

**ГБОУ ВПО «ВЛАДИВОСТОКСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ МЗСР РФ»**

**Кафедра микробиологии и вирусологии**

# **Иммунологические методы диагностики инфекционных заболеваний**

**д.м.н., проф. Шаркова В.**

**А.**

# Реакции иммунитета – реакции между АГ и АТ или между АГ и сенсibiliзироваHHыми лимфоцитами

Происходят в живом организме и могут быть воспроизведены в лабораторных условиях

## Особенности:

- **Высокочувствительны** (улавливают АГ в больших количествах)
- **Строго специфичны** (позволяют отличить близкие по составу АГ)

Широко используются в решении теоретических и практических вопросов медицины, биологии: в иммунологии, микробиологии, биохимии, генетике, онкологии, др.

**Серологические** (гуморальные) реакции –  
р-ции АГ+АТ (АТ всегда находятся в жидкой среде, сыворотке)

Serum - сыворотка

Humor - жидкость

**Клеточные реакции** - р-ции АГ с  
сенсibilизированными лимфоцитами



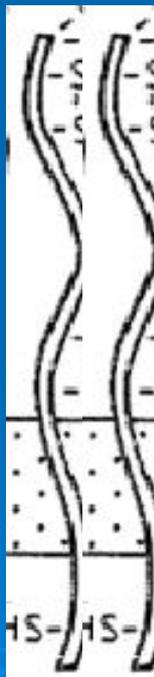
Взаимодействию АГ-АТ основано на принципе взаимного узнавания, обусловленного их **комплементарностью** (избирательной «прилипаемостью» молекул)



# Способы достижения комплементарности

- Соответствие поверхностей выступ-углубление

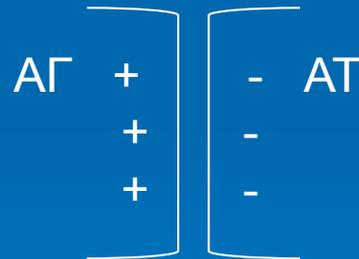
АГ



АТ

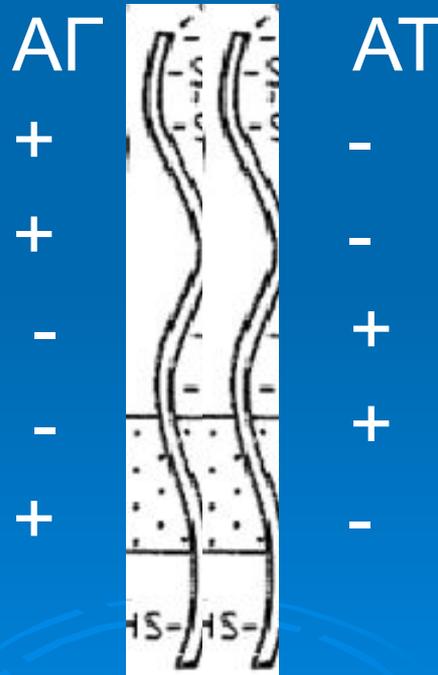
## Способы достижения комплементарности

- Противоположными электрическими зарядами: против «+» заряда располагается «-» в результате электростатических сил Кулона



# Способы достижения комплементарности

- Комбинаций электростатической и конформационной (пространственной) комплементарности и расположением друг против друга неполярных (гидрофобных) групп





## типы ИР

- Агглютинации
- Преципитации
- Лизиса
- Опсонизации
- Нейтрализации
- Связывания компонента

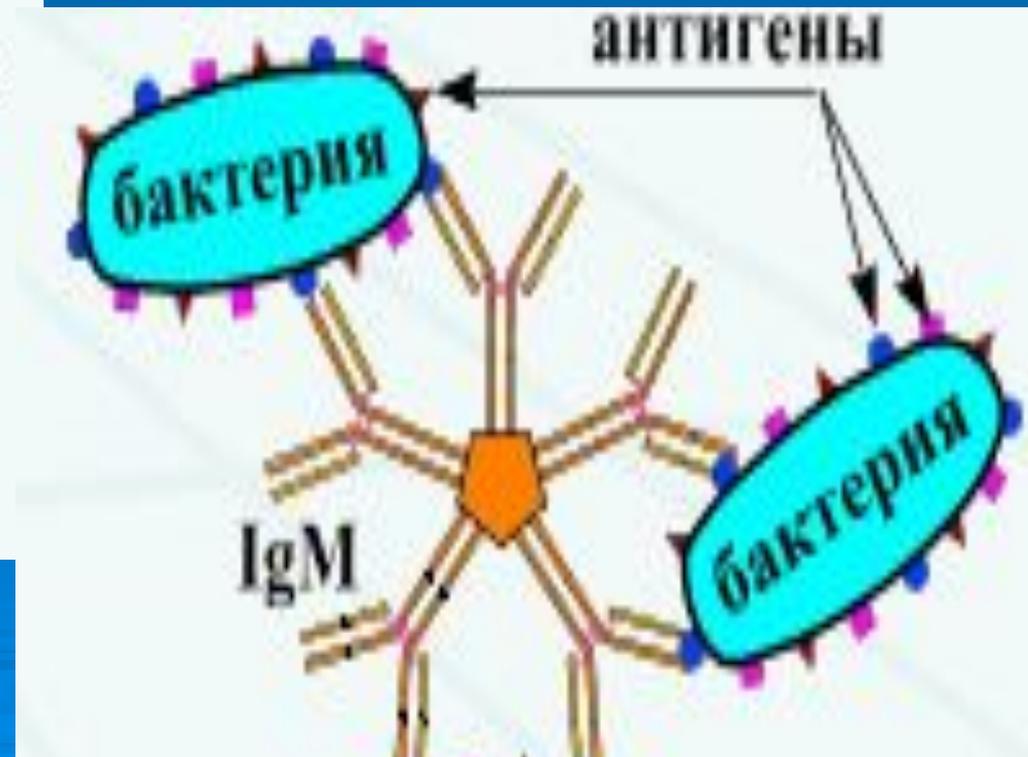
Соответственно каждому из феноменов *in vitro* АТ именуют: агглютинины, преципитины, лизины, опсоины, компонентсвязывающие (типы АТ одни и те же)

# Серологические реакции в зависимости от участвующих в них компонентов и условий среды

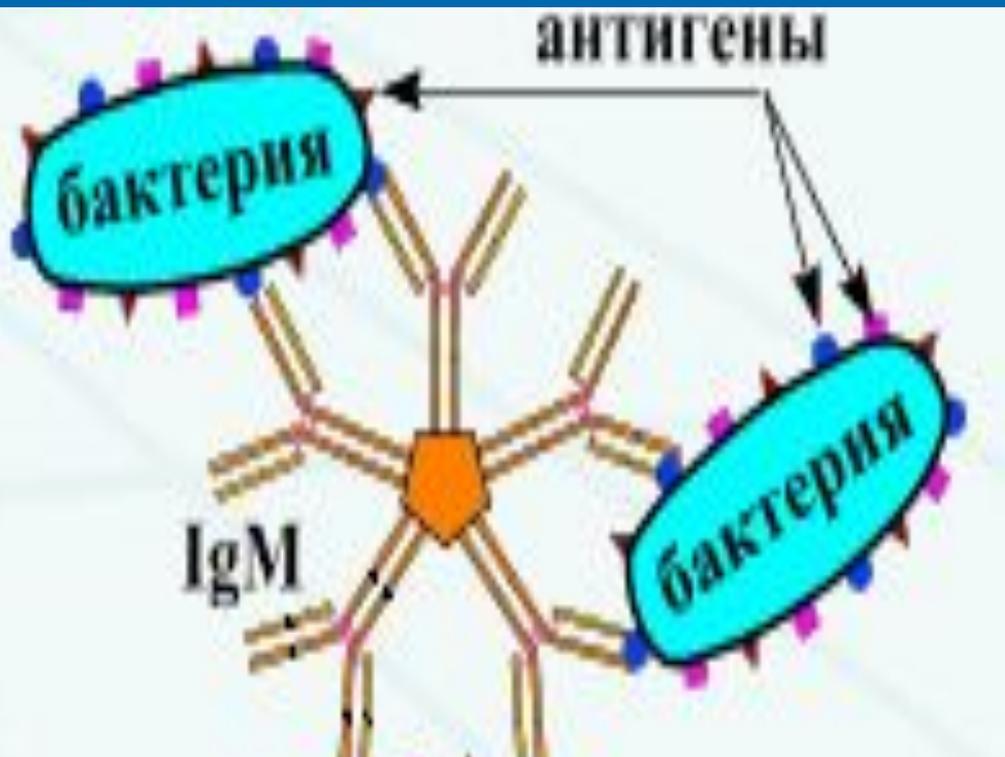
ИР	АГ	Неспецифич. компонент
РА РГА	Бактерии Эритроциты	Электролиты (изотонический р-р)
РП	Белки, экстракты органов и тканей, лизаты (продукты лизиса клеток), гаптены	То же
Иммунный лизис -бактериолизис -гемолиз -цитоллиз	Бактерии Эритроциты др. кл-ки	комплемент
РСК	Гаптены, экстракты, лизаты, полные АГ, кл-ки	С'
РН	Токсины, вирусы	электролиты

# Феномен взаимодействия:

- Молекулы АГ, участвующих в РА и РП – поливалентны
- АТ – двухвалентны или пятивалентны



Возникновение в серологических р-ях крупных агрегатов, видимых невооруженным глазом, объясняется т. сети (т. образования сетевых структур)



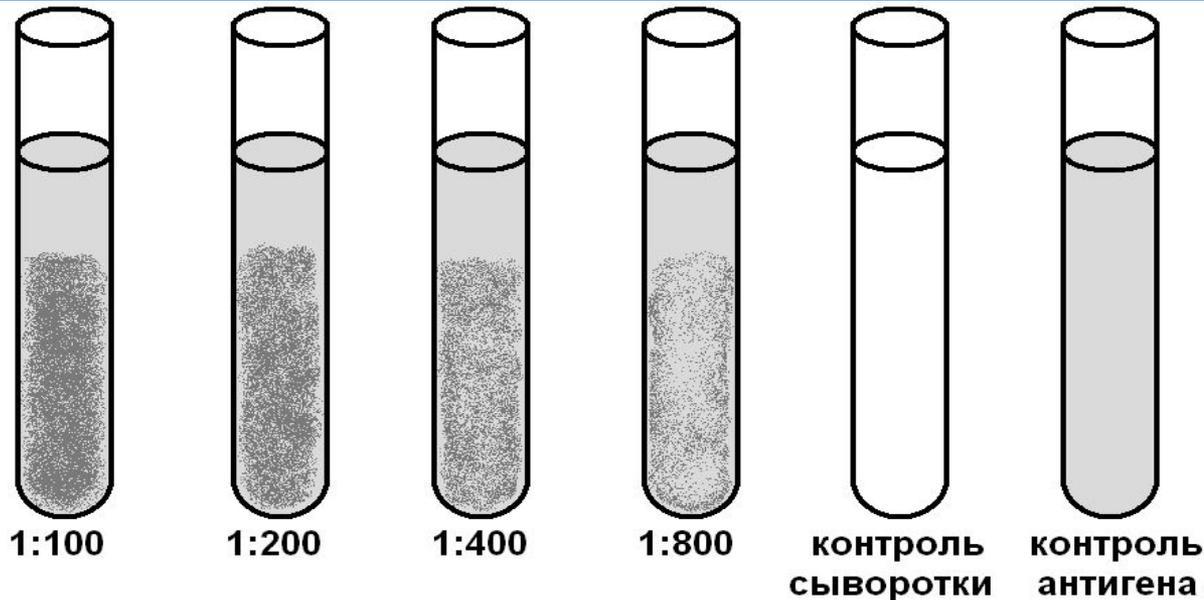
Последующие присоединения ведут к образованию сетей из АГ и АТ, превращающихся в крупные агрегаты, выпадающие в осадок

Серологические р-ции – р-ции  
взаимодействия м/у АГ и АТ:

**1-я фаза – специфическая – адсорбция АТ  
на частицах АГ**

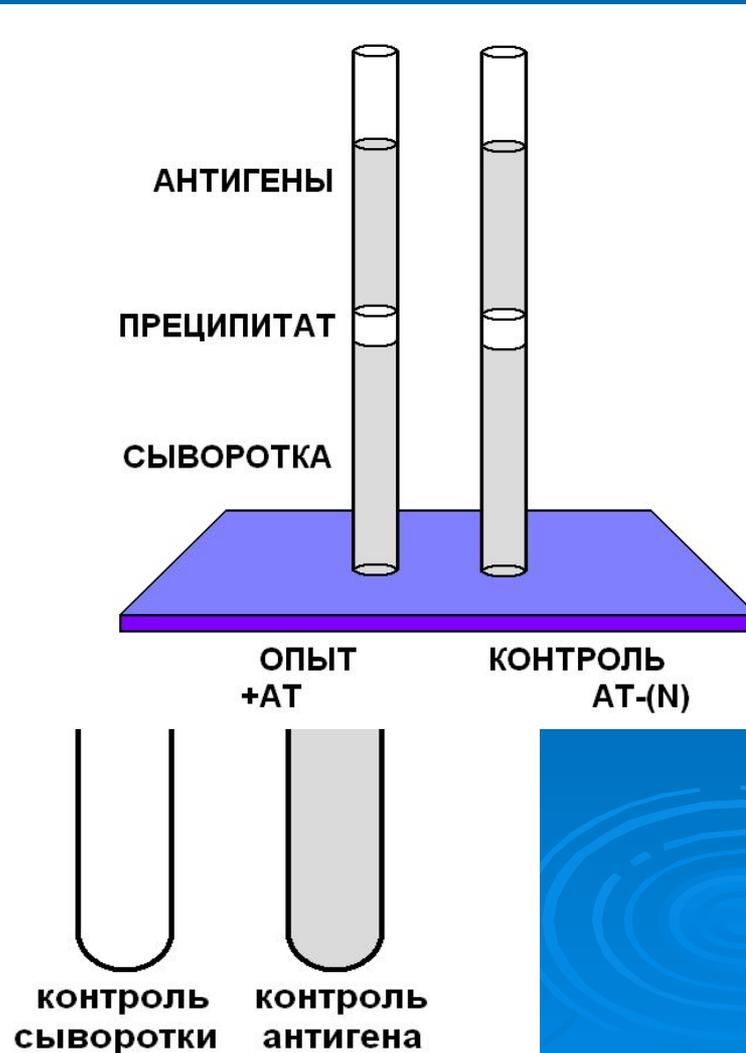
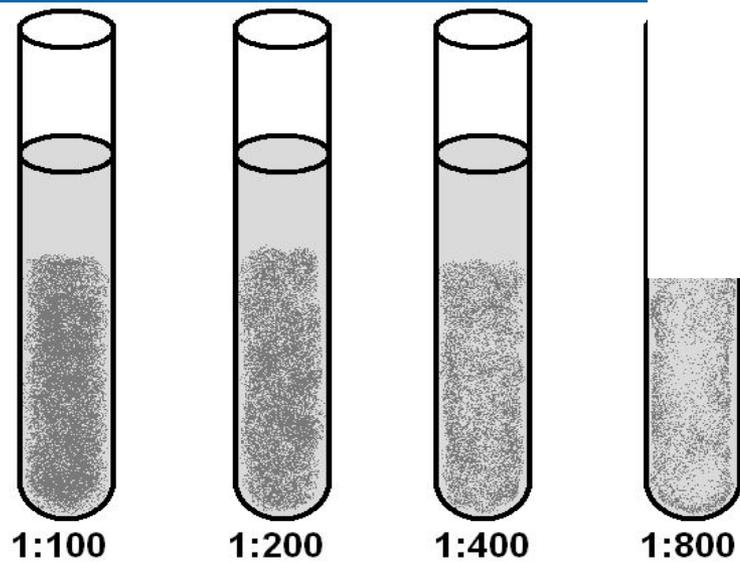


**2-я фаза – неспецифическая** — комплекс АГ+АТ взаимодействует с неспецифическими факторами среды, в которой идет р-ция, и, в следствии снижения электрических зарядов, изменения физико-химических свойств АГ – результат взаимодействия виден невооруженным взглядом (склеивание, растворение...)



Х-р видимой фазы зависит от состояния АГ и условий среды, в которой происходит его взаимодей-е с АТ

Х-р видимой фазы  
зависит от состояния  
АГ и условий среды, в  
которой происходит его  
взаимод-е с АТ

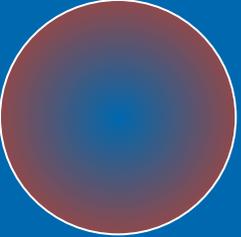


# Применение серологических р-ий

- Для **серодиагностики** (выявление АТ в сыворотке б-ого)
- Для **серотипирования** (идентификации) – определение вида или типа АГ, выделенного из патогенного материала МКО
- Для определения активности (титра) сыв-ки
- В научных исследованиях

# Применение серологических реакций

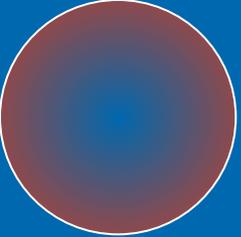
Цель исследования	АГ	АТ	Положительный результат р-ции
Серодиагностика (определение АТ)	Известный (диагностикум)	Сыворотка б-го	В сыворотке б-го есть АТ к известному АГ
Серотипирование (опред. АГ)	неизвестный	Иммунная (диагностическая) сыв-ка	Исследуемый АГ идентичен тому, которым иммунизировали животное



## Приготовление иммунной (диагностической) сыворотки:

- Получают из крови людей или животных, иммунизированных по схеме соответствующим АГ (вакциной)
- Определяют титр (наибольшее разведение с-ки, в котором она реагирует с соответствующим АГ в определенных условиях опыта)

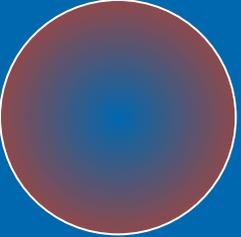




## ИММУННЫЕ СЫВ-КИ

- Нативные (неадсорбированные)
- адсорбированные



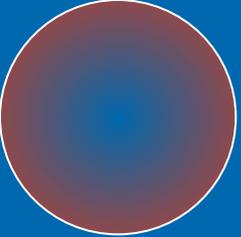


## Недостаток нативных сыв-к:

- Наличие в них групповых АТ (АТ к МКО, имеющим общие АГ)

такие АГ есть у МКО, принадлежащих к одной группе, роду, семейству





Адсорбированные сыв-ки – строго специфичны  
(реагируют только с гомологичным АГ)

АТ к другим (гетерогенным) АГ удалены адсорбцией

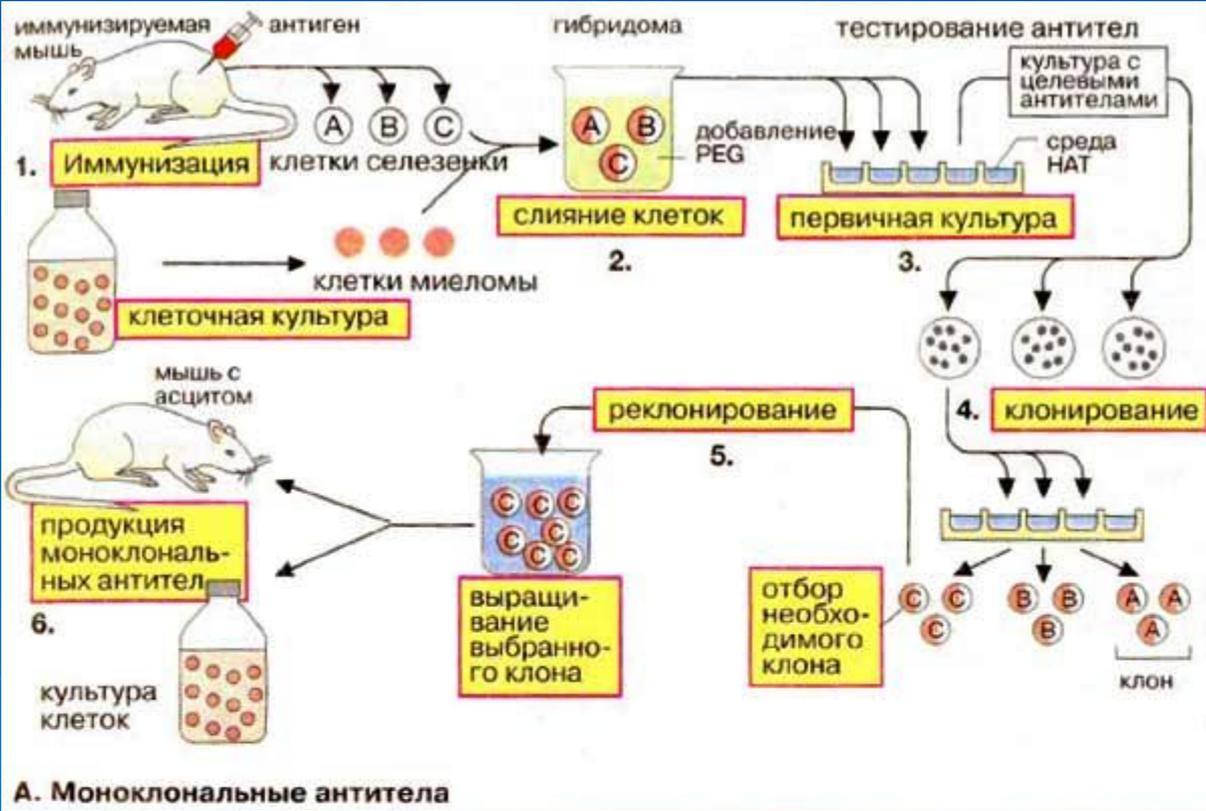
Однако, даже максимально очищенные, они содержат АТ к различным антигенным детерминантам комплексного антигена, т.е. гетерогенны

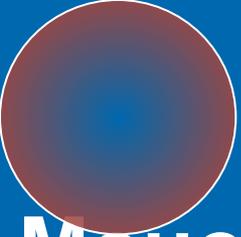
Гетерогенность антител снижает чувствительность методов индикации антигенов и биологический эффект иммунных сывороток



**Гибридомы** – клетки, вырабатывающие in vitro моноклональные АТ (каждая популяция АТ синтезируется одним клоном, т.е. отдельной линией клеток)

Гибридомы получены путем гибридизации нормальных лимфоцитов иммунизированных мышей с миеломными клетками мышей





**Моноклональные АТ** синтезированы к одному классу, подклассу, аллотипу, имеют один вид легких цепей, однозначную аффинность (можно получить АТ к определенному участку молекулы)

- Применяют для определения в сыворотке крови антигенов опухолей, микробных вирусных антигенов, для определения гормонов, медиаторов



# Реакция агглютинации (РА) – склеивание и выпадение в осадок микробов или других клеток под действием АТ в присутствии электролита (изотонического р-ра NaCl)

Для р-ции необходимы:

- АТ (агглютинины) – в сыв-ке б-ого или в иммунной сыв-ке
- АГ (агглютиноген)– взвесь живых или убитых МКО, Ег, др. к.
- Изотонический р-р

РА применяется

- **для серодиагностики** ( при брюшном тифе, паратифах - р-я Видаля, бруцеллезе – р. Райта и др.)

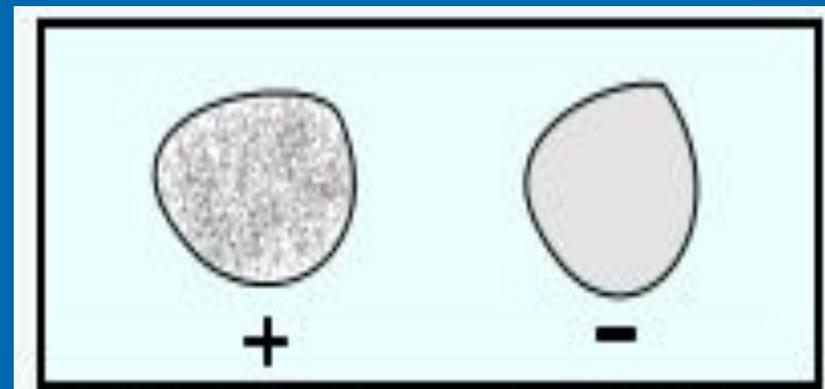
АТ при этом определяются в сыворотке б-го, АГ является взвесь известного убитого микроба – диагностикум

- **идентификации микробов** – АГ служит их взвесь, а антителом – известная иммунная сыворотка (диагностическая)



# Постановка реакции:

- РА на стекле (ориентировочная)
- РА развернутая (в пробирках)

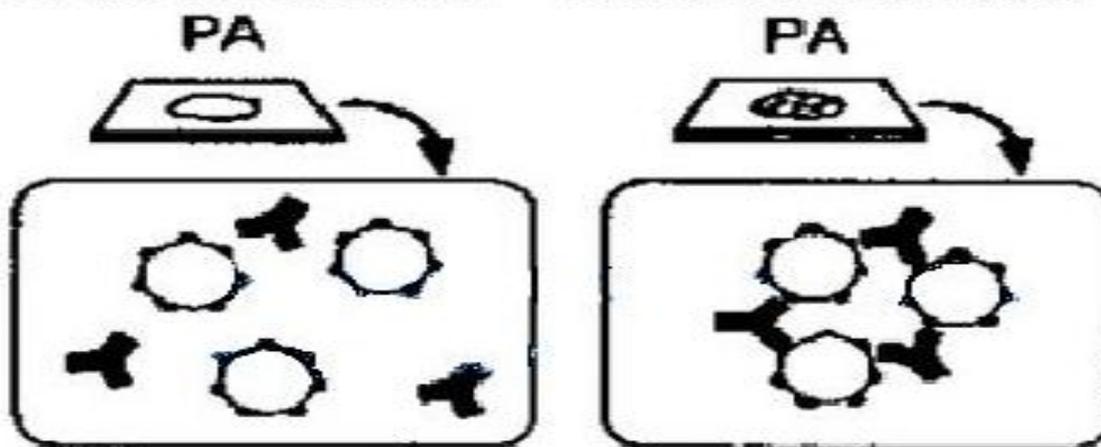


Агглютинация  
положительная

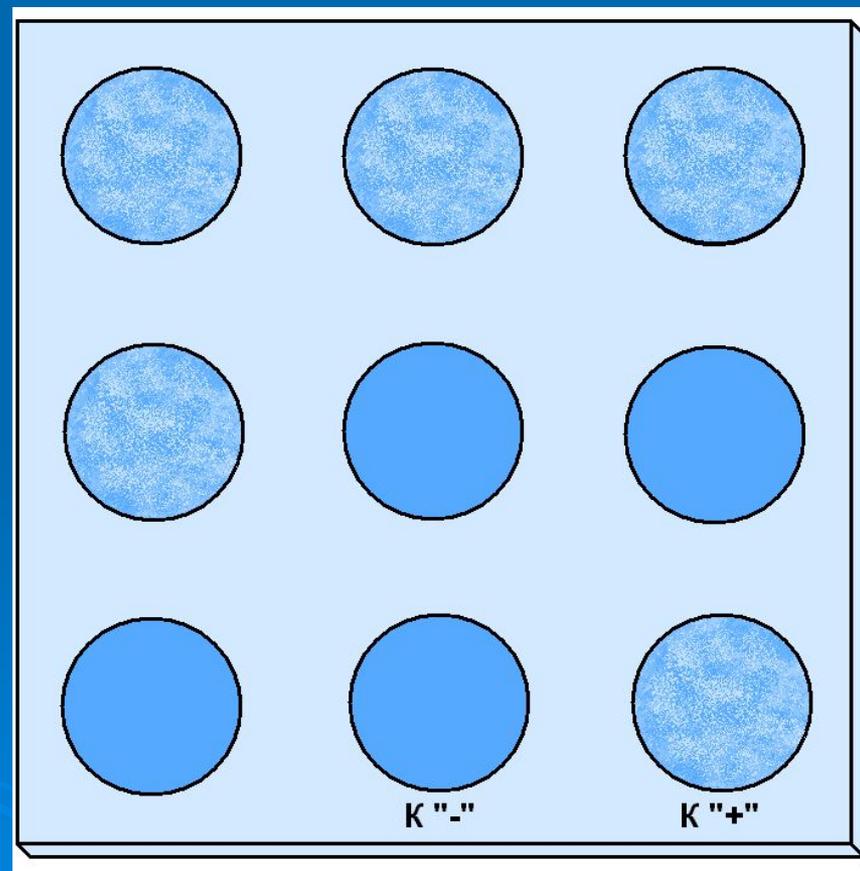
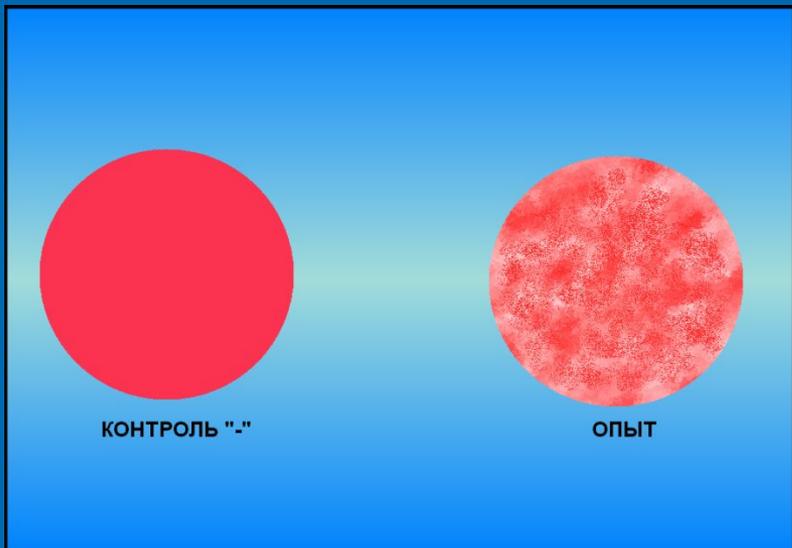
Контроль  
(нет агглютинации)

Отрицательная

Положительная



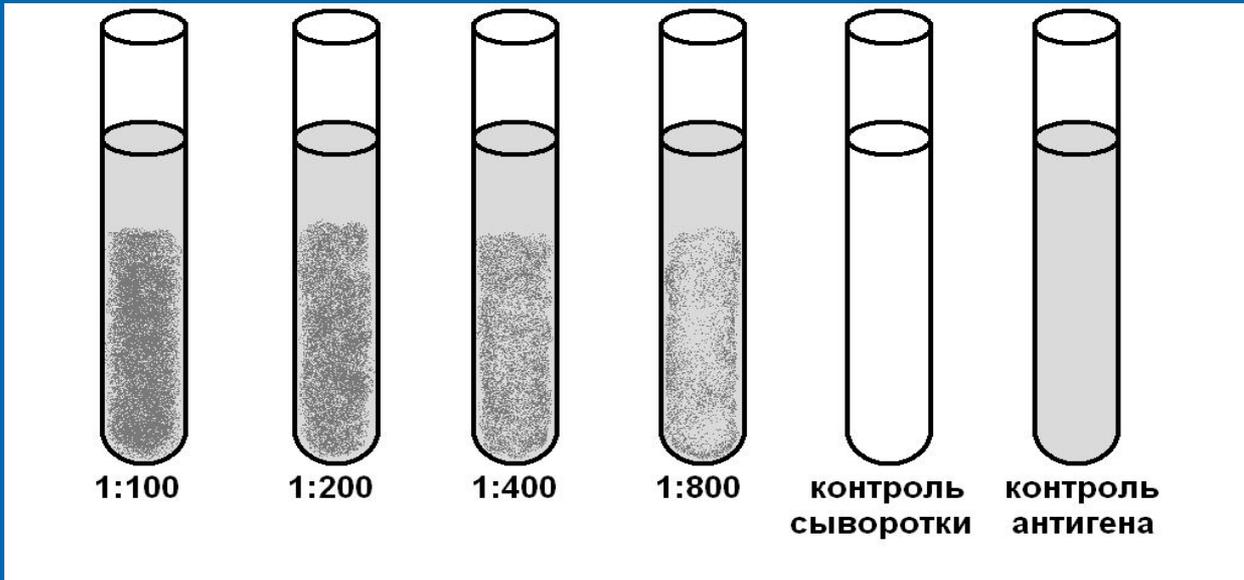
# □ РА на стекле



# РА развернутая

Ингредиенты	Содержимое пробирок				Контроль	
	1	2	3	4	Сыв-ки	АГ
Физ. р-р 0,85 % NaCl, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Сыв.в разв. 1:50 мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5 (1: 50)	-
Развед	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	-	-
Диагности кум, 1-2 млрд. микробны х тел в 1 мл	2к	2к	2к	2к	-	2к
	В термостат при +37С° на 2 часа, затем на 18-20 часов при комнатной температуре. Учёт результатов РА по интенсивности образования агглютината (обозначается крестами)					

# РА развернутая



Титр агглютинирующей сыв-ки – ее максимальное разведение, в котором она агглютинирует гомологичные клетки

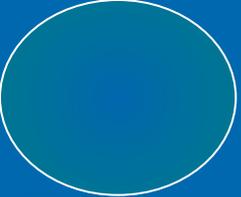
Агглютиноскоп – прибор для изучения характера и величины агглютината

## Агглютинация:

- **Мелкозернистая** (О-агглютинация – при работе с АТ к О-соматическому АГ)
- **Хлопьевидная** (Н-агглютинация)

наступает быстрее, образующийся при этом осадок очень рыхлый, легко разбивается





Титр сыворотки б-го сравнивают с диагностическим («законодательным») титром

Если равен или выше – заболевание,  
ниже – начало заболевания, реконвалесценция или  
дальнейшая интерпретация результатов

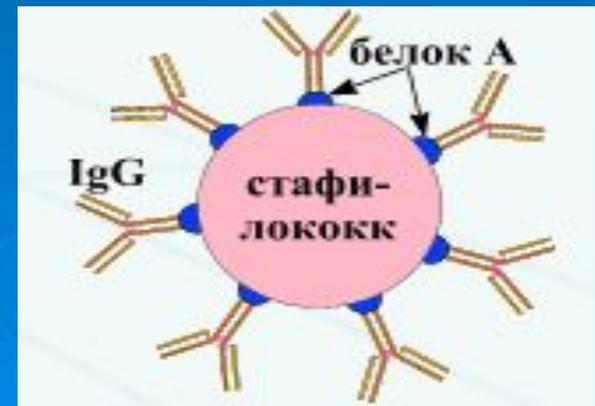
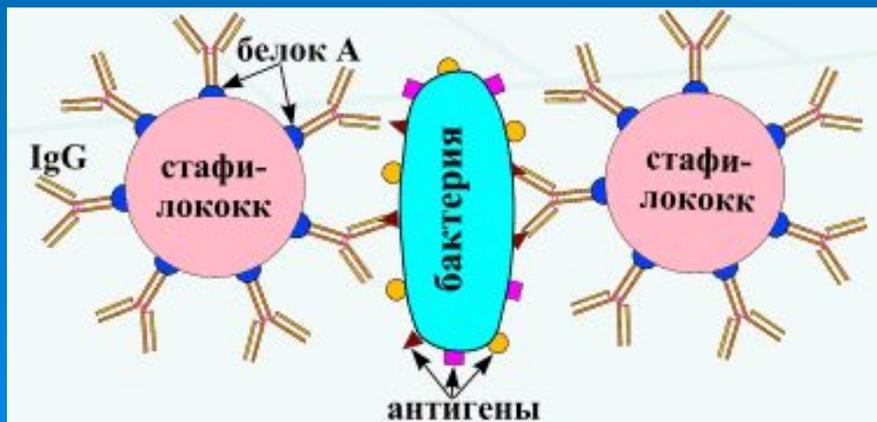
При серотипировании титр должен быть не менее половины  
титра диагностической сыворотки



# Реакция коаггутинации - для определения антигенов с помощью антител, адсорбированных на белке А клеток стафилококка (антительный диагностикум)

## 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 гемагглютинации (по механизму действия):

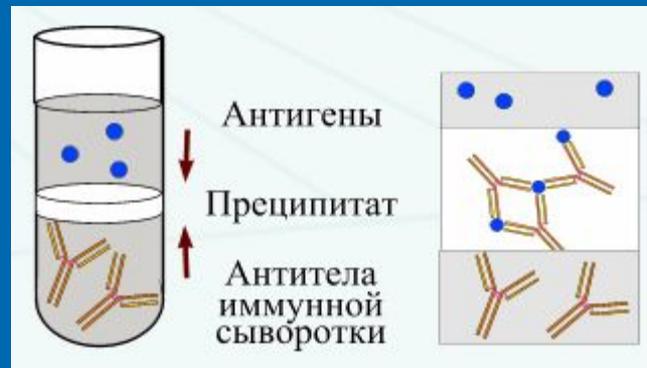
- РГА – серологическая (Er агглютинируются с АТ (гемагглютинаинами))
- РГА – несерологическая, в основе – биологический механизм (наличие на Er некоторых видов рецепторов к вирусным частицам)

Позволяет судить о наличии вируса в материале





Реакция преципитации (РП) – выпадение в осадок специфического иммунного комплекса, состоящего из растворимого АГ (лизат, экстракт, гаптен) и специфического АТ в присутствии электролитов

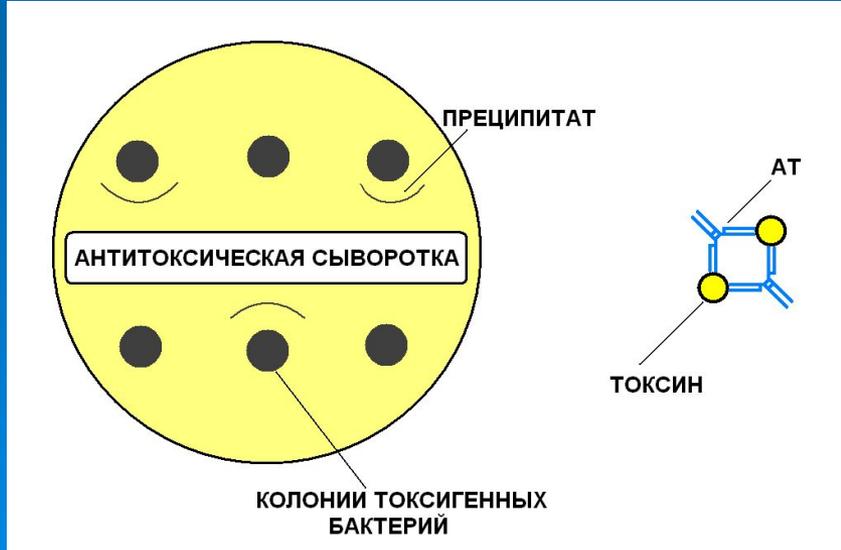
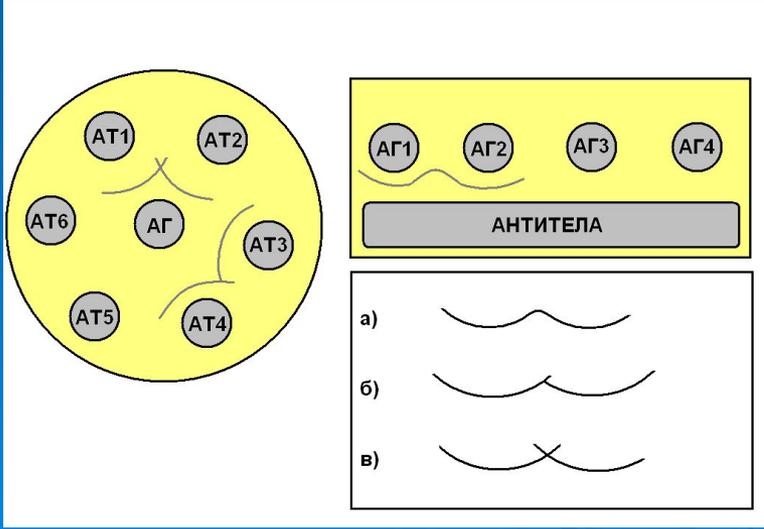


РП обычно применяют для определения АГ:

- при диагностике сибирской язвы (р. Асколи), менингита, др.
- для определения видовой принадлежности крови, спермы
- при установлении фальсификации продуктов
- определяют филогенетическое родство животных и растений

# Основные методы постановки РП:

- Р. кольцепреципитации
- РП в агаре (геле):
  - радиальная иммунодиффузия (по Манчини)
  - двойная (встречная) радиальная иммунодиффузия (по Оухтерлони): у многокомпонентных систем между лунками с антигенами и антителами появляется несколько линий преципитата; у идентичных АГ линии преципитата сливаются; у неидентичных АГ - пересекаются

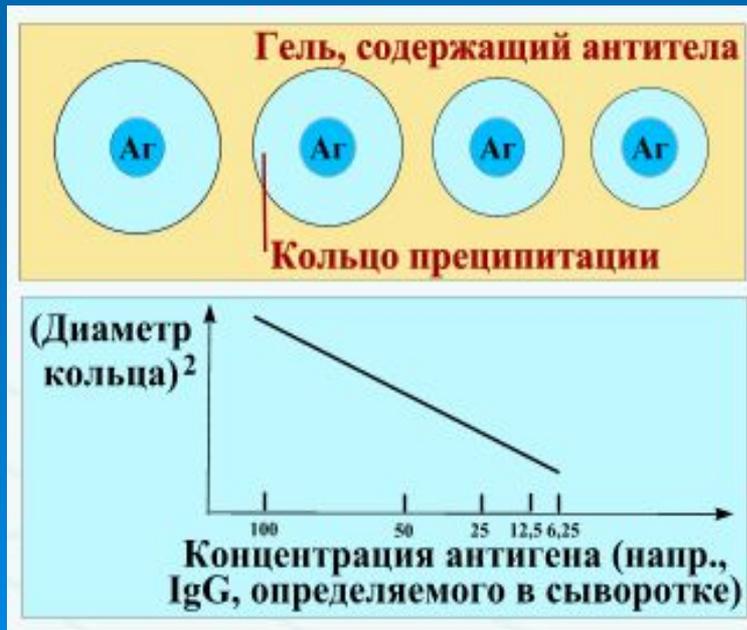


# радиальная иммунодиффузия (по Манчини) :

АГ, 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.

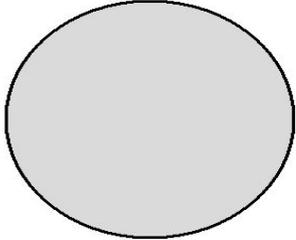
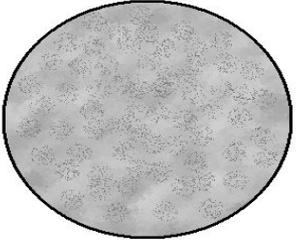
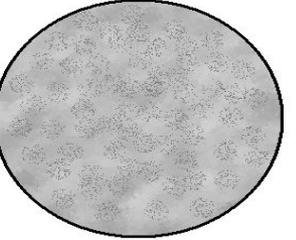


## Реакция микропреципитации на примере экспресс-диагностики сифилиса (ЭДС)

реакция выполняется для скрининга сывороток при массовых обследованиях на сифилис в лунках иммунологического планшета

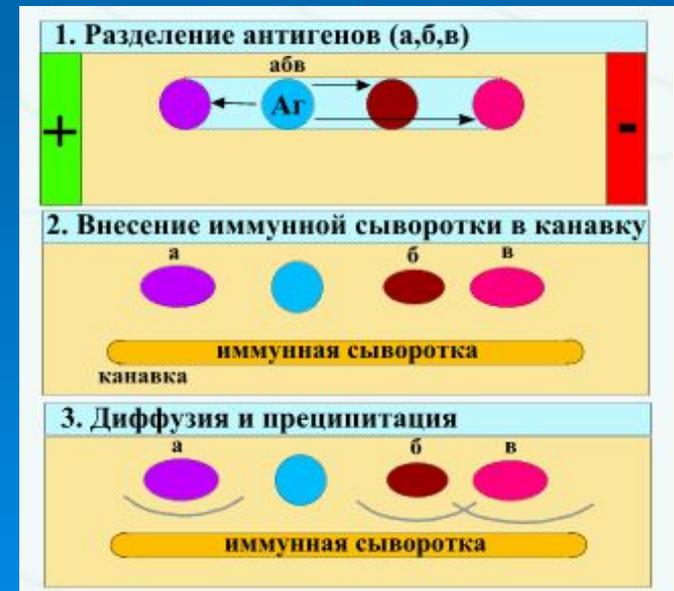
- сыворотки крови пациентов
  - кардиолипиновый антиген (неспецифический)
- два контроля:
- физиологический раствор и кардиолипиновый антиген (контроль мутности)
  - заведомо положительная сыворотка и кардиолипиновый антиген (контроль преципитата)

В опытной лунке – изучаемая сыворотка больного, взятая в разведении 1:10 и кардиолипиновый антиген (2-5 минут осторожно покачиваем планшет, в течение этого времени формируется преципитат, жидкость в лунке становится прозрачной. Учет реакции ведется по четырехплюсовой системе. Результат, оцениваемый как один и два плюса считается сомнительным, на 3 и +++++ - положительным

		
КОНТРОЛЬ "-"	КОНТРОЛЬ "+"	ОПЫТ
физ. раствор	"+" сыворотка	исследуемая сыворотка
КАРДИОЛИПИНОВЫЙ АНТИГЕН		

# Иммуноэлектрофорез - сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации:

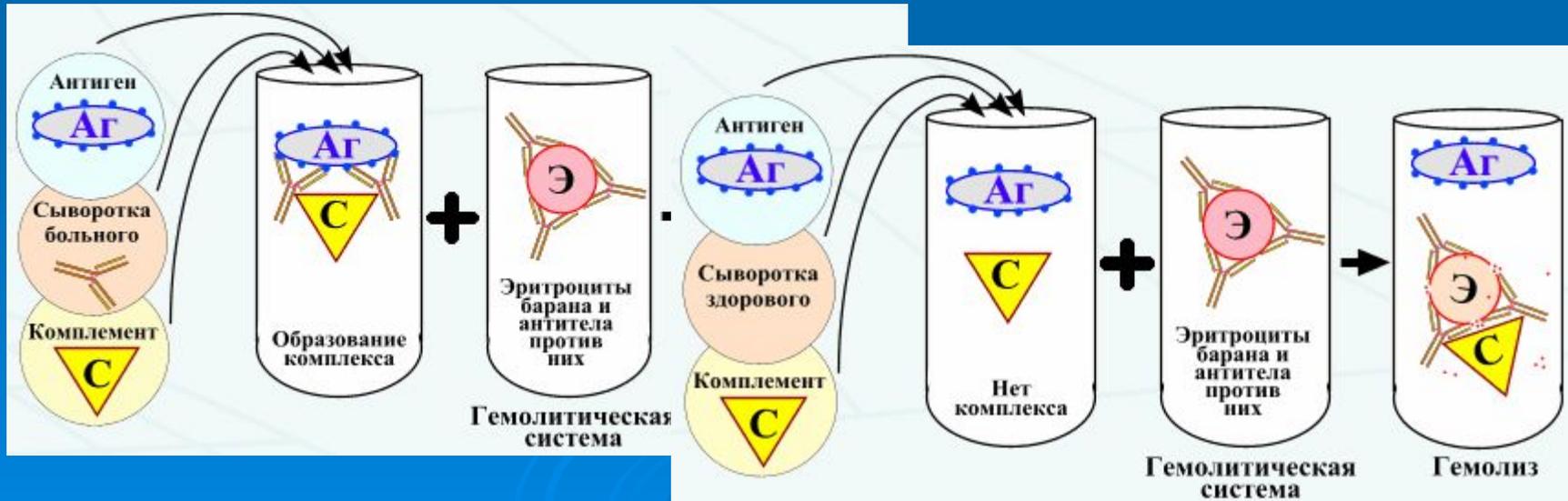
смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза (в течение 1-2 часов. Различные антигены с разной скоростью перемещаются между катодом и анодом), затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой диффундируют в гель и образуют в месте "встречи" с антигеном линии преципитации



# Реакции лизиса (иммунный цитолиз) –

растворение клеток под воздействием АТ при участии комплемента. Для реакции необходимы МО, лизины (АТ), Ег или др. клетки и С'

- Р.бактериолиза (С' лизирует бактерии в присутствии гомологичной сыворотки)
- РСК – р. связывания комплемента (комплекс АГ+АТ всегда адсорбирует на себе С')

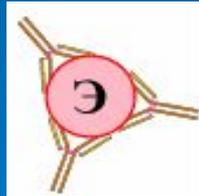
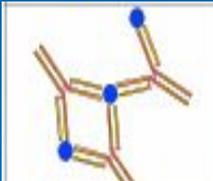


# РСК применяют

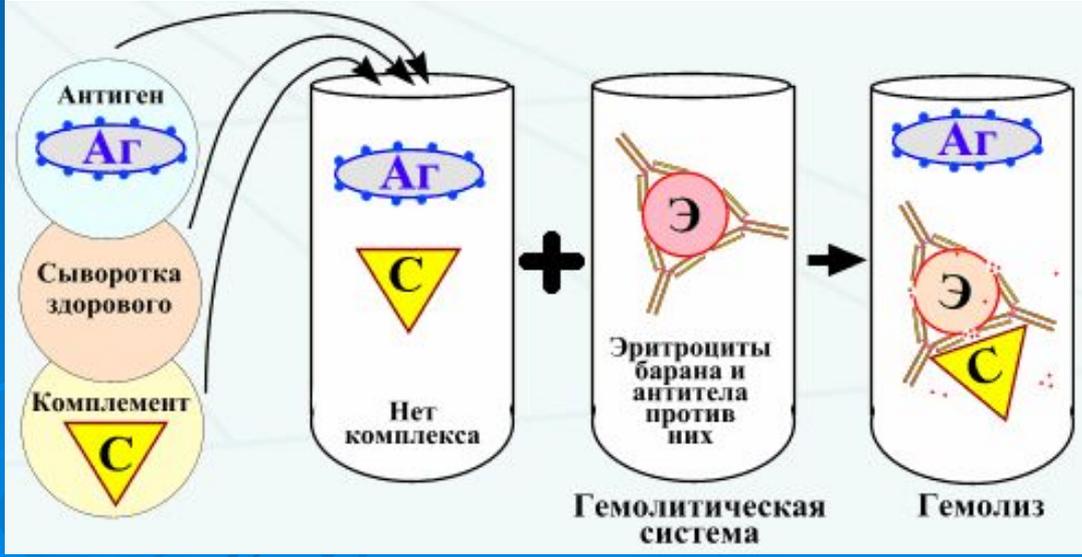
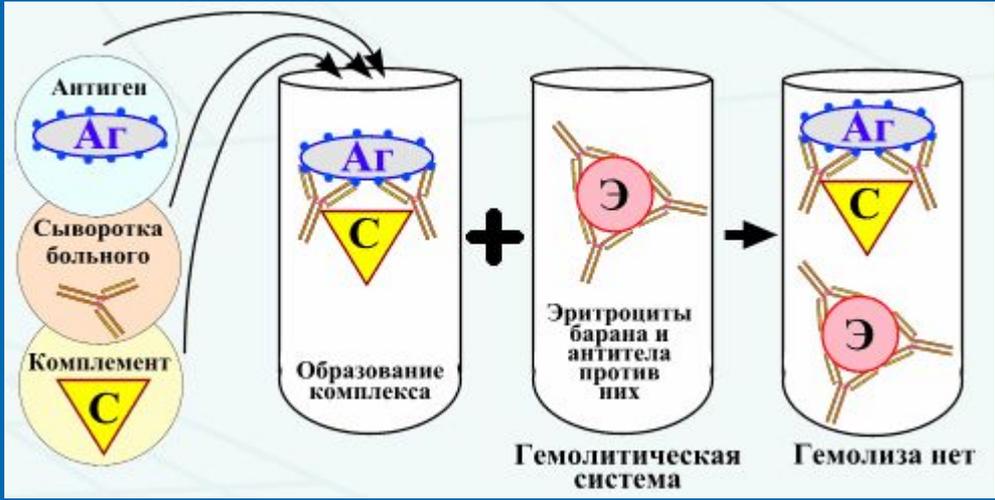
- для идентификации АГ
- в серодиагностике (напр. р. Вассермана)

участвуют:

- С'
- две системы АГ+АТ: основная и гемолитическая или индикаторная



# Отсутствие гемолиза регистрируют как «+» результат РСК



- Реакция иммунофлюоресценции - РИФ (метод Кунса) - метод 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

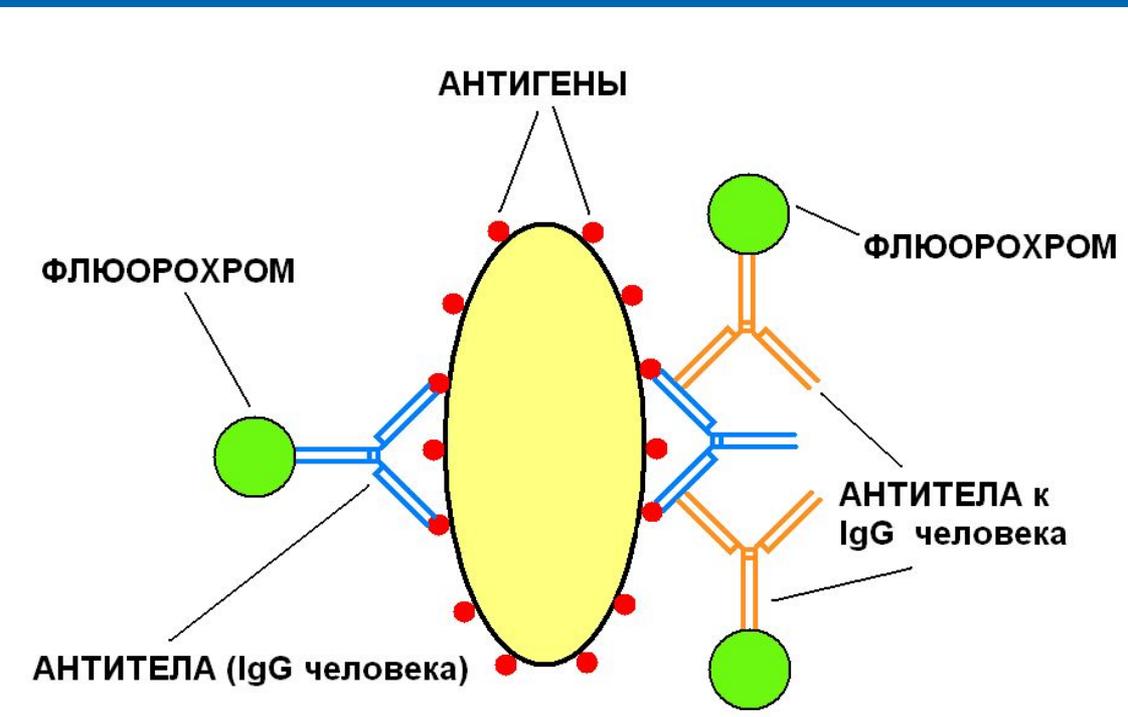


- **Непрямой метод РИФ** - выявление комплекса антиген - антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом:
- мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, 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. Комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе

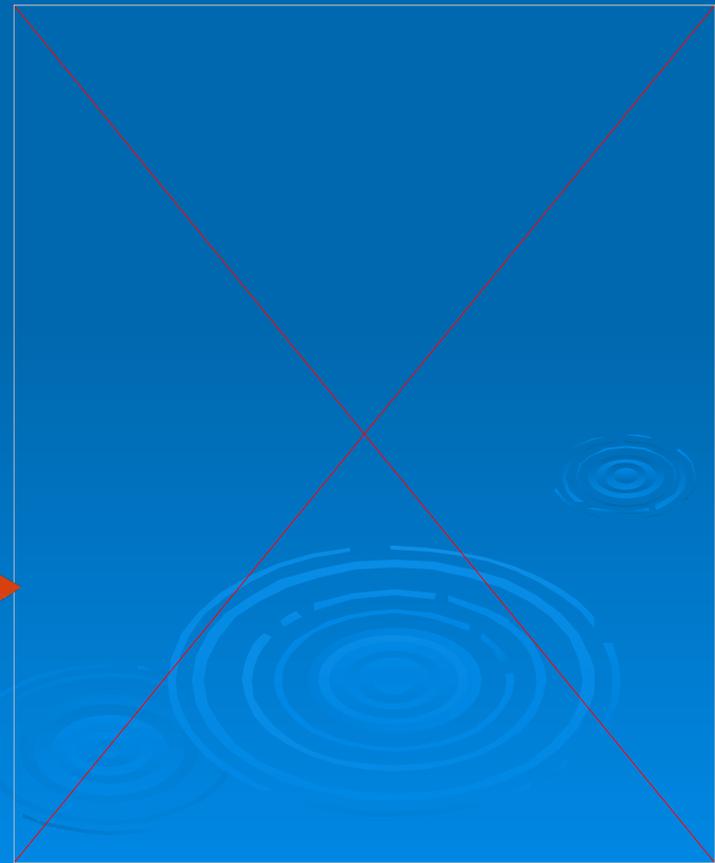
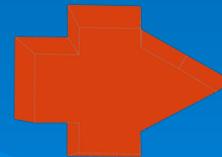


РИФ (ПИФ)

РНИФ (НИФ)



высокая специфичность, чувствительность,  
положительна на 3—4-й неделе после  
заражения сифилисом



Радиоиммунный метод (РИА) - основан на реакции антиген - антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом ( $^{123}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  и др.)

применяют для  
выявления:

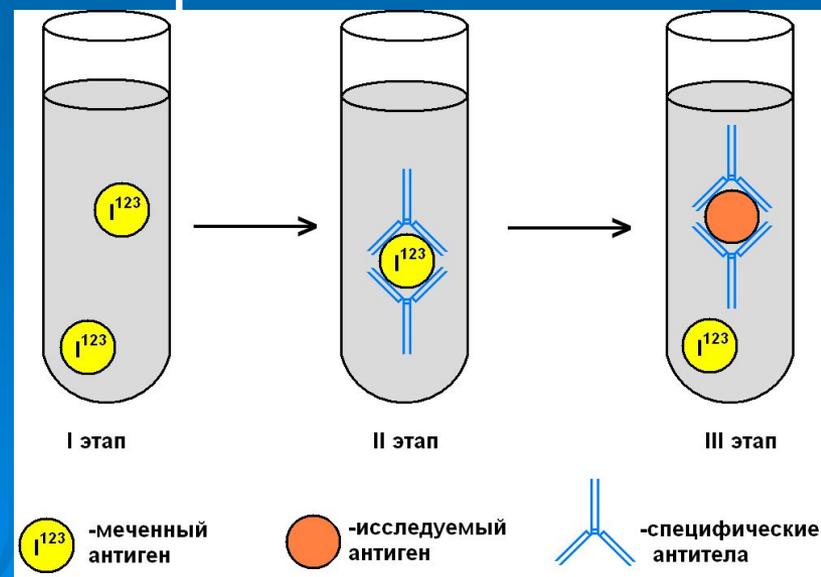


микробных антигенов  
гормонов  
ферментов и т.д.

После взаимодействия АГ с АТ отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (бета- или гамма-излучение)

Интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул АГ и АТ

**твердофазный РИА** – меченные АГ или АТ, сорбированные в лунках полистироловых панелей



# Иммуноферментный анализ (ИФА) - выявление АГ с помощью соответствующего АТ, конъюгированного с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой и или щелочной фосфатазой)

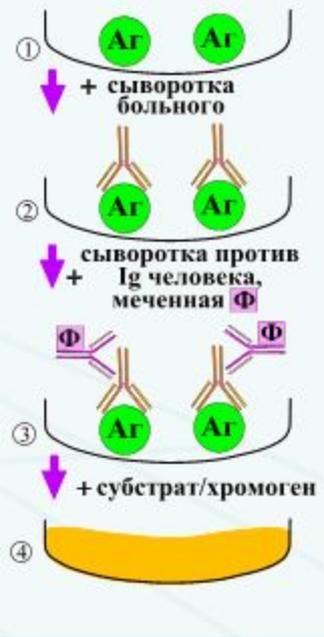
применяют для :



- диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней
- определения гормонов, ферментов
- лекарственных препаратов,
- др. БАВ, содержащихся в минорных концентрациях -  $10^{10}$  -  $10^{12}$

# ИФА

- 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 а

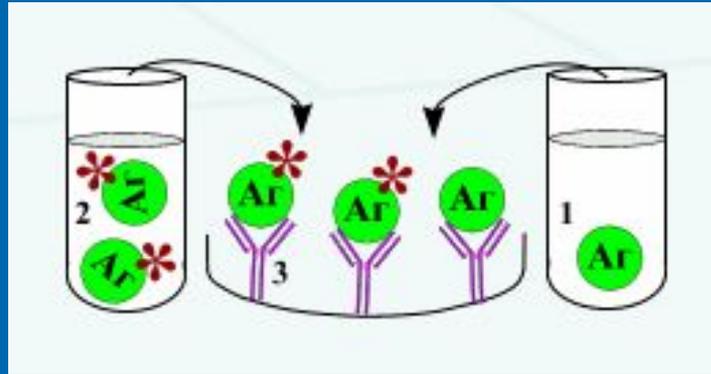




Твердофазный ИФА - вариант теста, когда один из компонентов иммунной - реакции (антиген или антитело ) сорбирован на твердом носителе, напр., в лунках планшеток из полистирола. Компоненты выявляют добавлением меченых антител или антигенов. При положительном результате изменяется цвет хромогена



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

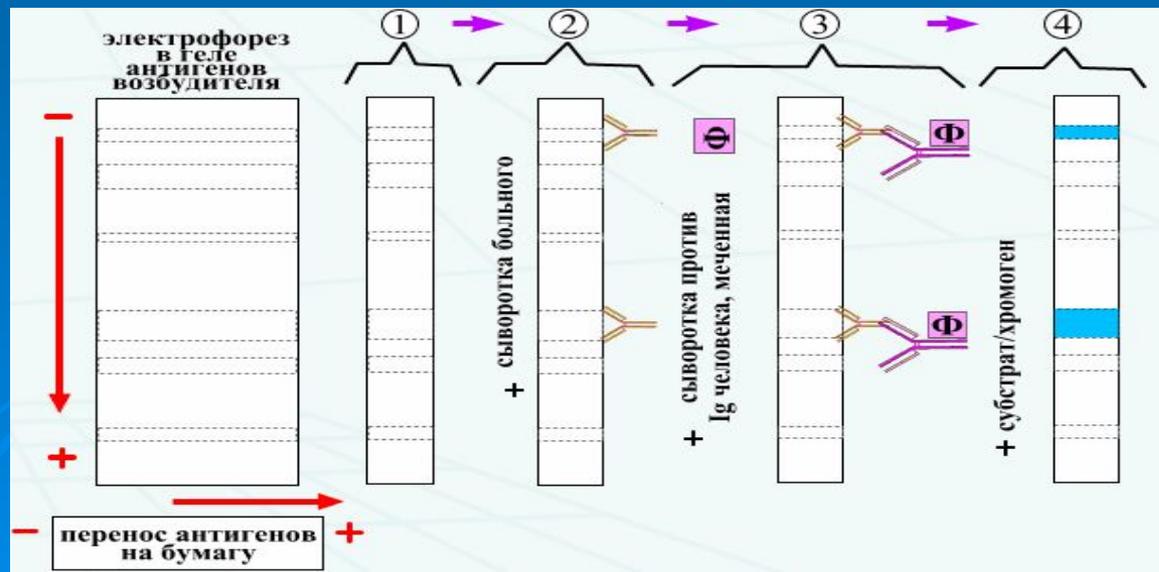


- Конкурентный ИФА для определения антител: искомые антитела и меченые ферментом антитела конкурируют друг с другом за антигены, сорбированные на твердой фазе.

# Иммуноблоттинг (син. вестернблоттинг) -

высококчувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА

- Антигены возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле
- 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)
- после инкубации, отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом (3)
- 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 Сажен (Southern) - фамилия означает ЮЖНЫЙ; метод получил название сазенблоттинг (южный перенос)
  - Метод переноса фрагментов ДНК называют нозенблоттинг (северный перенос)
  - переноса фрагментов белка - вестернблоттинг (западный перенос)
- 
- 
- 

□ **Иммунная электронная микроскопия (ИЭМ)**- электронная микроскопия микробов, чаще вирусов, обработанных соответствующими антителами

Вирусы, обработанные иммунной сывороткой, образуют иммунные агрегаты (микропреципитаты). Вокруг вирионов образуется "венчи" из антител, контрастированный фосфорно-вольфрамовой кислотой или другими электроннооптически плотными препаратами

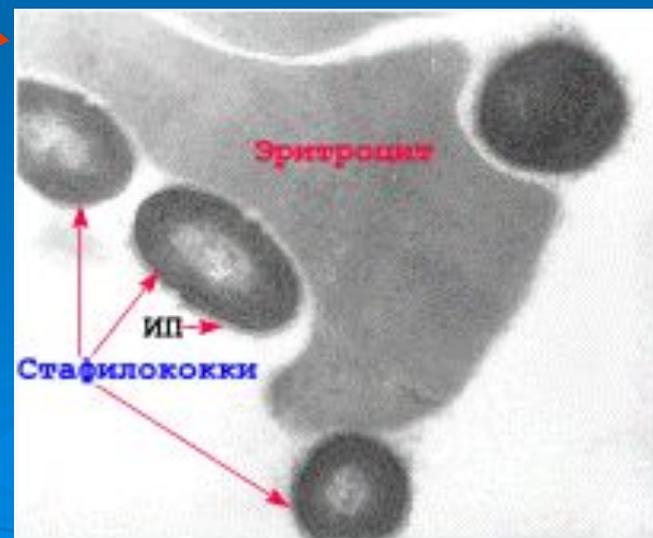


## □ Реакция иммунного прилипания (РИП)

основана на активации системы комплемента корпускулярными антигенами (бактериями, вирусами), обработанными иммунной сывороткой

- В результате образуется активированный третий компонент комплемента (C3b), который присоединяется к корпускулярному антигену в составе иммунного комплекса
- На эритроцитах, тромбоцитах, макрофагах имеются рецепторы для C3b, благодаря чему при смешивании этих клеток с иммунными комплексами, несущими C3b, происходят их соединение и агглютинация

(Препаратмикроскопия ультратонкого среза стафилококка, инкубированного с сывороткой и форменными элементами крови. Иммунное прилипание стафилококков к эритроциту посредством иммуноглобулинового покрова, образовавшегося в результате отложения иммуноглобулинов, комплемента и др. белков на клеточной стенке бактерий. (Препарат А.С. Быкова)



# РН

- АТ 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)

Контроль



Физ. раствор

Опыт



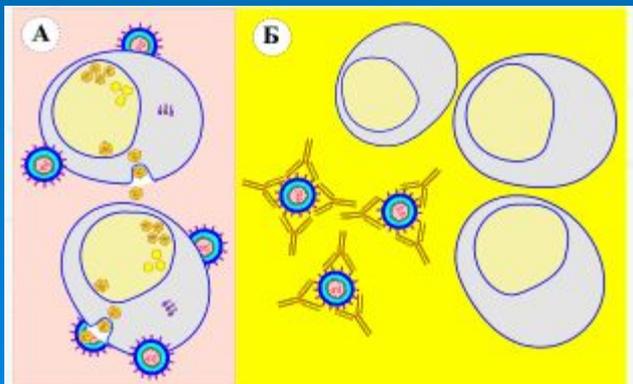
Токсин + антитоксическая поливалентная сыворотка

# РН

- 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.

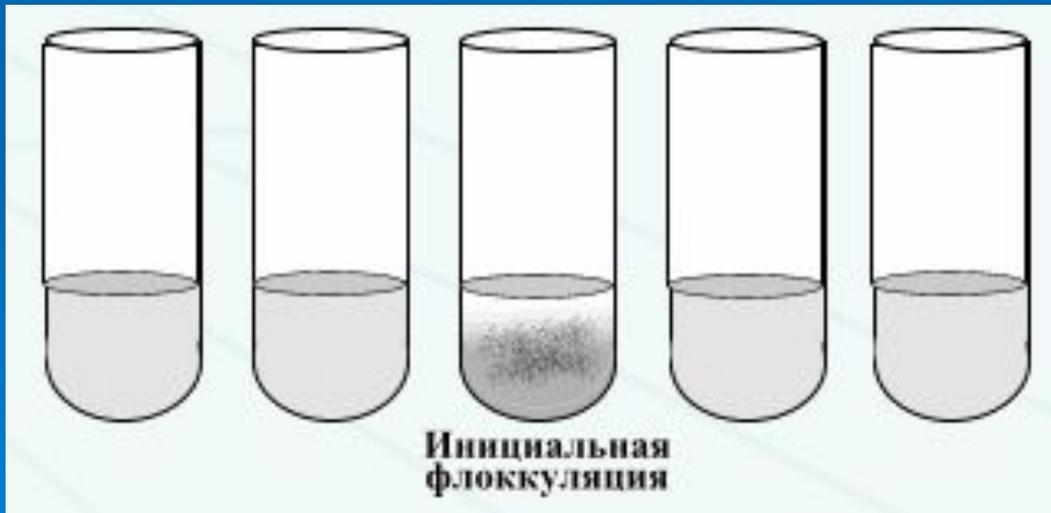
Реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток:

- А - цитопатогенный эффект (ЦПЭ) в результате размножения вирусов;
- Б - ЦПЭ отсутствует в результате нейтрализации вирусов антителами



**Реакция флоккуляции (по Рамону)** (лат. floccus - хлопья шерсти) - появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммунопреципитации) в пробирке при реакции токсин - антитоксин или анатоксин – антитоксин

- для определения активности антитоксической сыворотки или анатоксина



**Спасибо за внимание**

