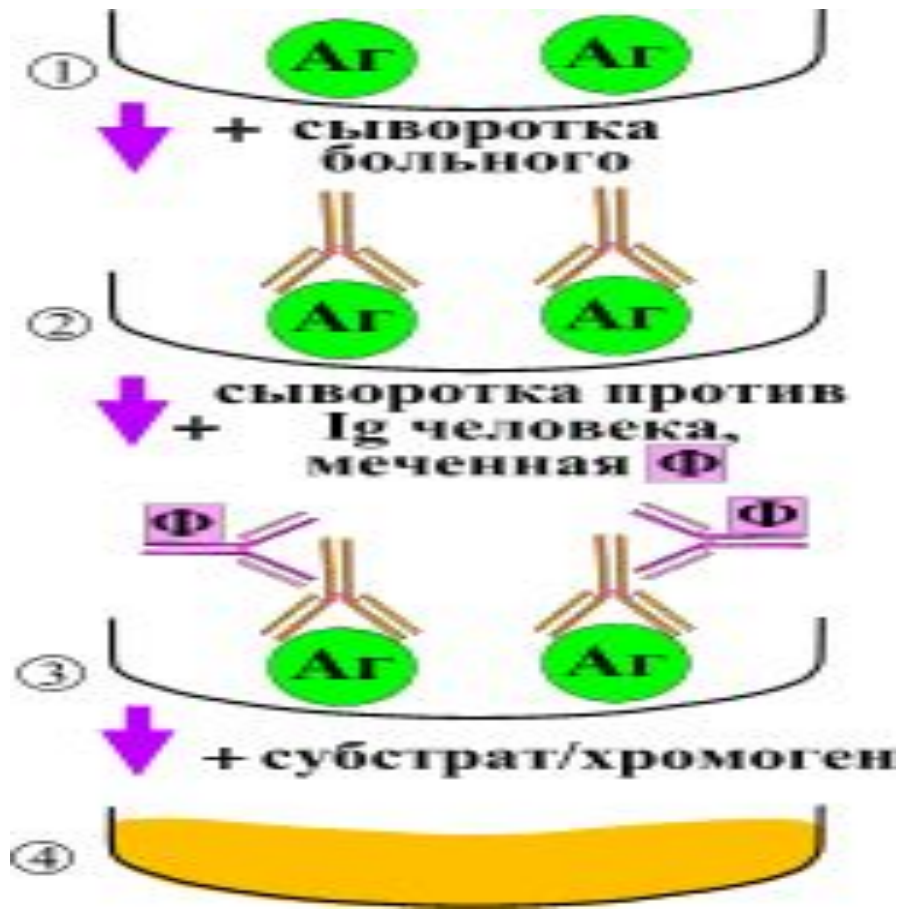
ИФА применяют для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней, в частности для диагностики ВИЧ-инфекций, гепатита В и др., а также определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях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

Твердофазный ИФА

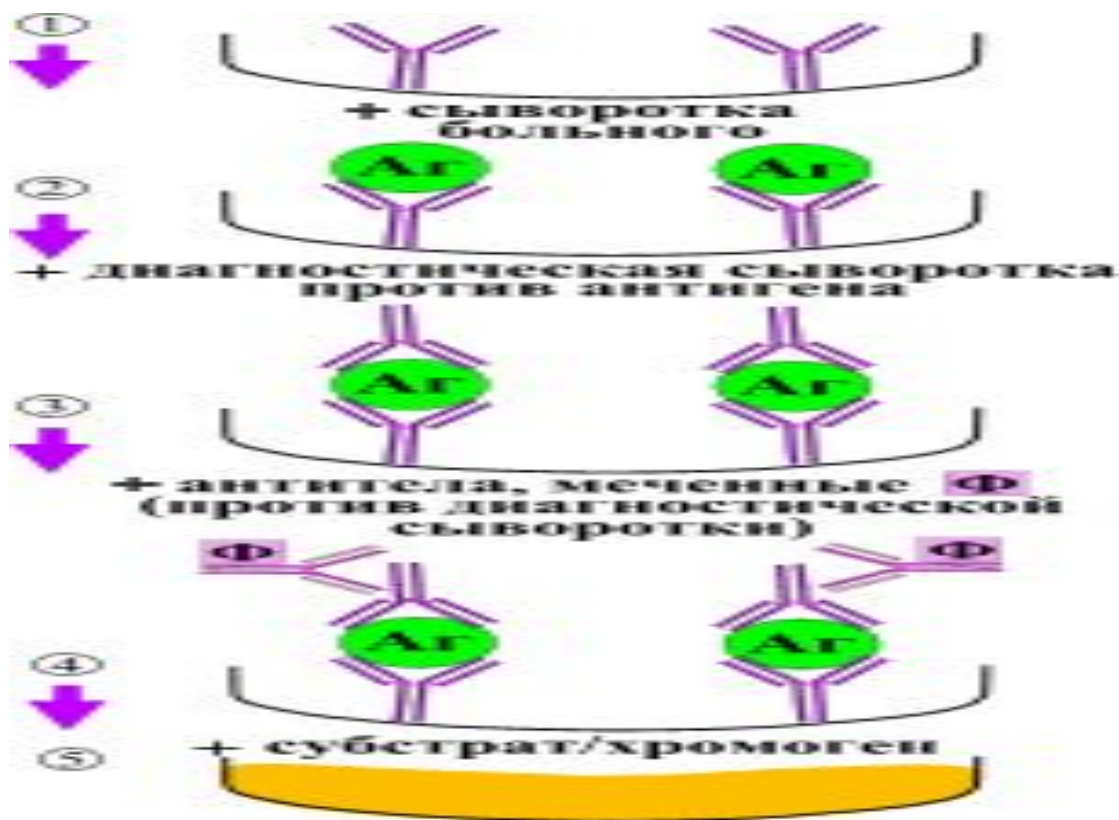
- - вариант теста, когда один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе, напр., в лунках планшеток из полистирола. Компоненты выявляют добавлением меченых антител или антигенов. При положительном результате изменяется цвет хромогена. Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют несвязавшиеся 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.



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

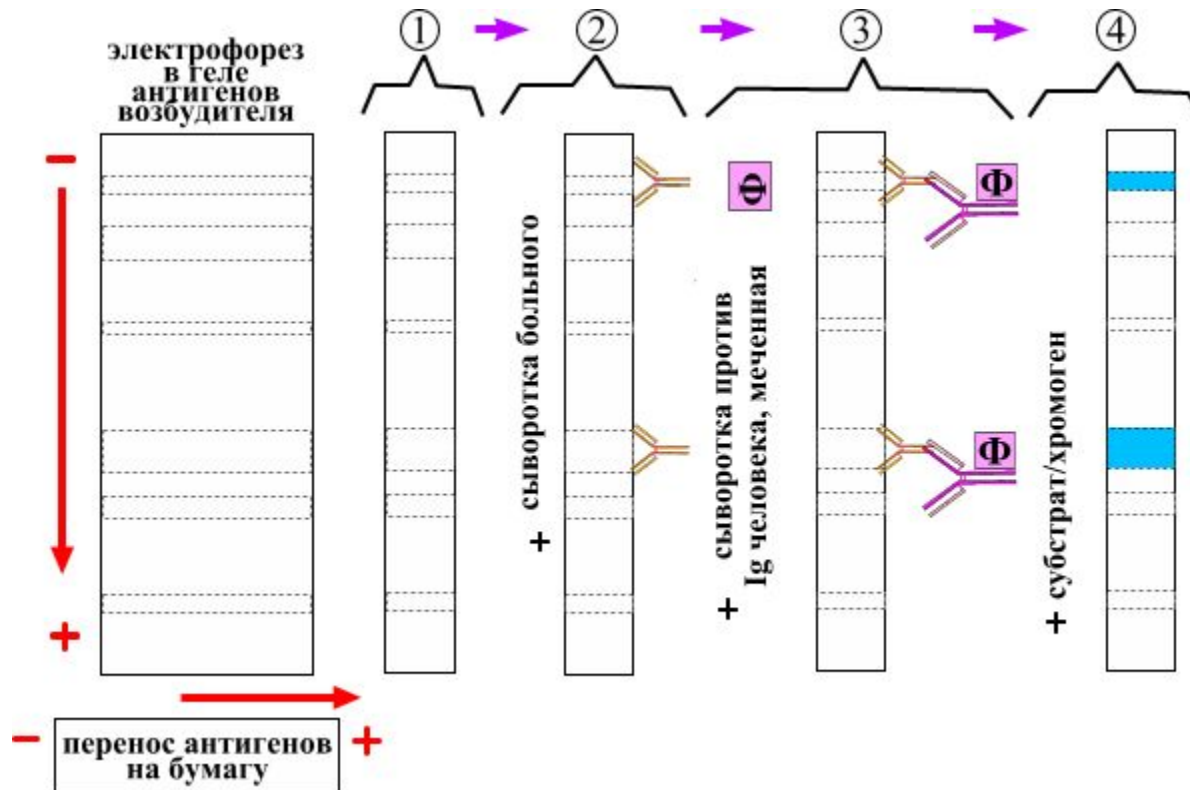


ИММУНОБЛОТ

- 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). Затем, после инкубации, отмывают от несвязавшихся 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.

Иммуноблоттинг (син. вестернблоттинг) — высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА.

Иммуноблоттинг используют как диагностический метод при ВИЧ-инфекции и др. ■



Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) основана на амплификации, т.е. увеличении количества копий специфического (маркерного) гена возбудителя. Для этого двунитевую ДНК, выделенную из исследуемого материала, денатурируют (“расплетают” при нагревании) и достраивают, при охлаждении, к расплетенным нитям ДНК новые комплементарные нити, в результате чего из одного гена образуются два. Этот процесс копирования генов многократно повторяется при заданных температурных режимах. Достраивание новых комплементарных нитей ДНК происходит при добавлении к искомым генам праймеров (затравки из коротких однонитевых ДНК, комплементарных 3'-концам ДНК искомого гена), ДНК-полимеразы и нуклеотидов.

ПЦР

