

ГБОУ ВПО «ТИХООКЕАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ» МЗ 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 сенсibilизированными лимфоцитами

Происходят в живом организме и могут быть воспроизведены в лабораторных условиях

## Особенности:

- **Высокочувствительны** (улавливают АГ в малых 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

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



# Способы достижения комплементарности

- конформационная (пространственная)  
комплементарность - соответствие  
поверхностей выступ-углубление

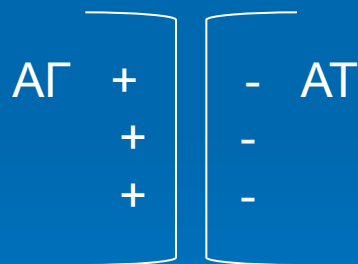
АГ



АТ

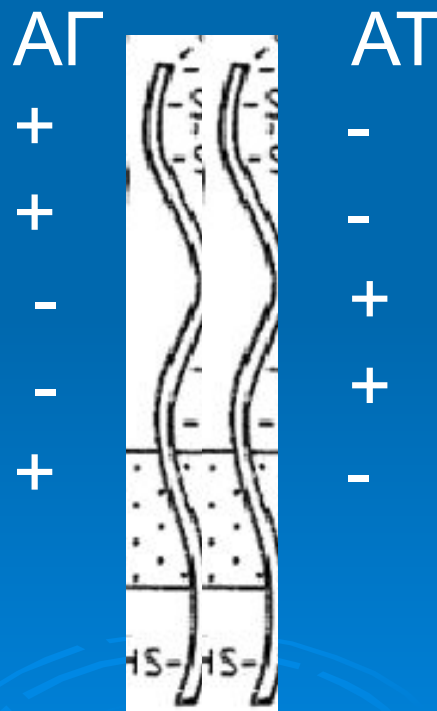
## Способы достижения комплементарности

- Электростатическая комплементарность – достигается противоположными электрическими зарядами: против «+» заряда располагается «-» в результате электростатических сил Кулона



# Способы достижения комплементарности

- Комбинация электростатической и конформационной (пространственной) комплементарности





## типы ИР (иммунологических реакций)

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

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

# компоненты серологических реакций

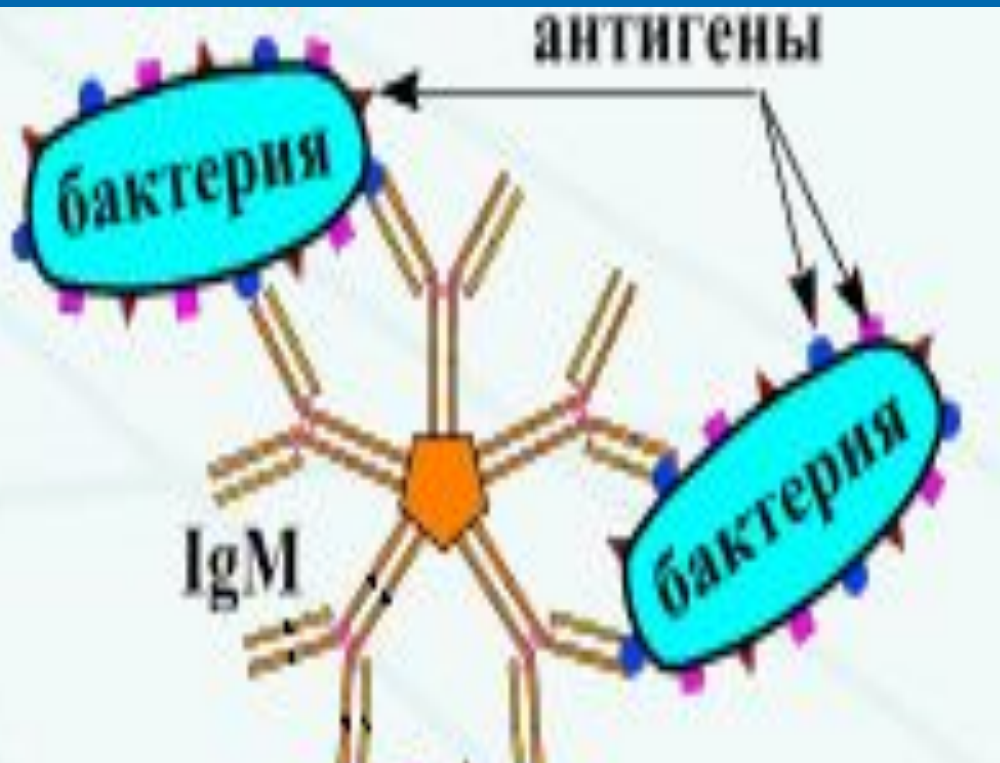
<b>ИР</b>	<b>АГ</b>	<b>Неспецифич. компонент</b>
<b>РА РГА</b>	<b>Бактерии Эритроциты</b>	<b>Электролиты (изотонический р-р NaCl)</b>
<b>РП</b>	<b>Белки, экстракты органов и тканей, лизаты (продукты лизиса клеток), гаптены</b>	<b>То же</b>
<b>Иммунный лизис - бактериолизис - гемолиз - цитолиз</b>	<b>Бактерии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

# Участники феномена взаимодействия (АГ+АТ):

- 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)



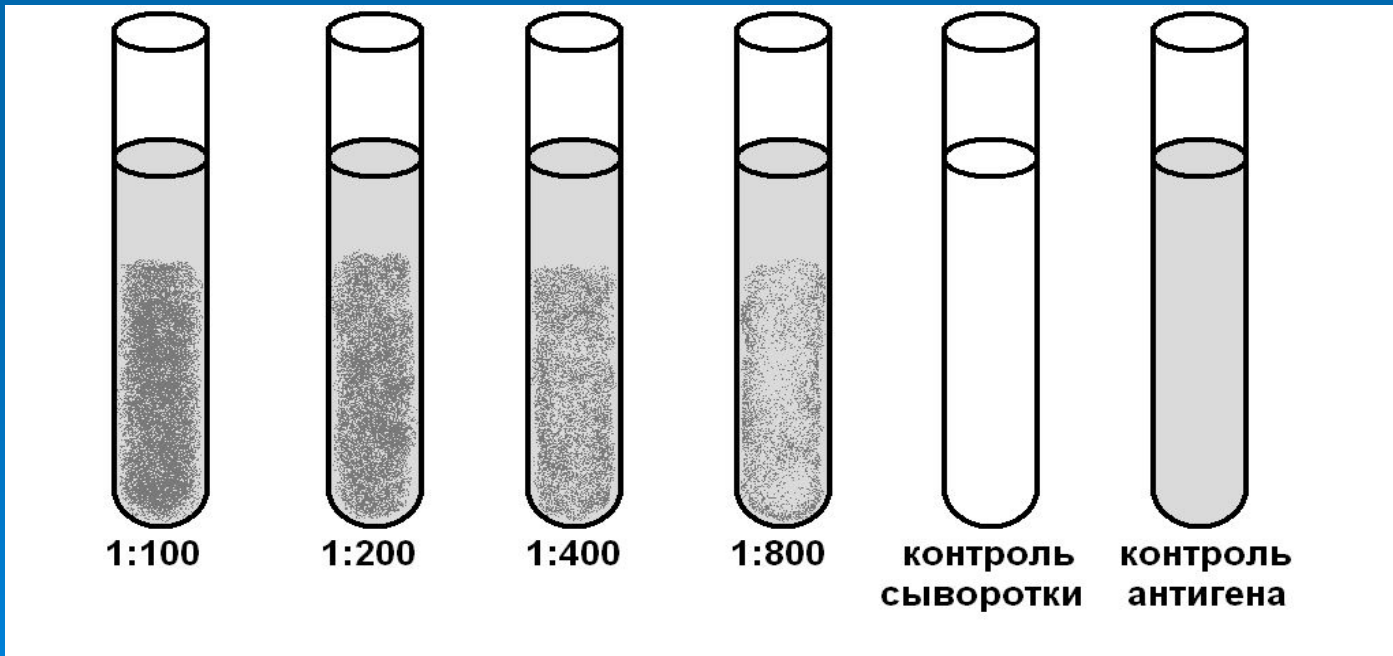
Последующие присоединения ведут к образованию сетей из АГ и АТ, превращающихся в крупные агрегаты, выпадающие в осадок

Фазы серологических р-ций (р-ций взаимодействия между АГ и АТ):

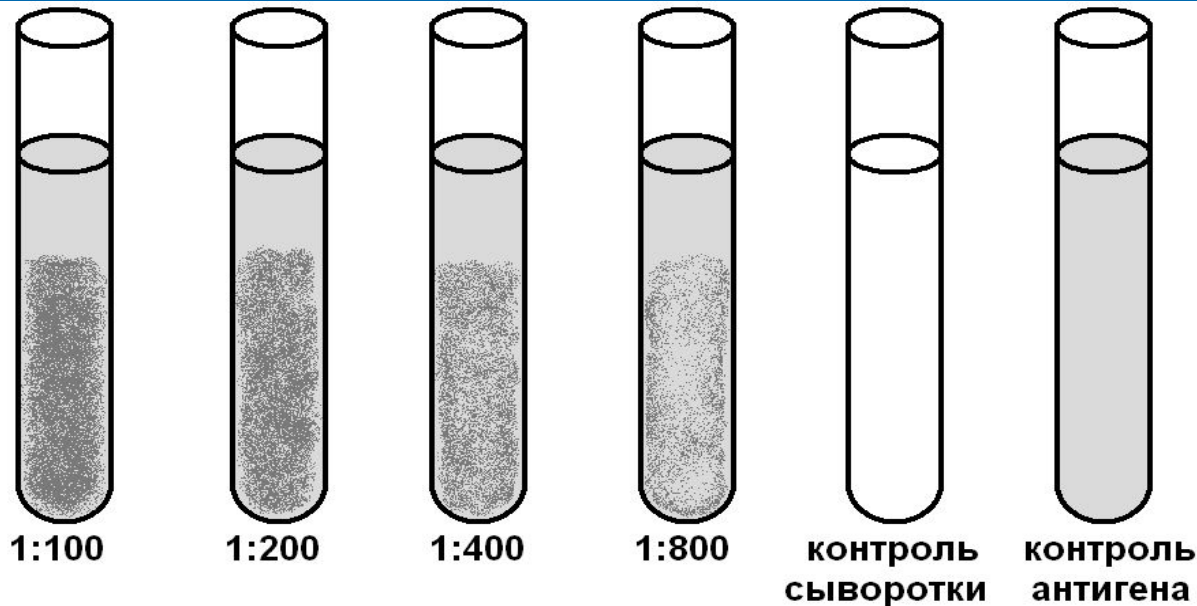
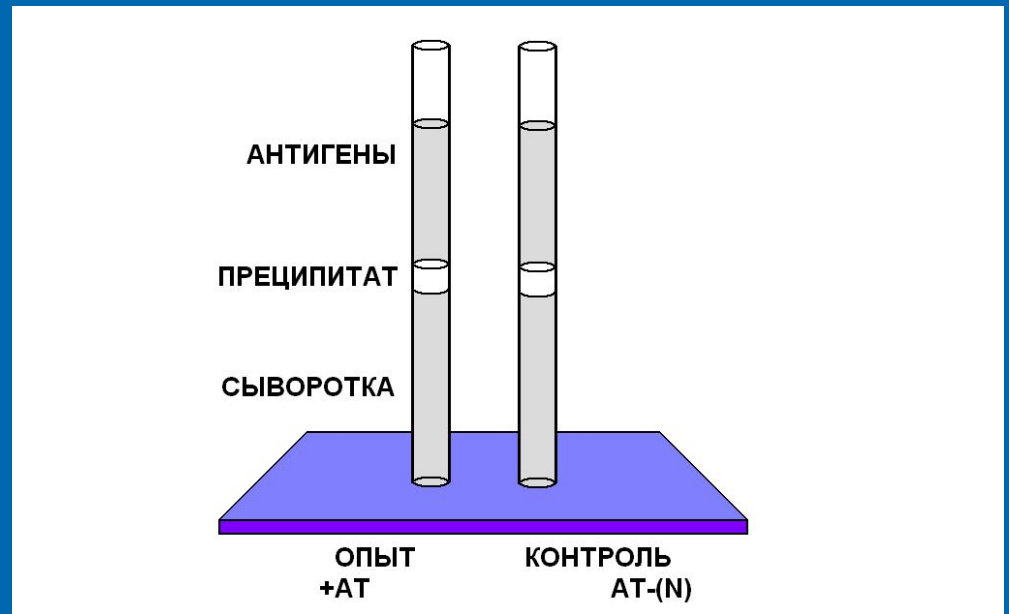
1-я фаза – специфическая – адсорбция АТ на частицах АГ



**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  
взаимодействие 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

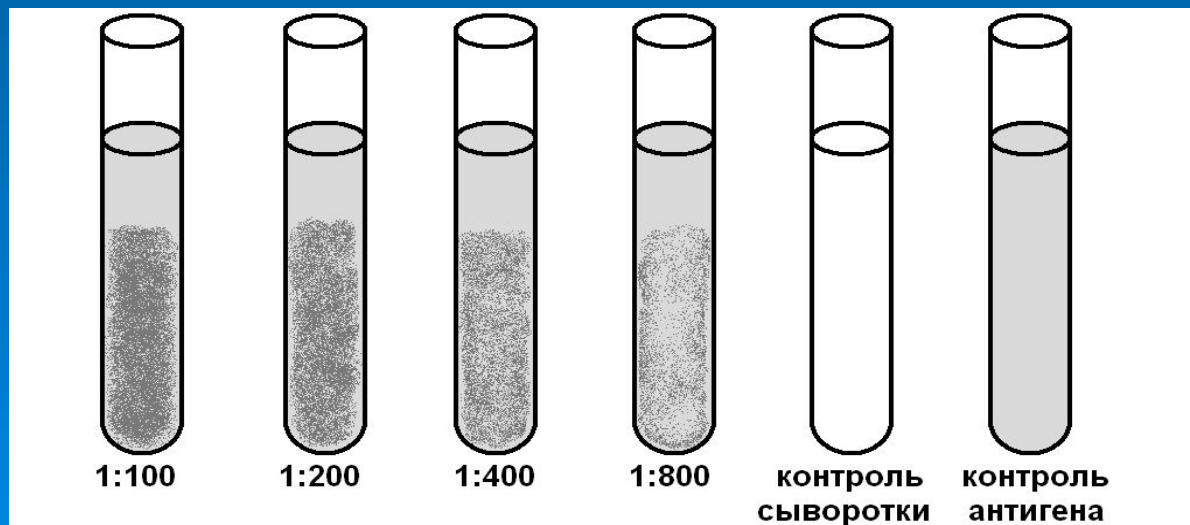


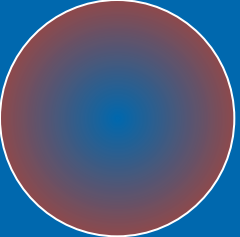
# Применение серологических реакций

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

# 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)

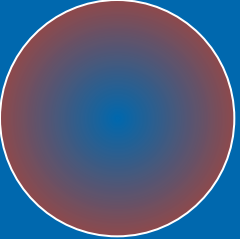




## ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ

- Нативные (неадсорбированные)
- адсорбированные



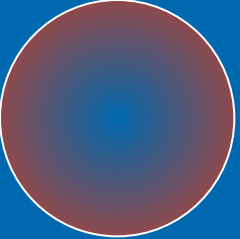


## Недостаток нативных сыв-к:

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

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





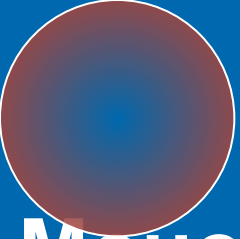
Адсорбированные сыв-ки – строго специфичны  
(реагируют только с гомологичным АГ)

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





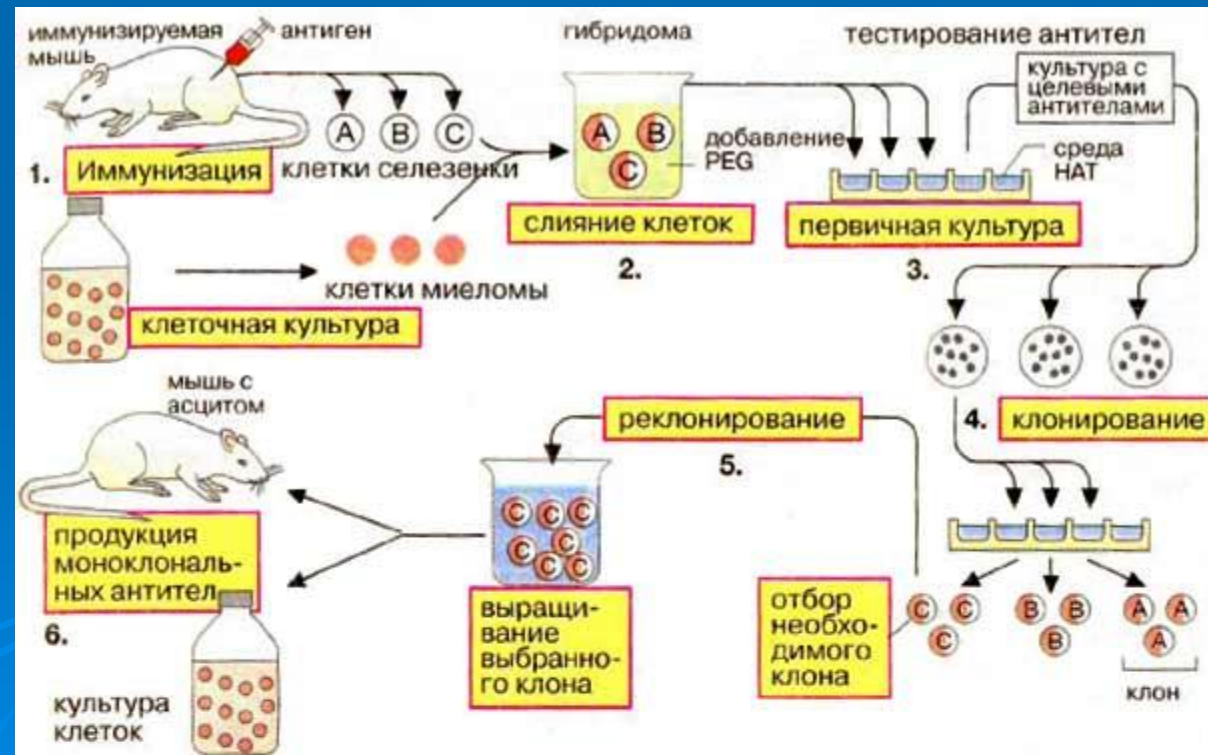
**Моноклональные АТ** синтезированы к одному классу, подклассу, аллотипу, имеют один вид легких цепей, однозначную аффинность (можно получить АТ к определенному участку молекулы)

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



**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



**А. Моноклональные антитела**

# 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

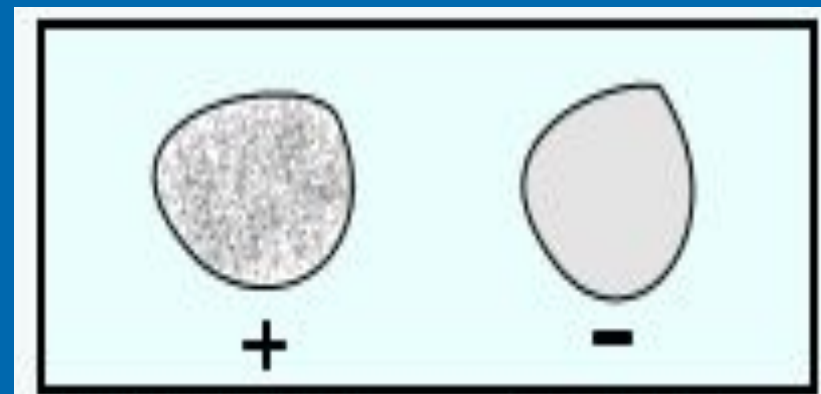
- **идентификации микробов** – АГ служит их взвесь, а антителом – известная иммунная сыворотка (диагностическая)





# Постановка реакции:

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

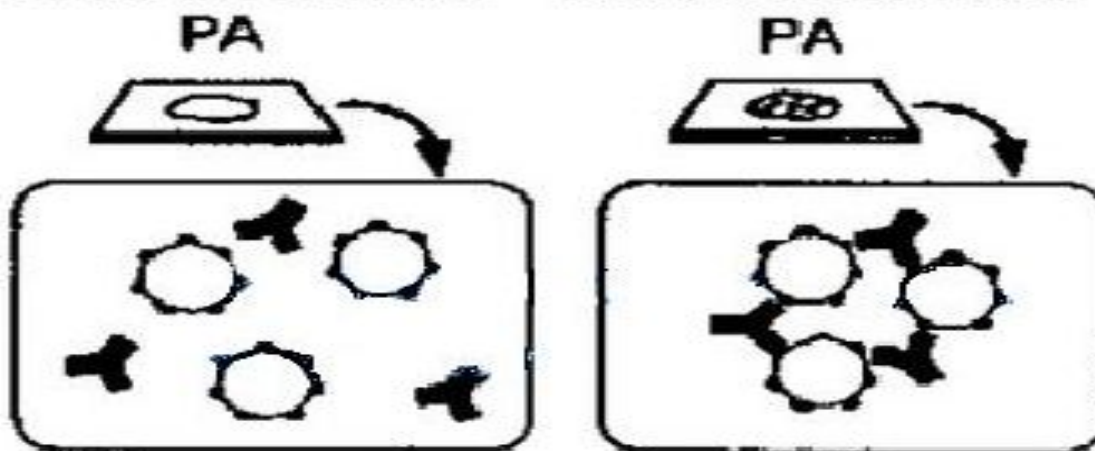


Агглютинация  
положительная

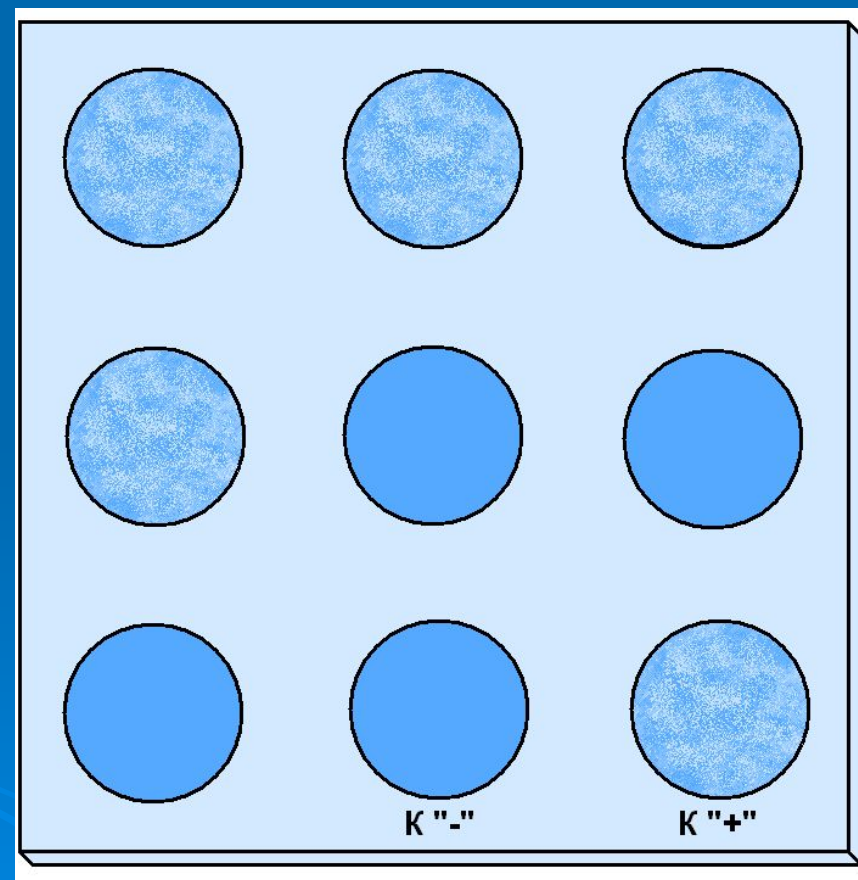
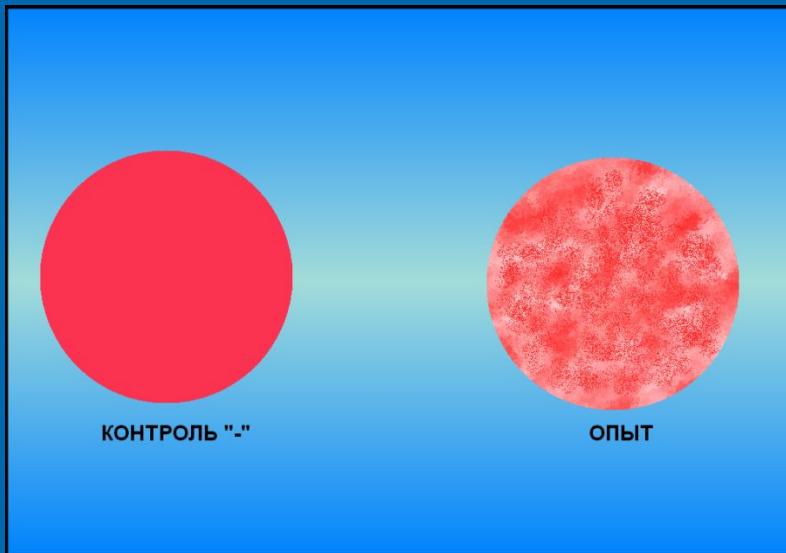
Контроль  
(нет агглютинации)

Отрицательная

Положительная



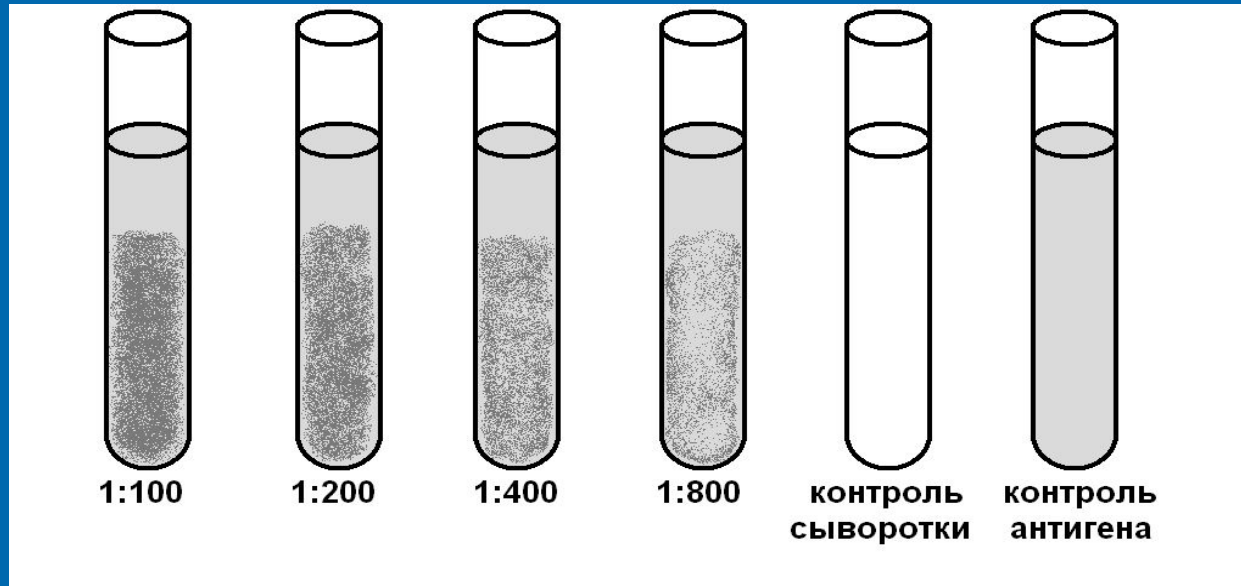
# □ РА на стекле



# 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

Учет по четырехплюсовой системе

Агглютиноскоп – прибор для изучения характера и величины агглютината

## Агглютинация:

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

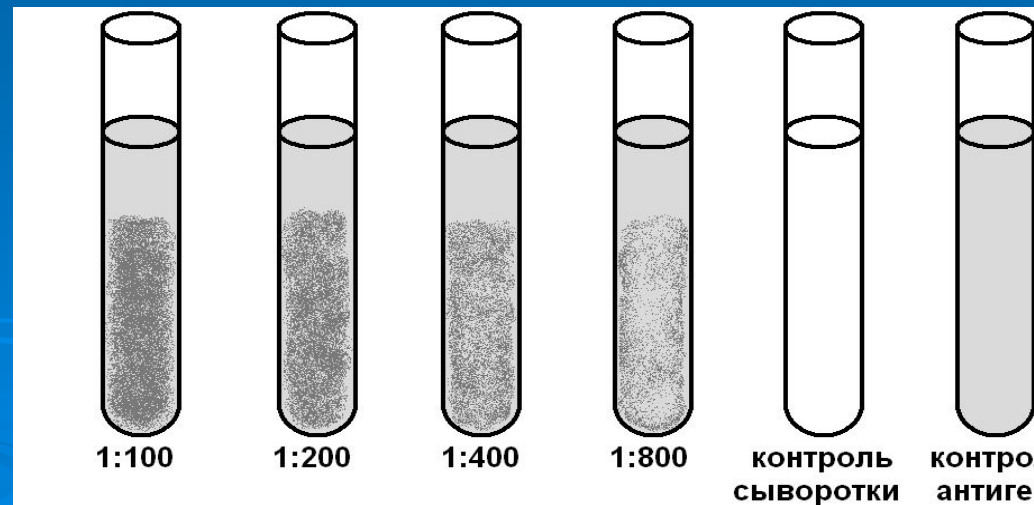
наступает быстрее, образующийся при этом осадок очень рыхлый, легко разбивается



# 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 гемагглютинации (по механизму действия):

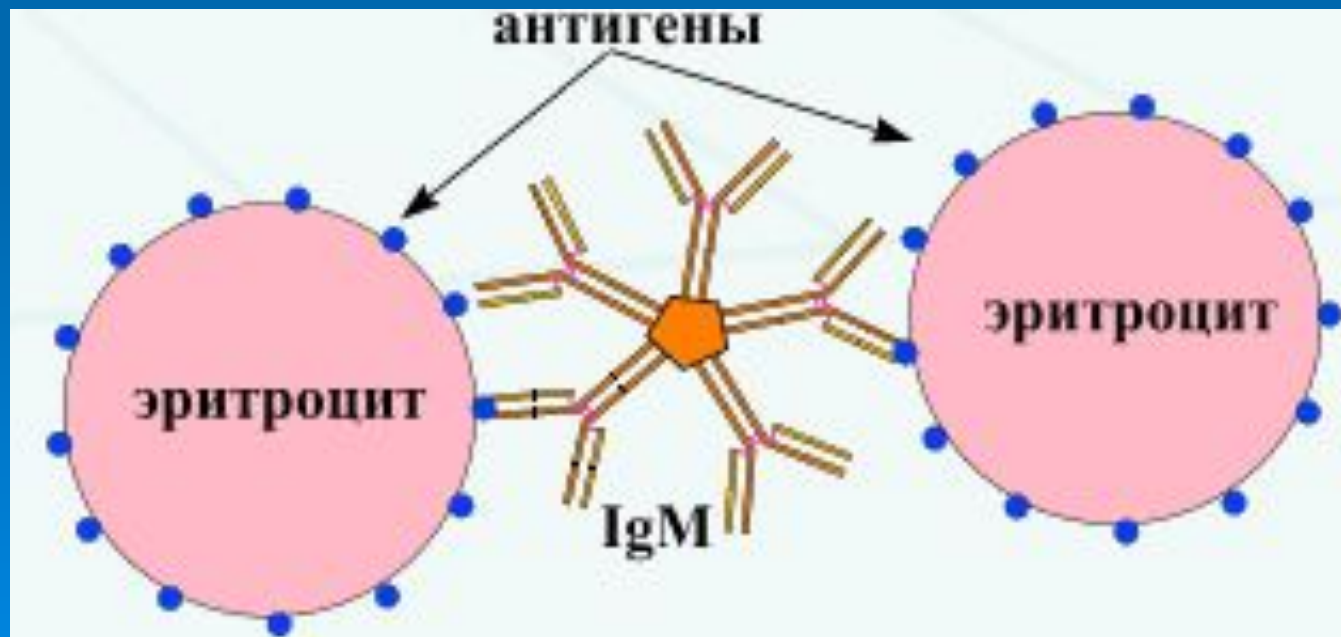
- РГА – серологическая (Er агглютинируются с АТ (гемагглютинаинами))
- РГА – несерологическая, в основе – биологический механизм (наличие на Er некоторых видов рецепторов к вирусным частицам)

Позволяет судить о наличии вируса в материале



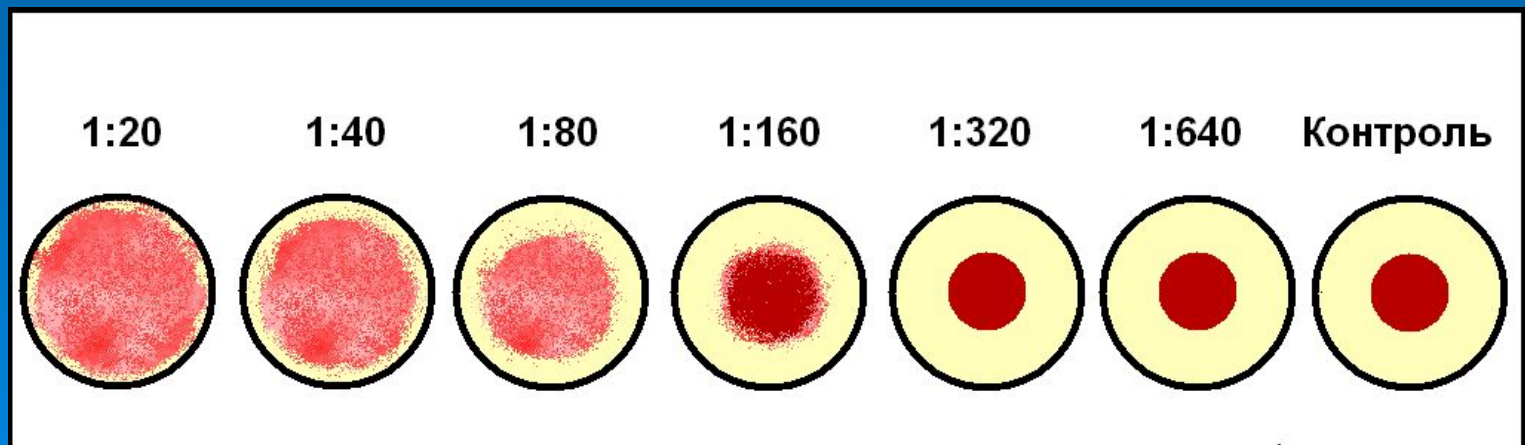
# Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА, РПГА)

Er, с адсорбированным на поверхности растворимым АГ, приобретают способность агглютинироваться при взаимодействии с АТ к адсорбированному АГ

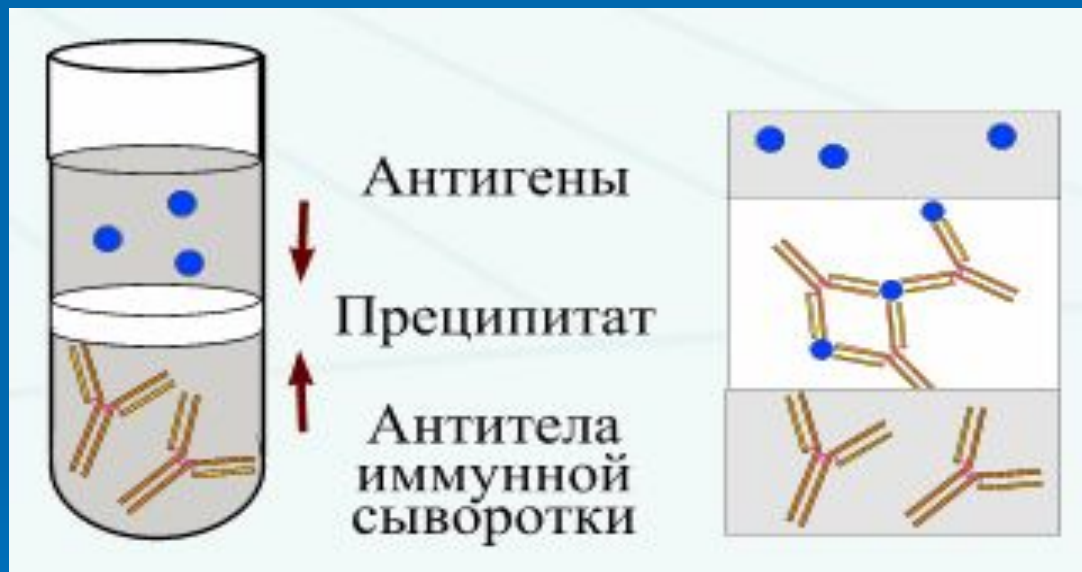




# Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА, РПГА)



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

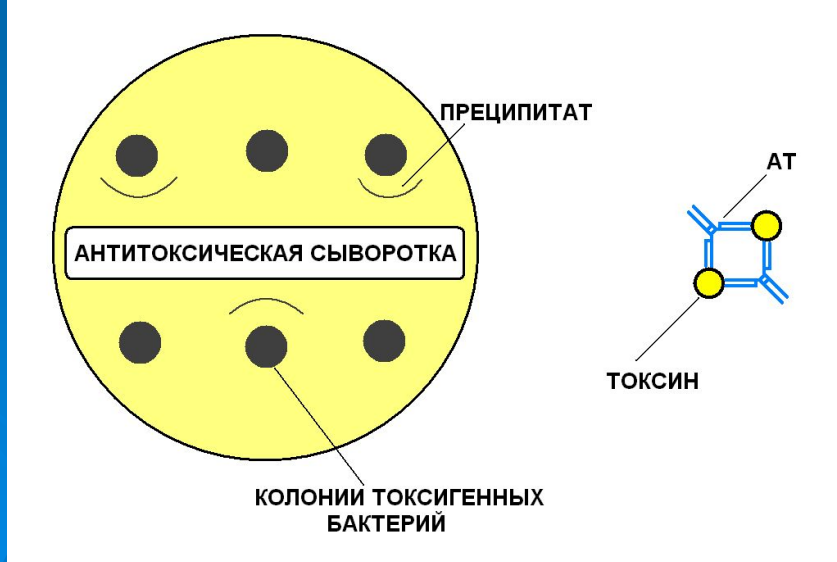
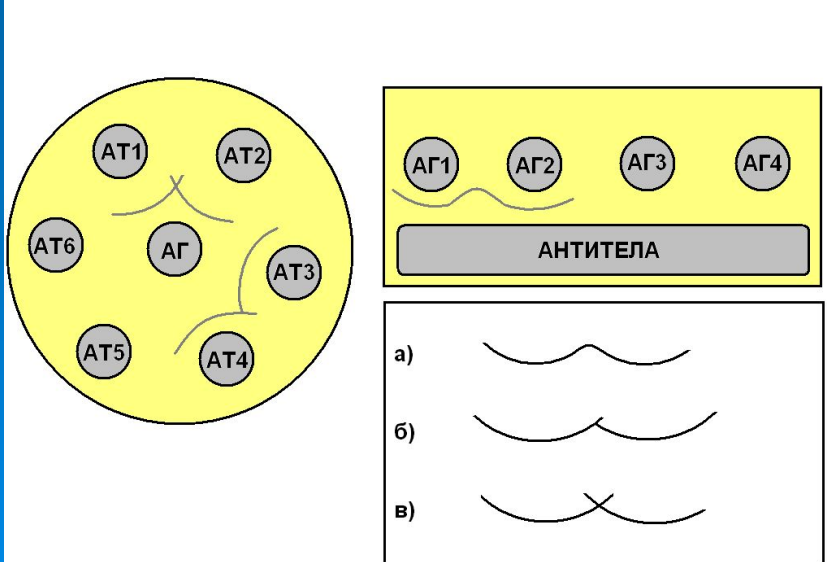
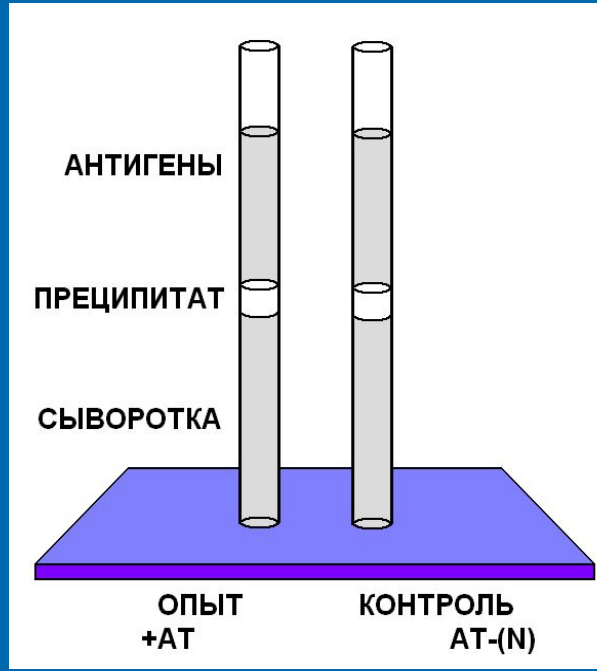


РП обычно применяют для определения АГ:

- 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

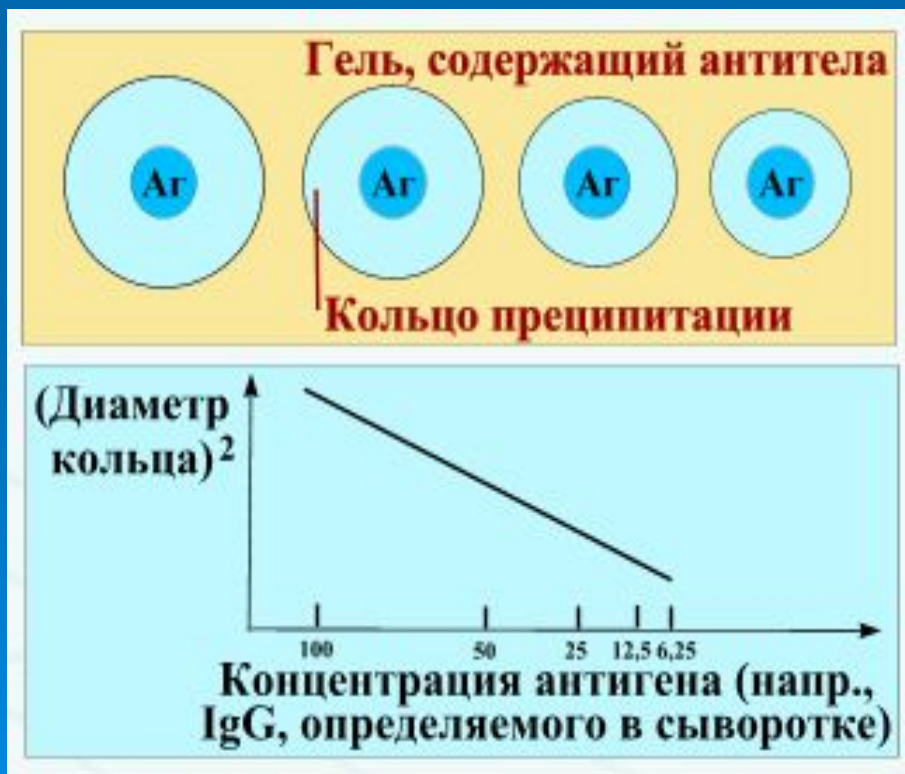


# радиальная иммунодиффузия (по Манчини) :

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.

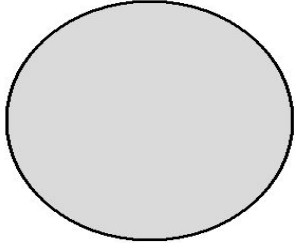
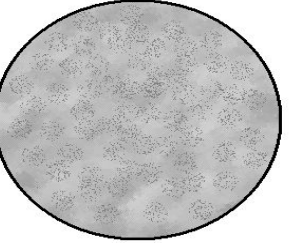


## Реакция микропреципитации на примере экспресс-диагностики сифилиса (ЭДС)

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)

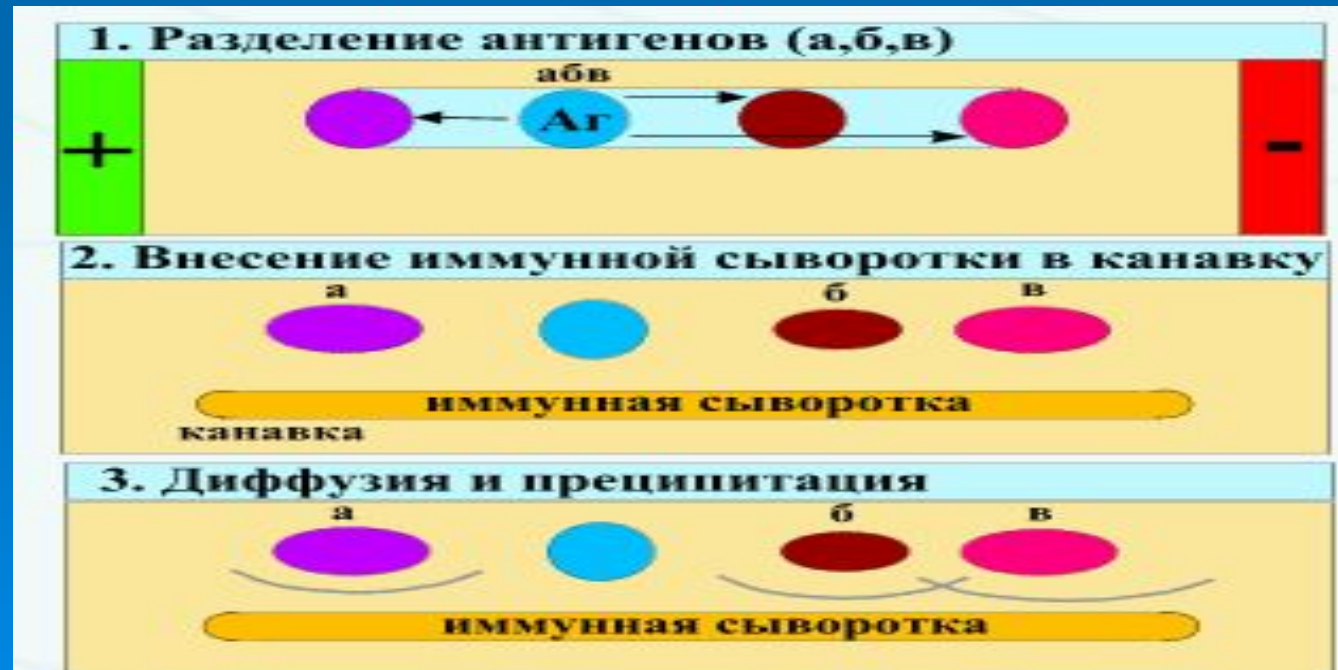
В опытной лунке – изучаемая сыворотка больного, взятая в разведении 1:10 и кардиолипиновый антиген (2-5 минут осторожно покачиваем планшет, в течение этого времени формируется преципитат, жидкость в лунке становится прозрачной. Учет реакции ведется по четырехплюсовой системе. Результат, оцениваемый как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

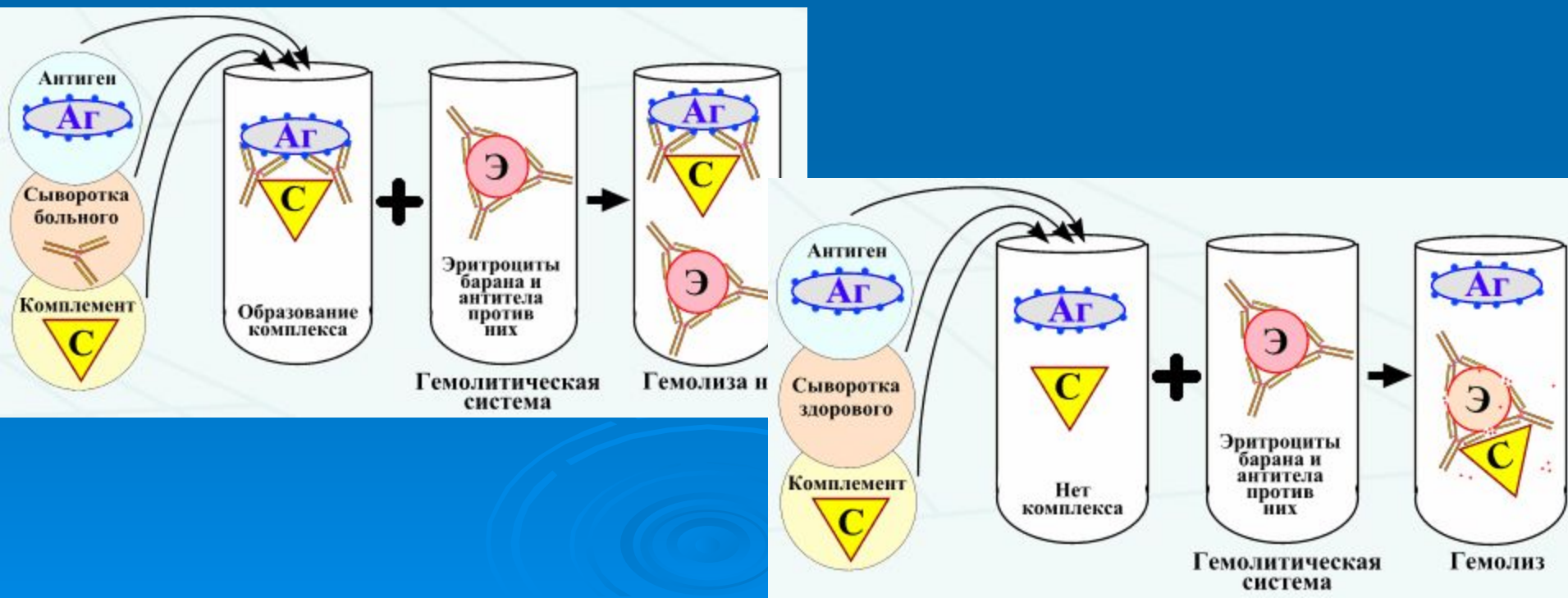
смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза (в течение 1-2 часов. Различные антигены с разной скоростью перемещаются между катодом и анодом), затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой диффундируют в гель и образуют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

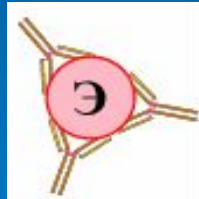
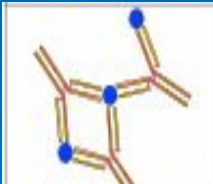


# РСК применяют

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

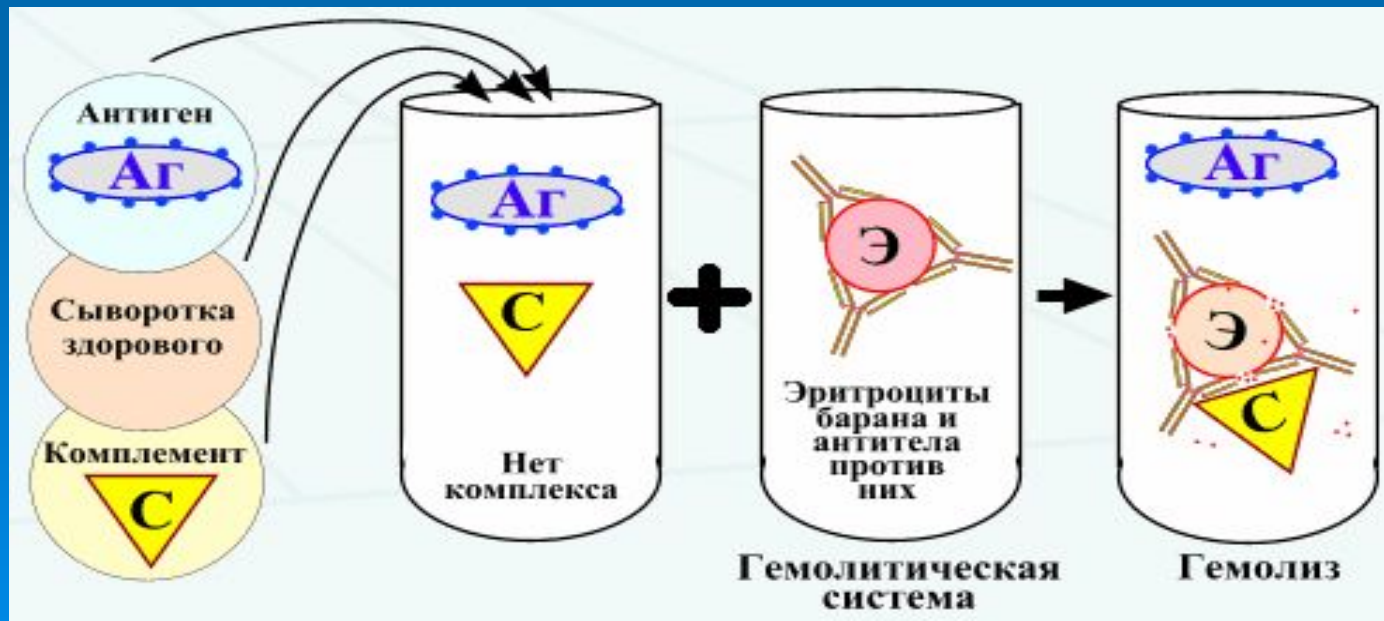
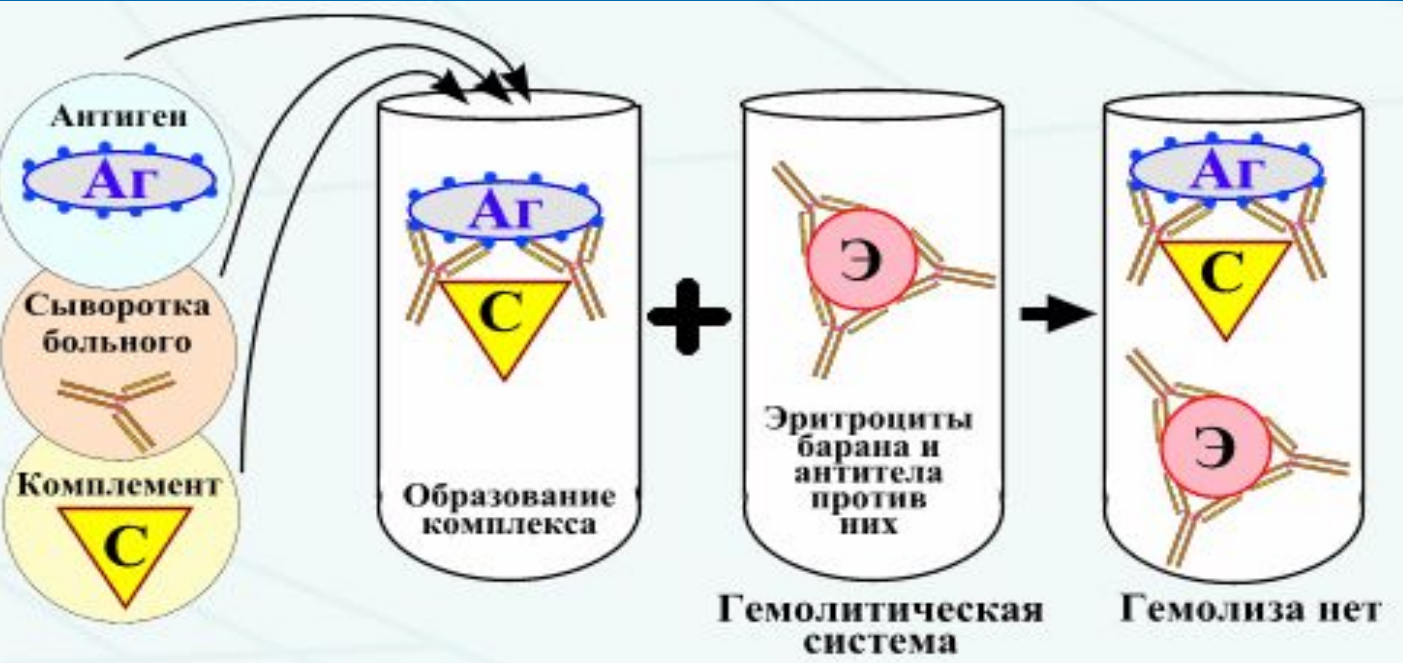
участвуют:

- 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 (ФИТЦ), способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа



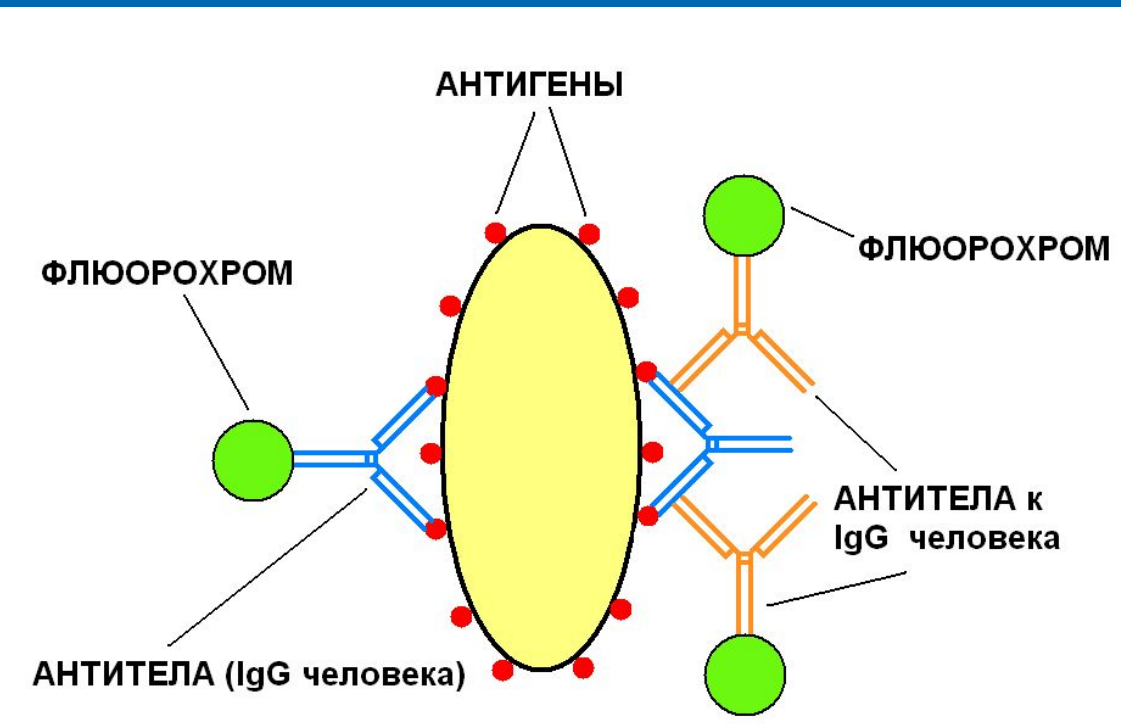
Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета

- **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

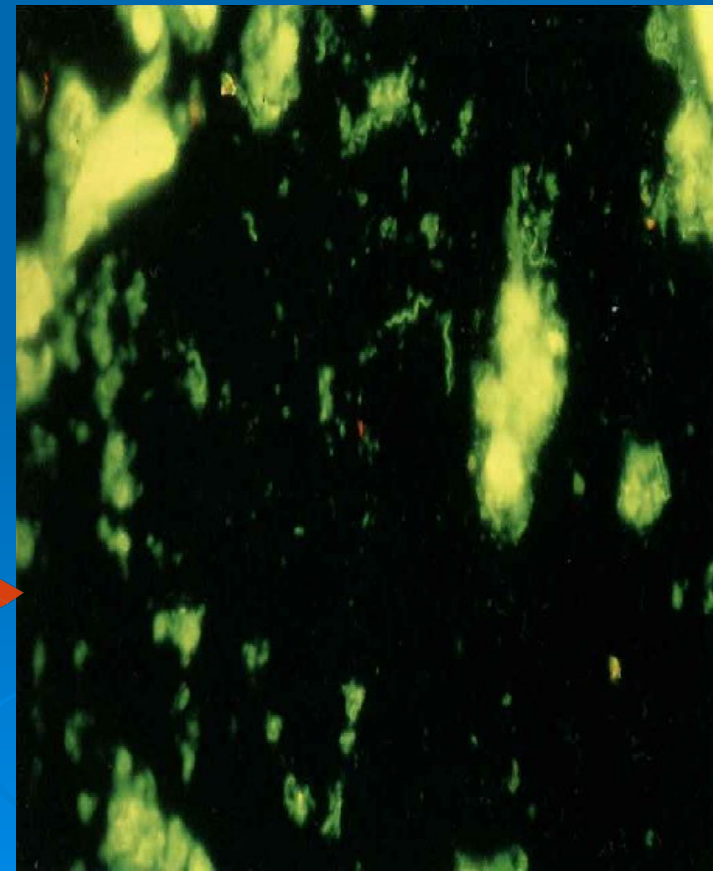


# РИФ (ПИФ)

# 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.)

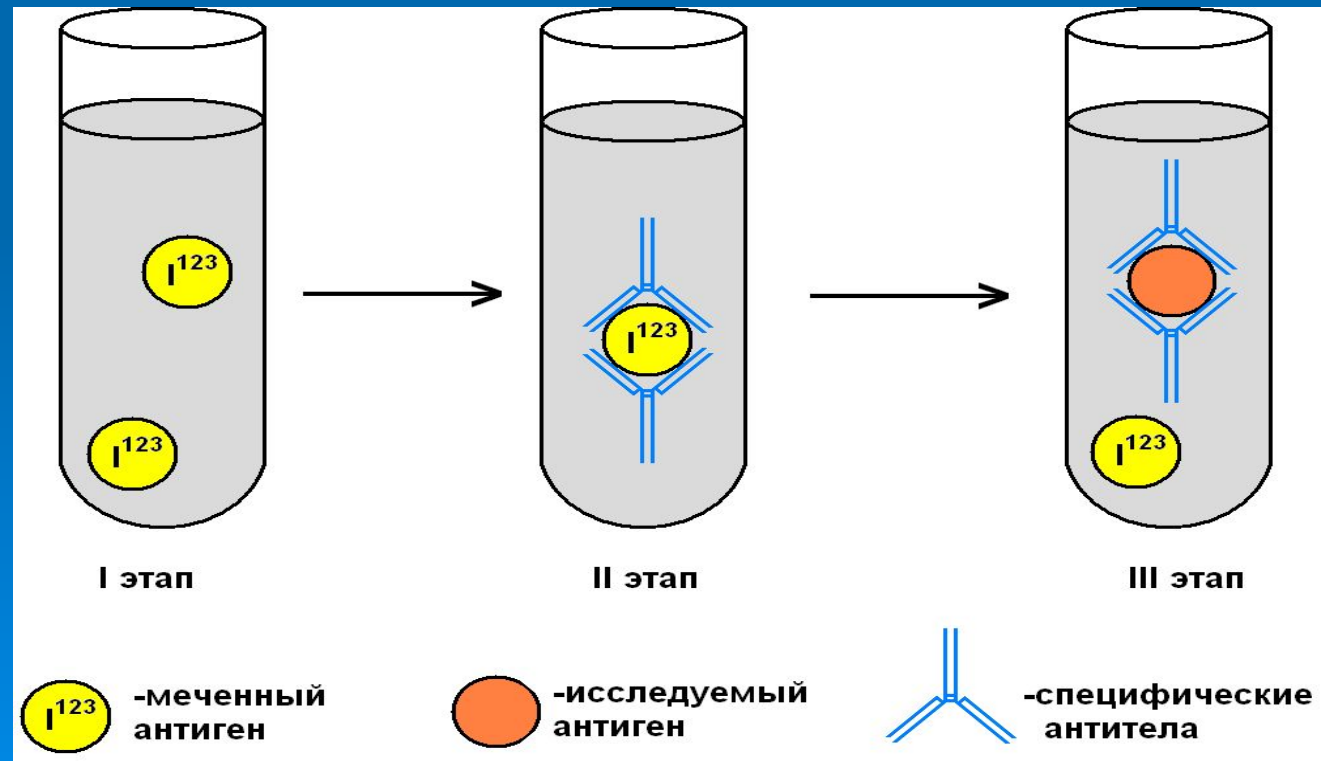
применяют для  
выявления:



микробных антигенов  
гормонов  
ферментов и т.д.

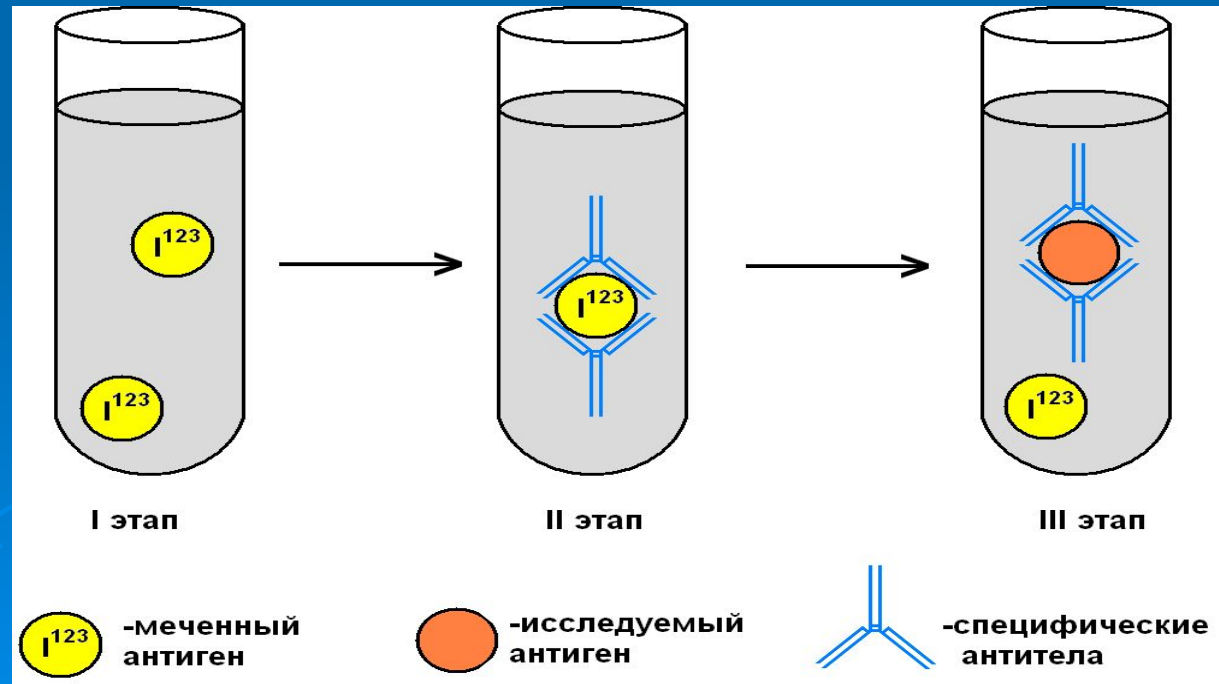
После взаимодействия АГ с АТ отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (бета- или гамма-излучение)

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 :



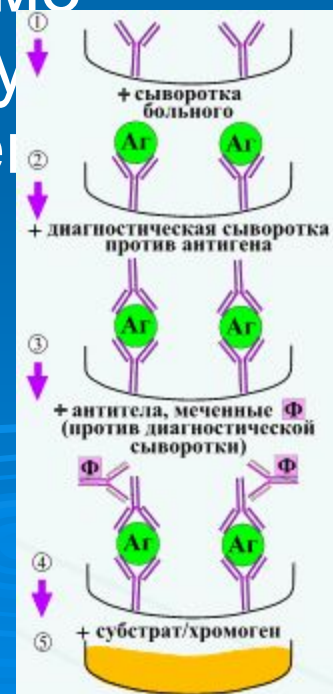
- диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней
- определения гормонов, ферментов
- лекарственных препаратов,
- др. БАВ, содержащихся в минорных концентрациях -  $10^{10}$  -  $10^{12}$



# 1ФА

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-антител

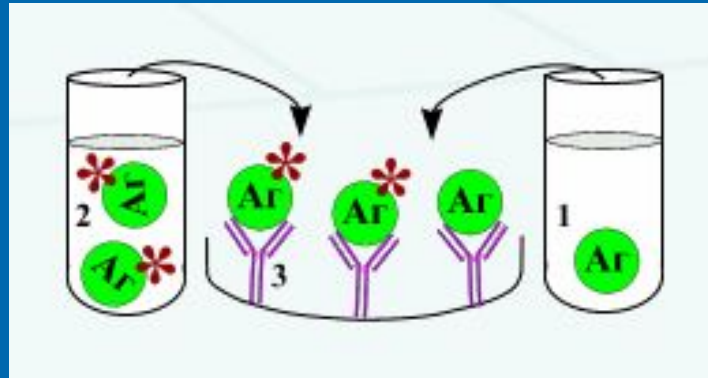




Твердофазный ИФА - вариант теста, когда один из компонентов иммунной - реакции (антиген или антитело ) сорбирован на твердом носителе, напр., в лунках планшеток из полистирола. Компоненты выявляют добавлением меченых антител или антигенов. При положительном результате изменяется цвет хромогена



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

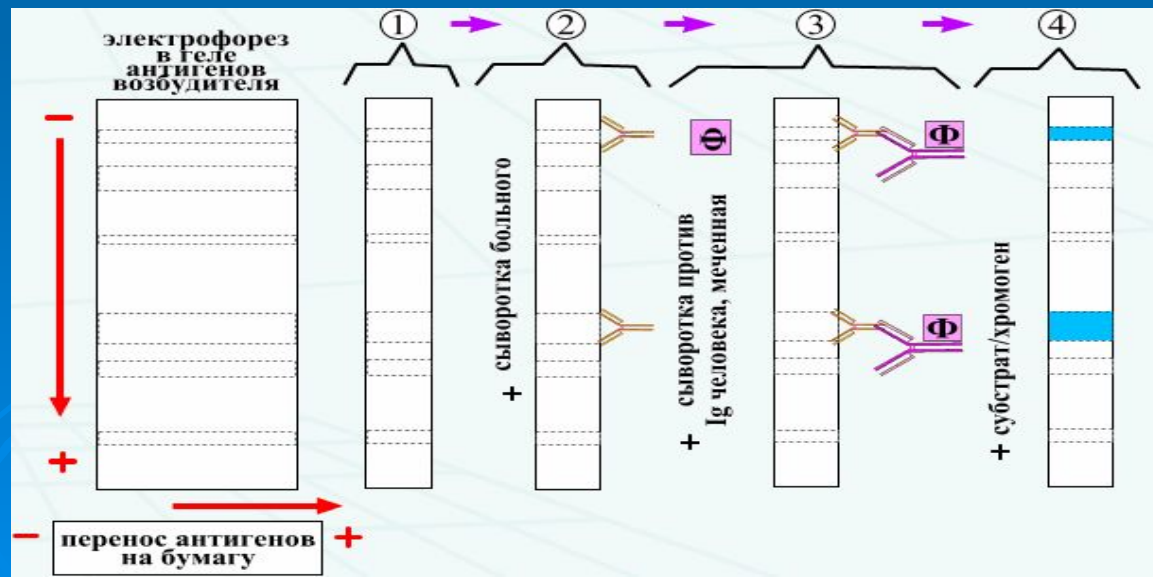






- Конкурентный ИФА для определения антител: искомые антитела и меченые ферментом антитела конкурируют друг с другом за антигены, сорбированные на твердой фазе.

# 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

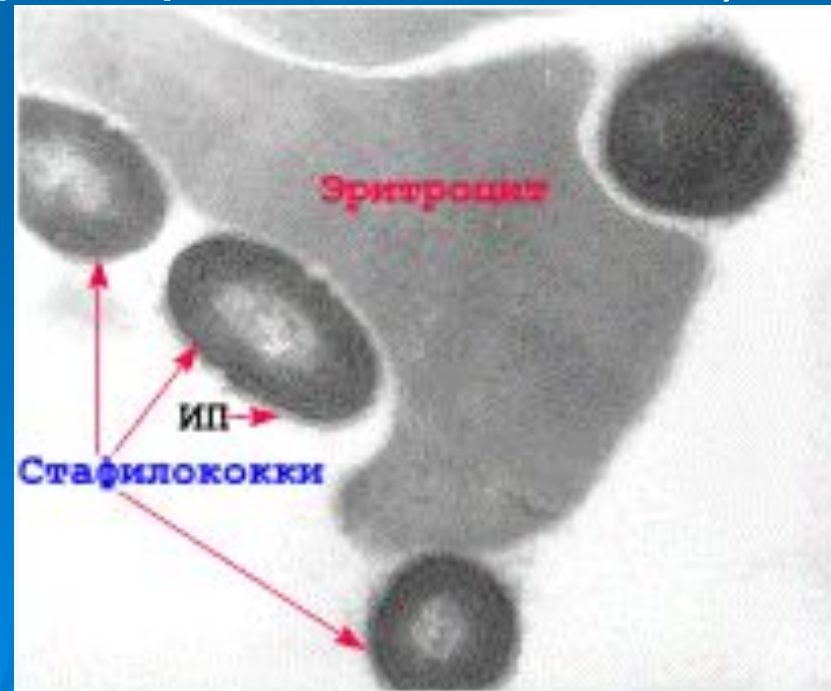
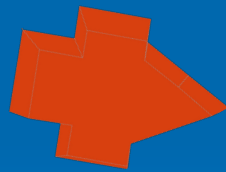
Вирусы, обработанные иммунной сывороткой, образуют иммунные агрегаты (микропреципитаты). Вокруг вирионов образуется "венчи" из антител, контрастированный фосфорно-вольфрамовой кислотой или другими электроннооптически плотными препаратами



- 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)





## PH

- 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

РН

□ **Реакцию нейтрализации (РН)**  
проводят путем введения смеси антиген  
- антитело животным или в  
чувствительные тест-объекты (культуру  
клеток, эмбрионы)

Контроль



Опыт



Физ. раствор

Токсин + антитоксическая поливалентная  
сыворотка

ТОКСИН



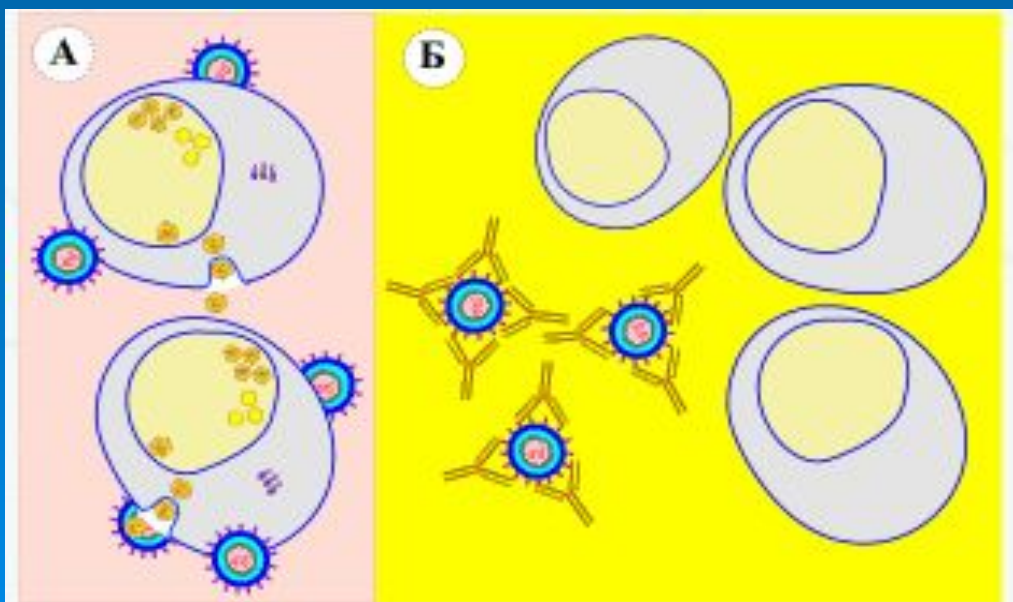
РН

- 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

РН

Реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток:

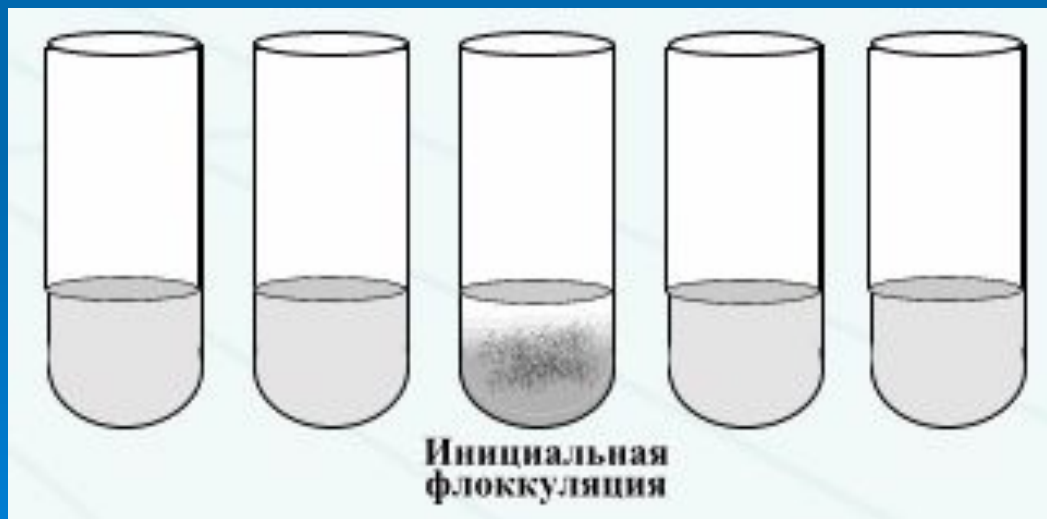
- А - цитопатогенный эффект (ЦПЭ) в результате размножения вирусов;
- Б - ЦПЭ отсутствует в результате нейтрализации вирусов антителами



**Благодарю за внимание**



- 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



# Качества антигена

иммун  
огенно  
сть

чужеро  
дност  
ь

Антиген

антиг  
еннос  
ть

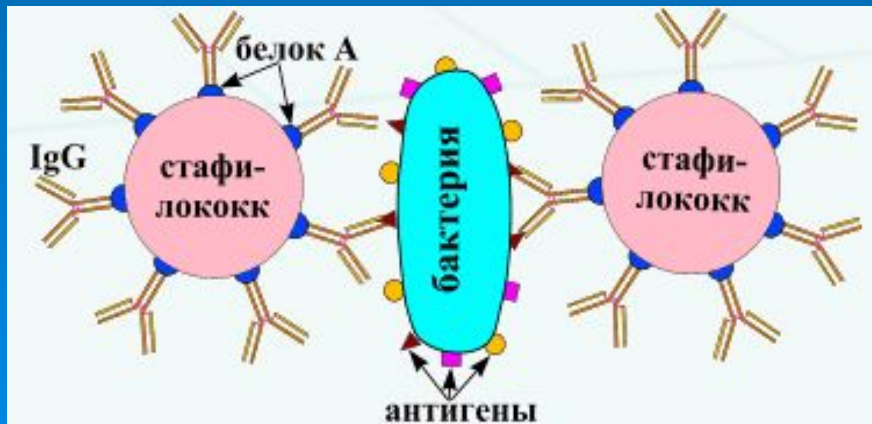


специ  
фично  
сть

# 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





# Адгезия и колонизация

