



СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Выполнила студентка 208 группы лечебного факультета
Кобылецкая Татьяна. 2011г

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Серологические реакции — это реакции взаимодействия между **антигеном** и соответствующим ему **специфическим антителом** *in vitro*, имеющие различные внешние проявления.

Широко используются в микробиологических и серологических лабораториях с целью:

- серодиагностики бактериальных, вирусных, реже других инфекционных заболеваний,
- сероидентификации выделенных бактериальных, вирусных и других культур различных микроорганизмов

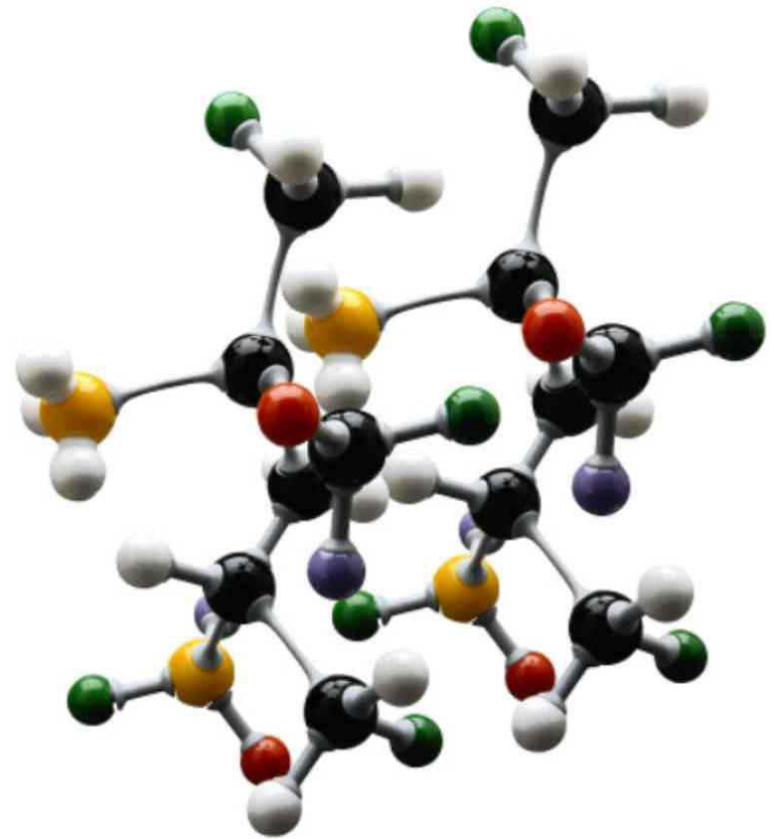


Применение СР

- Для серологической диагностики:
 1. обнаружение неизвестных антител с помощью известного антигена – **диагностикума**
 2. обнаружение неизвестных антигенов с помощью известных антител.
- Для серологической идентификации возбудителя – определение **серогруппы, серовара** возбудителя с помощью специфической иммунной диагностической сыворотки

Фазы СР

- **Специфическая**
(невидимая, быстрая, обратимая) – результат взаимодействия антигена и антитела за счет **водородных, кулоновских и вандерваальсовых сил**.
- **Неспецифическая**
(видимая, медленная, необратимая) – появление видимых изменений: агглютинации, гемолиза и т. д.

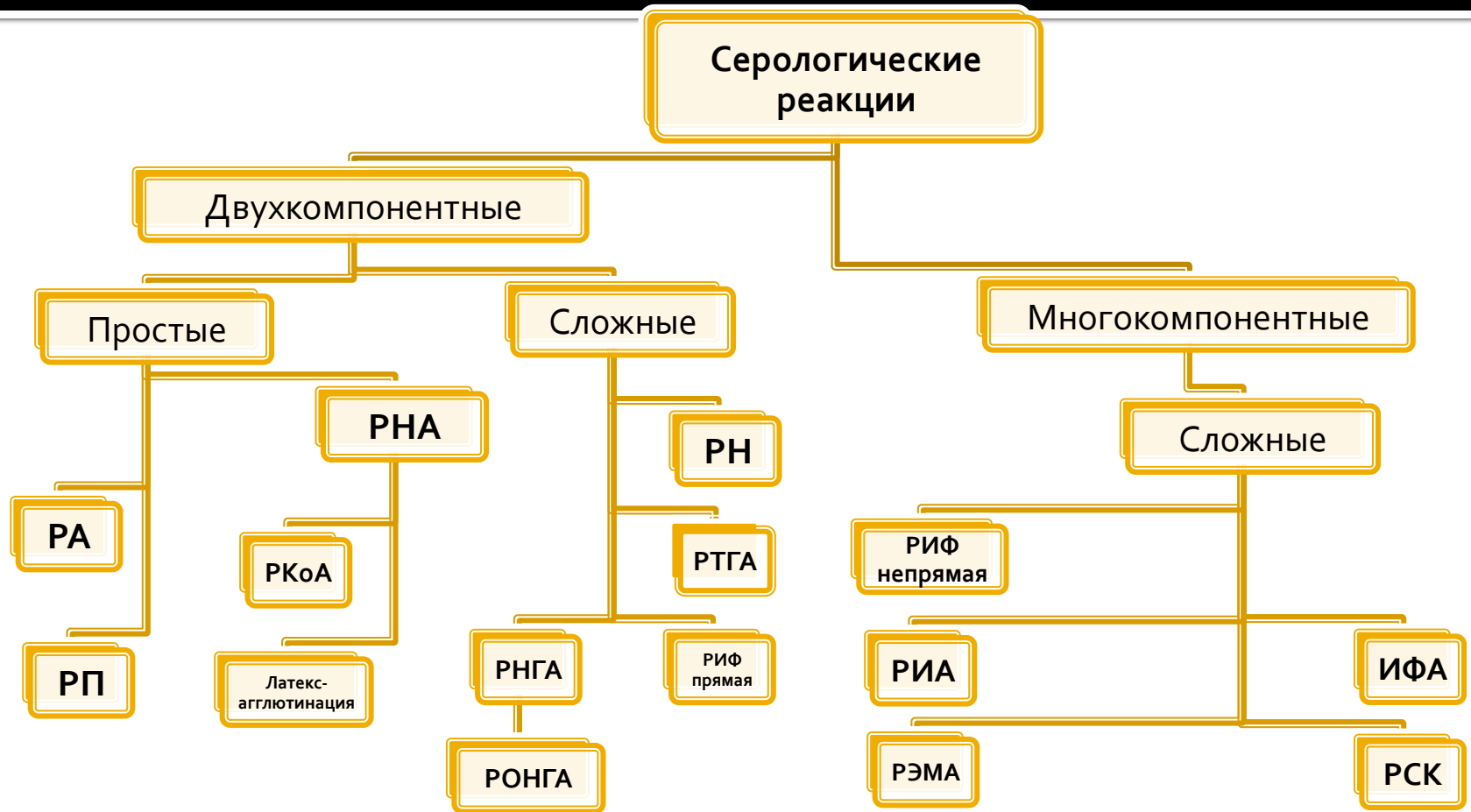


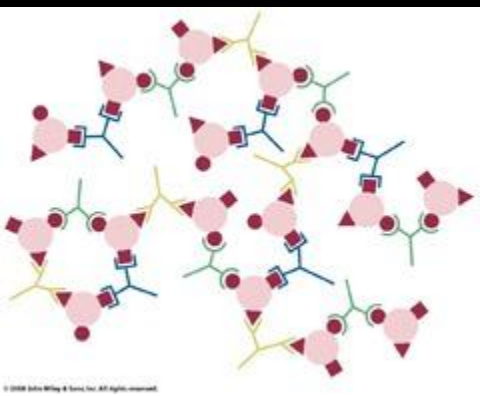
Параметры СР

- **Чувствительность** реакции указывает на концентрацию антител или антигенов, которая определяется с помощью данной реакции.
- **Специфичность** - способность антигенов или антител реагировать только с гомологичными антителами, содержащимися в сыворотке крови, либо с гомологичными антигенами соответственно.



Классификация серологических реакций

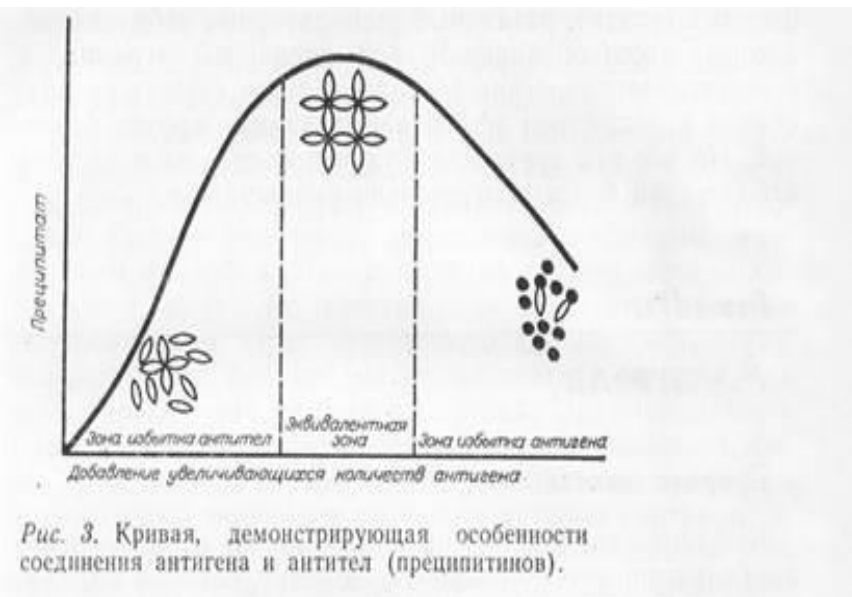




Реакции агглютинации и преципитации

- Наиболее полно **механизм** соединения антигена и антитела объяснен гипотезой Маррека (теория "решетки") и Полинга (теория "фермы").
- Маррек рассматривает соединение антигена и антител в виде решетки, в которой антиген чередуется с антителом, образуя решетчатые конгломераты.
- Согласно гипотезе Полинга антитела имеют две валентности (две специфические детерминанты), а антиген несколько валентностей - он поливалентен. При соединении антигена и антител образуются агломераты, напоминающие "фермы" построек.

Реакции агглютинации и преципитации



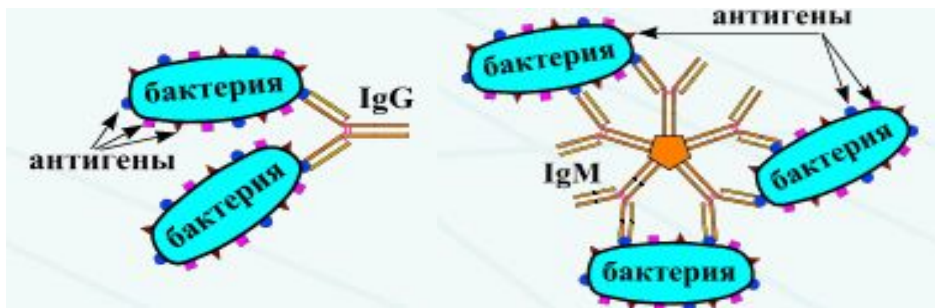
- При оптимальном соотношении антигена и антител образуются большие прочные комплексы, видимые простым глазом.
- При избытке антигена каждый активный центр антител заполнен молекулой антигена, не хватает антител для соединения с другими молекулами антигена и образуются мелкие, невидимые глазом комплексы.
- При избытке антител, для образования решетки не хватает антигена, детерминанты антител отсутствуют и видимого проявления реакции нет.

Реакция агглютинации

Метод обнаружения *корпускулярных антигенов* (бактерий, эритроцитов) путем их *склеивания* антителами с образованием *аггломератов* – хлопьев, в присутствии электролита NaCl.

РА используют для:

- Серотипирования выделенной чистой культуры возбудителя
- Экспресс-обнаружения возбудителя
- обнаружения антител в сыворотке крови больного животного



Реакция агглютинации (РА)

Компоненты реакции:

1. Антиген – крупный, корпускулярный, целая клетка (бактерия или эритроцит)
 2. Антитело – IgM (валентность 5)
 3. Физраствор
- **Агглютинация с О-диагностикумом** (бактерии, убитые нагреванием, сохранившие О- антиген) происходит в виде мелкозернистой агглютинации.
 - **Агглютинация с Н - диагностикумом** (бактерии, убитые формалином, сохранившие жгутиковый Н-антиген) - крупнохлопчатая и протекает быстрее.

Способы постановки: РА на стекле; развернутая РА



РА на стекле

- используется в основном для серотипирования выделенной чистой культуры возбудителя, реже для ускоренного обнаружения антител

Постановка реакции:

- ❑ На предметное стекло помещают каплю сыворотки (Опыт) и каплю физраствора (Контроль)
- ❑ В каждой капле распределяют взвесь бактерий
- ❑ Появление мелкозернистой или хлопьевидной агглютинации – положительный результат
- ❑ Равномерное помутнение – отрицательный результат



Опыт «+» Контроль «-»

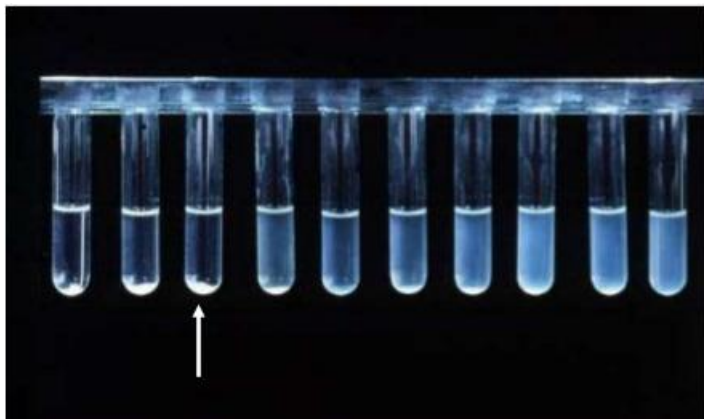


Развернутая РА

- используется в основном для обнаружения антител в сыворотке больного

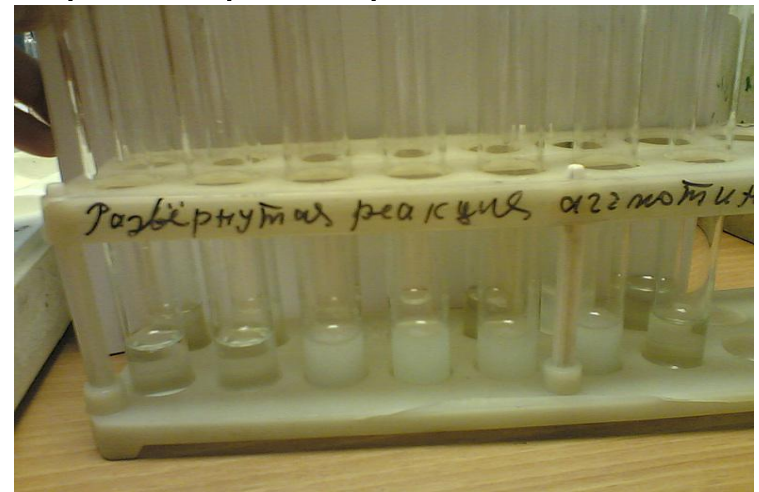
Постановка реакции:

- ❑ Развернутую РА проводят в пробирках или лунках пластин.
- ❑ При этом готовят десятикратные разведения исследуемой сыворотки и вносят одинаковые количества антигена.
- ❑ При положительном результате на дне пробирки образуется рыхлый осадок и сам раствор становится прозрачным,
- ❑ отрицательный результат- помутнение раствора сохраняется



«+»

«-»



	Реакция агглютинации	Реакция преципитации
Механизм	Теория решетки Марека-Полинга	
Антиген	Крупный, корпускулярный, целая клетка	Мелкодисперсный, растворимый
Антитела	IgM	IgG

Реакции непрямой агглютинации

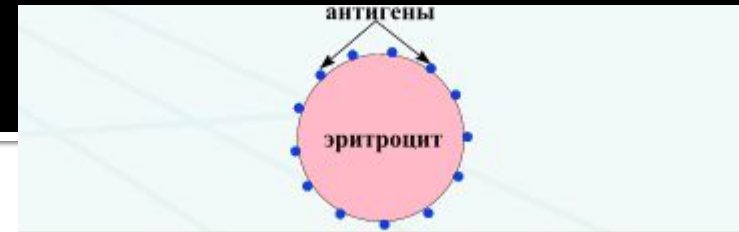
- Метод обнаружения **антигенов** и **антител**, который основан на способности корпускулярных носителей (**эритроцитов, шариков латекса, клеток стафилококков**) адсорбировать на своей поверхности растворимые антигены.

- В зависимости от типа корпускулярного носителя различают:

- [РНГА](#)
- [Латекс-агглютинация](#)
- [РКоА](#)



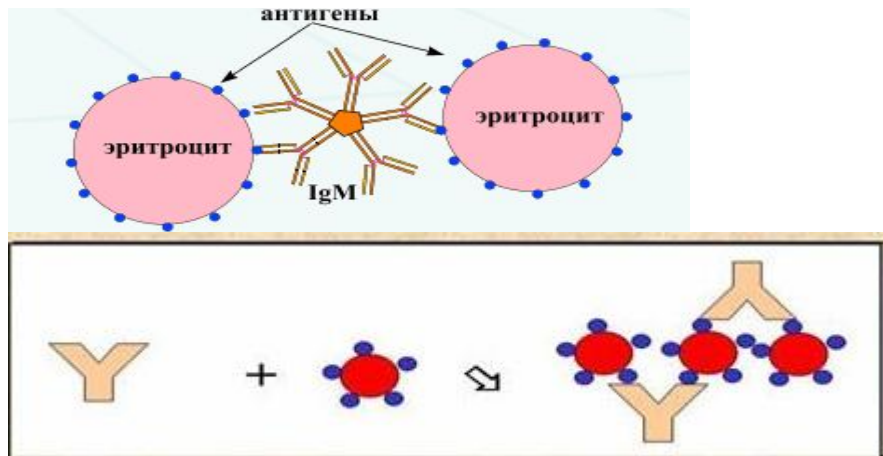
Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)



- Компоненты реакции:
1. Эритроцитарный диагностикум (эритроциты с адсорбированными на них антигенами)
 2. Исследуемая сыворотка
 3. Физраствор



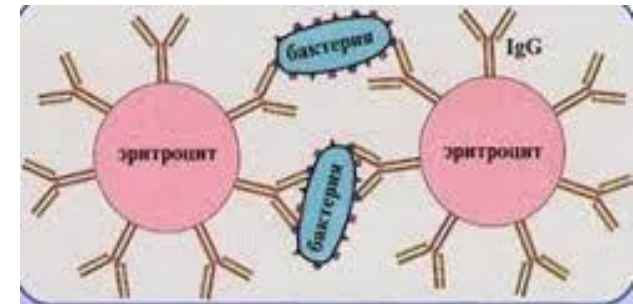
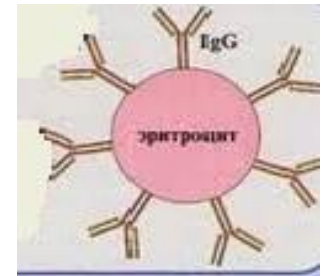
РНГА ставят в пластиковых планшетах с разведениями сыворотки крови больного, к которым добавляют эритроцитарный диагностикум.



Титр сыворотки = 1:160 (максимальное разведение исследуемого материала, при котором реакция положительна)

Реакция обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА)

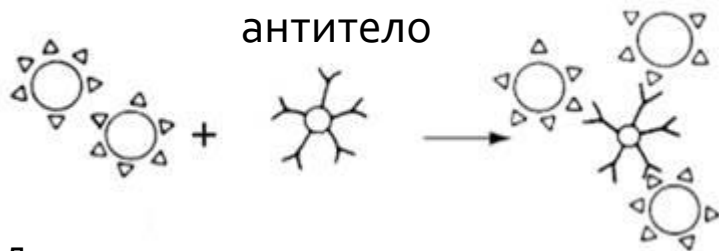
- Компоненты реакции:
 1. Эритроцитарный антительный диагностикум (эритроциты с адсорбированными на них антителами)
 2. Исследуемый материал
 3. Физраствор
- Постановка РОНГА не отличается от РНГА
- Применение: обнаружение аг (например, бактериального экзотоксина)



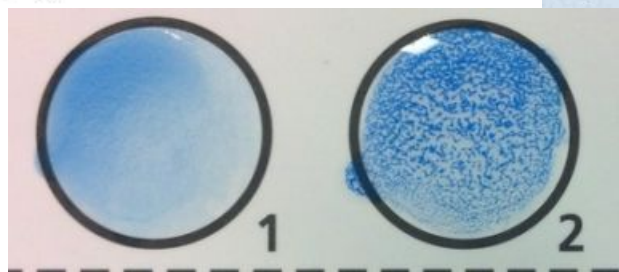
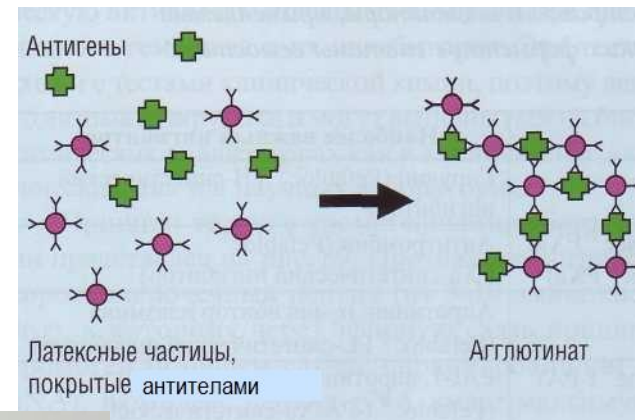
Латекс-агглютинация



Вариант РНА, в которой частицы *латекса* с адсорбированными на них молекулами антигенов или антител агглютинируются соответствующими антигенами или антителами. Применяют качественный и количественный методы. Ставят по типу *агглютинации на стекле*.



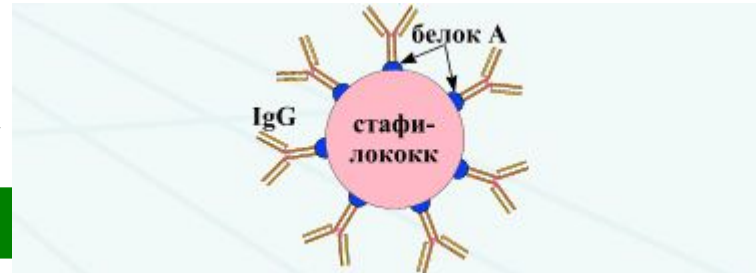
Латексные частицы, покрытые антигенами



Реакция коаггутинации

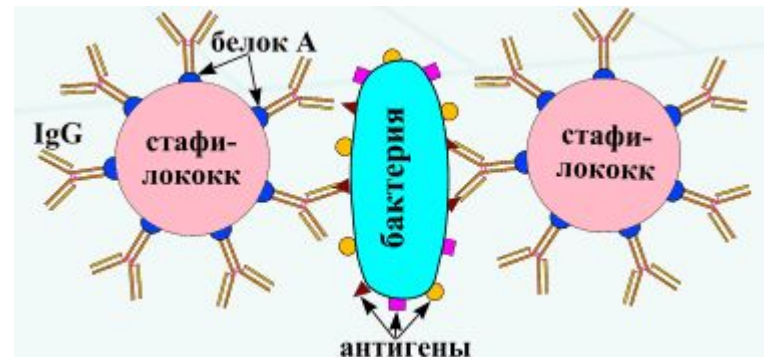
Реакцию коаггутинации применяют для определения антигенов с помощью антител, адсорбированных на белке А клеток стафилококка (антительный диагностикум).

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 коаггутинации



Реакция преципитации

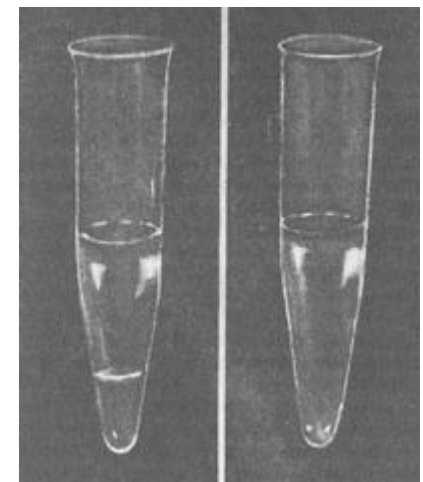
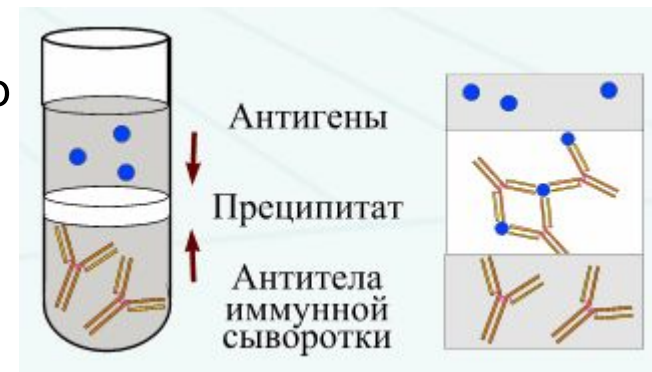
- **Реакция преципитации** - РП (от лат praecipilo осаждать) - это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого *преципитатом*.

Компоненты реакции:

1. Антиген – мелкодисперсный, растворимый
 2. Антитело – IgG (валентность 2)
 3. Физраствор
- Преципитат 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 преципитата**.
- Если в качестве антигенов в реакции используют прокипяченные и профильтрованные экстракты тканей, то такая реакция называется реакцией-термопреципитации (реакция, при которой выявляют сибиреязвенный гаптен).



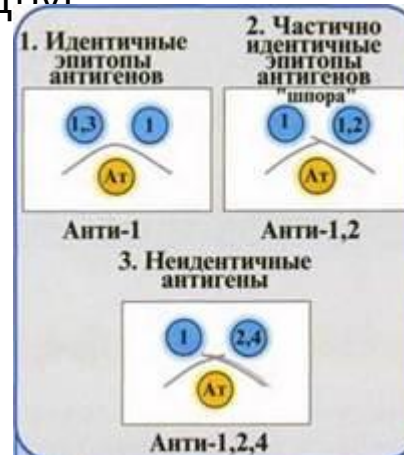
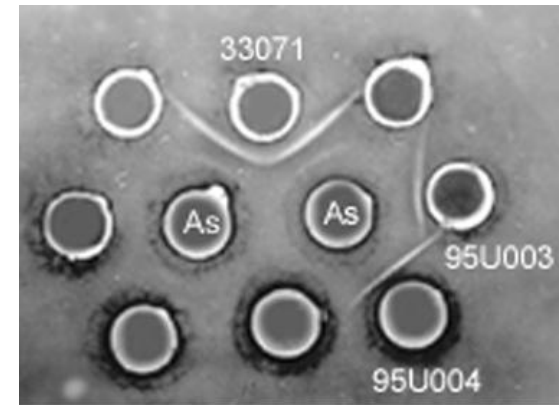
Опыт Контроль

Реакция микропреципитации



Двойная диффузия в геле 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.



У многокомпонентных систем между лунками с антигенами и антителами появляется несколько линий преципитата; у идентичных АГ линии преципитата сливаются; у неидентичных АГ - пересекаются.

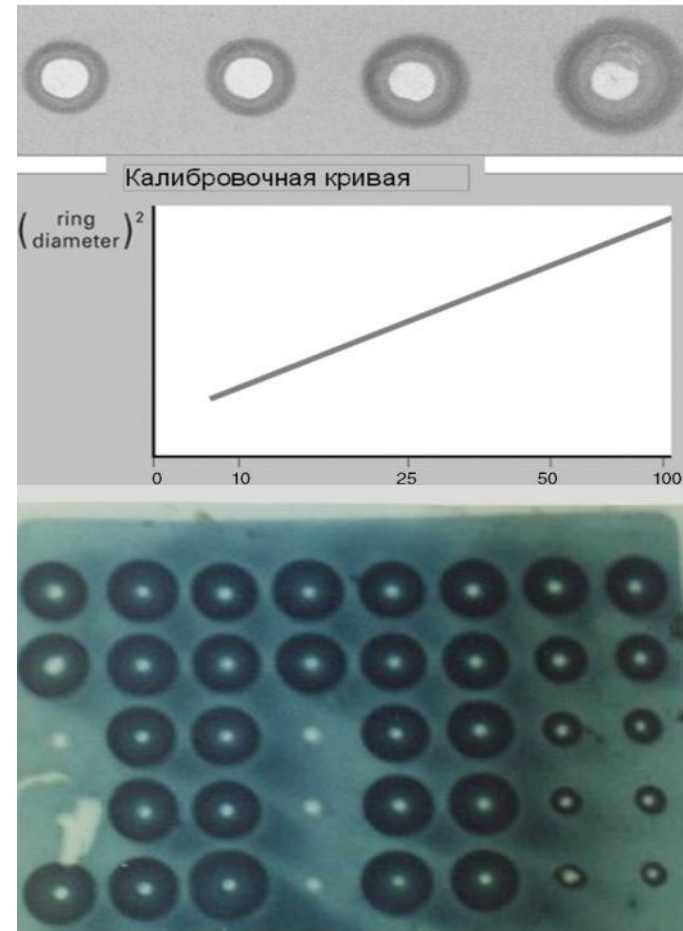
Двойная радиальная иммунодиффузия представляет собой прежде всего метод количественного анализа. Ее применяют для определения количества антигена в жидкостях (сыворотка крови, цереброспинальная жидкость, экстракты тканей). Ее также применяют для проверки чистоты препаратов, при получении антисывороток животных и оценке эффективности иммунизации.

Радиальная иммунодиффузия по Манчини

- 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.

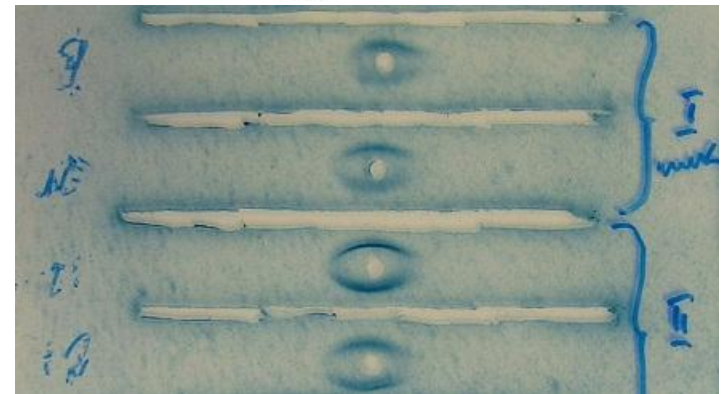
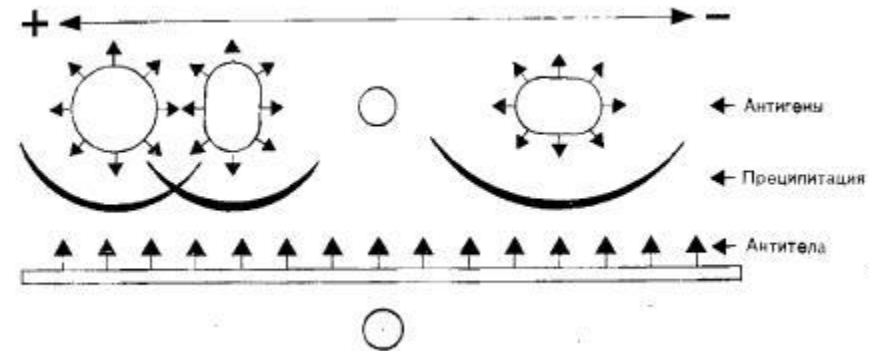
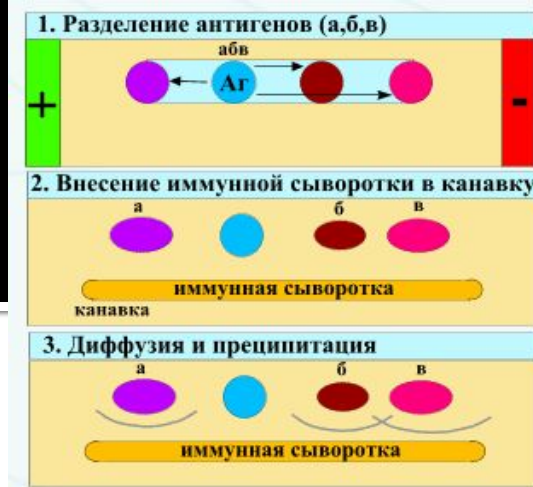
- Реакцию используют для определения в сыворотке крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента и др.

Зависимость диаметра кольца преципитации от количества аг



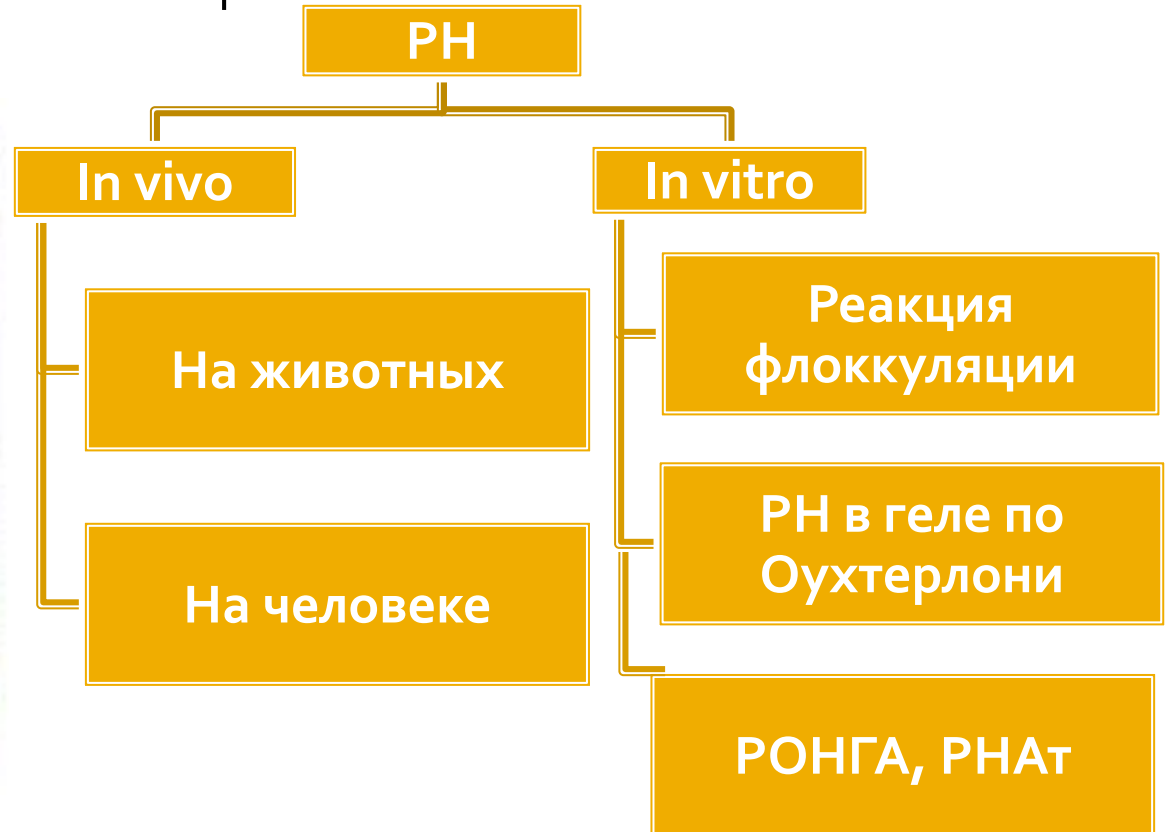
Иммуноэлектрофорез

- Иммуноэлектрофоретический анализ представляет собой сочетание электрофореза в агаровом геле с иммунодиффузией.
- Принцип ИЭФ состоит в следующем:
- Вначале проводят электрофоретическое разделение белков в забуференном геле агара;
- после разделения в канавку, которая идет в направлении миграции белков, вносят преципитирующую иммунную сыворотку.
- АГ и АС диффундируют в геле навстречу друг другу, и в месте их взаимодействия возникают дугообразные линии преципитации, число, положение и форма которых дают представление о составе исходной смеси антигенов.



Реакция нейтрализации токсина

Тип иммунологической реакции, основанный на способности специфических антител – **антитоксинов** подавлять биологическую активность экзотоксинов бактерий при образовании комплекса аг-ат.



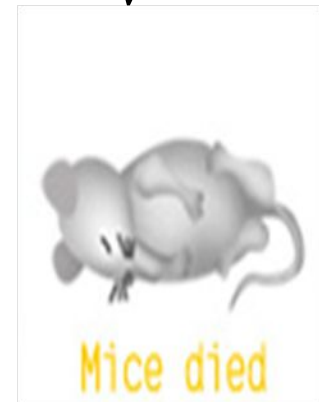
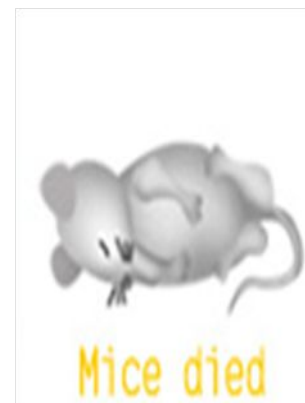
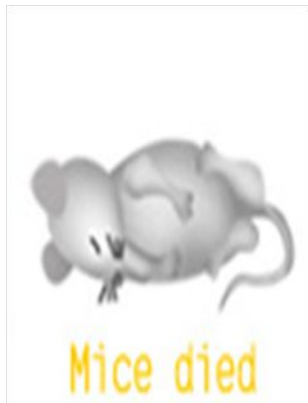
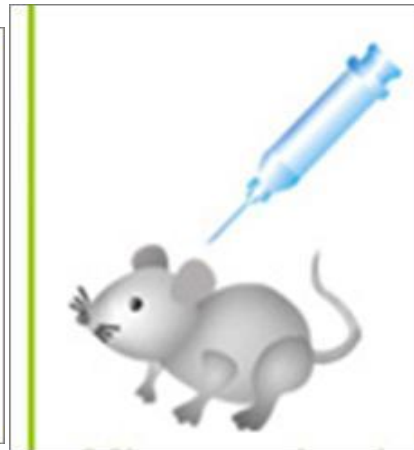
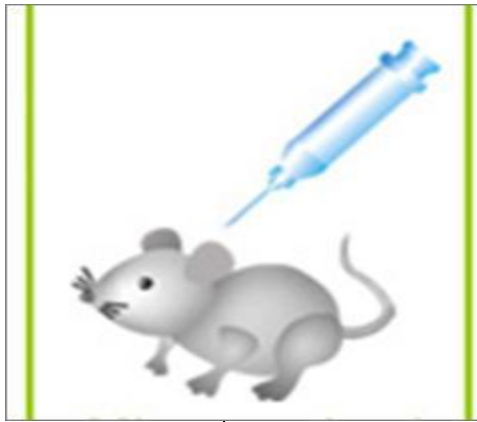
Реакция нейтрализации токсина *in vivo*

Контрольная группа
(Вводят исслед.
материал)

Исслед. материал+ ат
против токсина А

Исслед. материал+ ат
против токсина В

Исслед. материал+ ат
против токсина Е



Реакция нейтрализации токсина *in vivo*



Проба Шика проводится для оценки состояния антитоксического иммунитета;

внутрикожно вводят минимальное количество токсина:

- При наличии антител против дифтерийного токсина видимых изменений не будет
- При отсутствии антитоксического иммунитета наблюдается воспалительная реакция

Реакция нейтрализации токсина *in vitro*

Реакция флоккуляции

- Реакция флоккуляции основана на способности токсина или анатоксина при смешивании в определенных соотношениях с антитоксической сывороткой образовывать помутнение — **инициальную флоккуляцию**
- Механизм реакции флоккуляции аналогичен таковому реакции преципитации.
- Применяется для титрования антитоксических сывороток и определения типа токсина
- Специфическую активность или силу анатоксина определяют в реакции флоккуляции в так называемых единицах флоккуляции — (Lf).
- Силу антитоксической сыворотки выражают в международных антитоксических единицах — **МЕ**
- Одна антигенная единица анатоксина обозначается Limes flocculationis (Lf — порог флоккуляции), это то количество анатоксина, которое вступает в реакцию флоккуляции с одной единицей антитоксина.
- То есть, *условие инициальной флоккуляции*: $nLF = n ME$

Реакция флоккуляции (форма протокола)

Ингредиенты, мл	№ пробирки						
	1	2	3	4	5	6	7
Токсин, содержащий 20 Lf в 1 мл	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Исследуемая сыворотка	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	—	0,6

Инкубация при 45°C в течение 30 мин

Результаты по «инициальной» флоккуляции

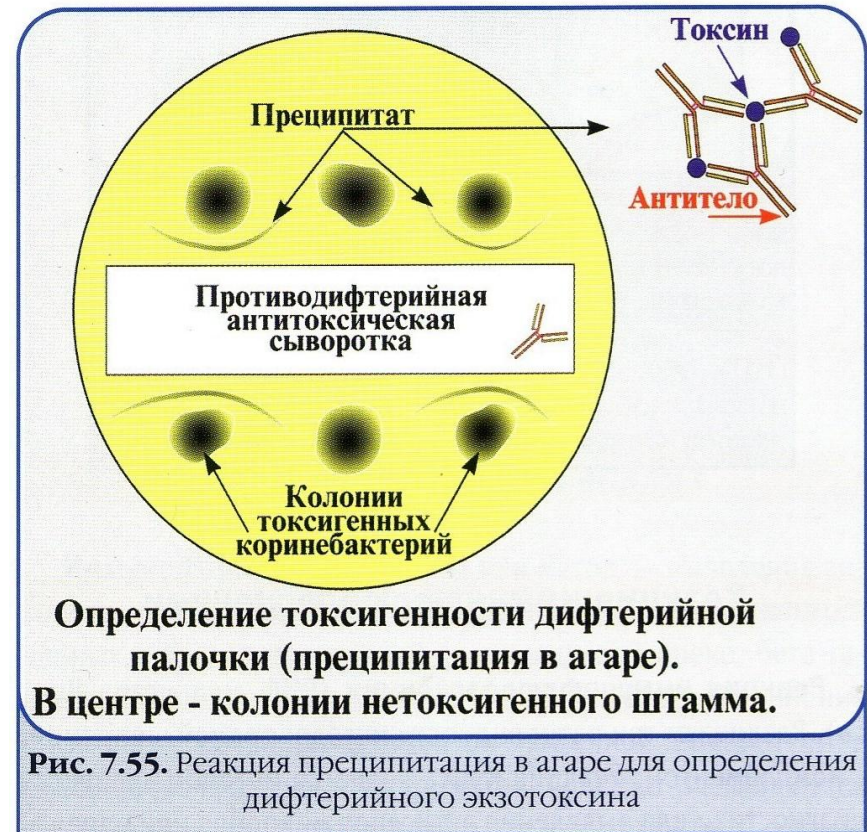


- В данном опыте помутнение — инициальная флоккуляция — происходит в пробирке №3
- Каждая пробирка содержит $2 \times 20 = 40$ Lf токсина
- Поскольку *условие инициальной флоккуляции*: $nLF = n ME$, то в данной пробирке 40 ME сыворотки
- Если 0,4 мл сыворотки содержат 40 ME, то 1 мл — 100 ME

Реакция нейтрализации токсина *in vitro*

Реакция преципитации в геле

- Штаммы возбудителя дифтерии — *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 с помощью реакции преципитации в агаре
- Главное преимущество — отсутствие необходимости выделения чистой культуры



Реакция нейтрализации токсина in vitro. РНГА

Ингредиенты, мл	Лунки					
	1	2	3	4	5	6
Исследуемая сыворотка	0,5	0,5	0,5			
Нормальная сыворотка				0,5	0,5	0,5
Диагностический эритроцитарный агглютинин тип А	0,1			0,1		
тип В		0,1			0,1	
тип Е			0,1			0,1
Инкубация при 37°C - 1 час						
Результат:	-	-	+	-	-	-
Наблюдаемая картина						

Учет.

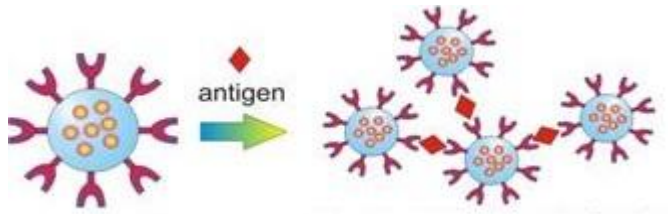
- В положительном случае эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем (зонтик), в отрицательном - оседают в виде пуговки или колечка.

Вывод: В сыворотке больного обнаружен ботулотоксин тип Е.

- Учет результатов РНГА, поставленной с целью обнаружения ботулотоксина.
- Возбудитель ботулизма - Clostridium botulinum вырабатывает токсины семи сероваров (А, В, С, D, Е, F, G), однако чаще других встречаются серовары А, В, Е.
- Все токсины отличаются по антигенным свойствам и могут быть дифференцированы в реакциях типоспецифическими сыворотками.
- Для этой цели можно поставить реакцию пассивной (непрямой) гемагглютинации с сывороткой больного, в которой предполагается наличие токсина, и эритроцитами, нагруженными антителами антитоксических противоботулинических сывороток типов А, В, Е.
- Контролем служит нормальная сыворотка.

Реакция нейтрализации токсина in vitro. РОНГА, РНАТ

- **РОНГА** - применяют антительный эритроцитарный диагностикум - эритроциты, на которых адсорбированы антитела. Антиген –дифтерийный токсин



«+»

«-»

Реакция нейтрализации токсина *in vitro*. РОНГА, РНАТ

- **РНАТ** позволяет быстро выявить неизвестный антиген.

- **Компоненты реакции:**

- Эритроцитарный диагностикум с дифтерийным анатоксином
- Стандартная противодифтерийная сыворотка (антитела против дифтерийного токсина)



- Исследуемая сыворотка ?

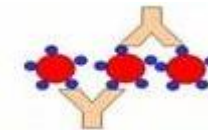
Принцип метода



- **Результаты:**



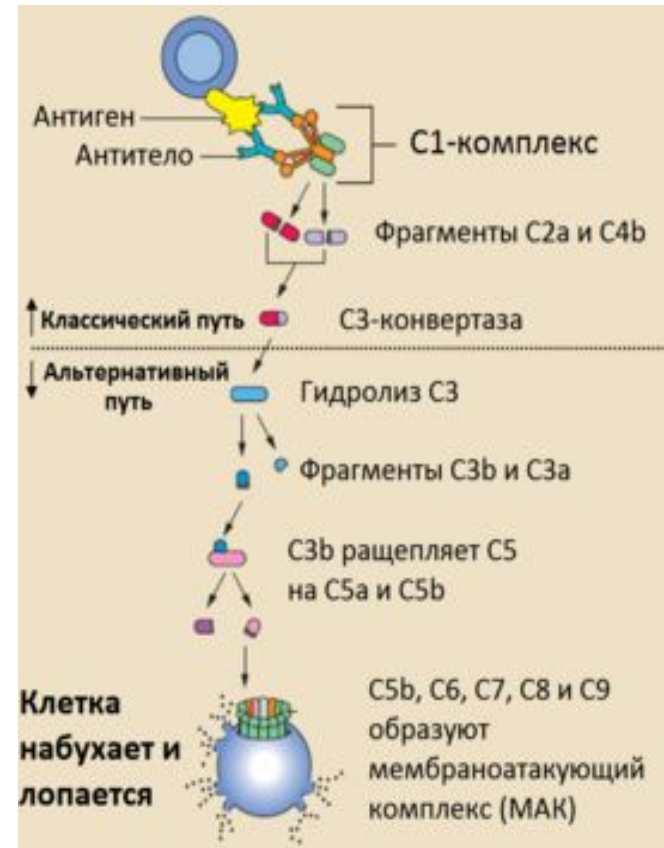
«-» «+»



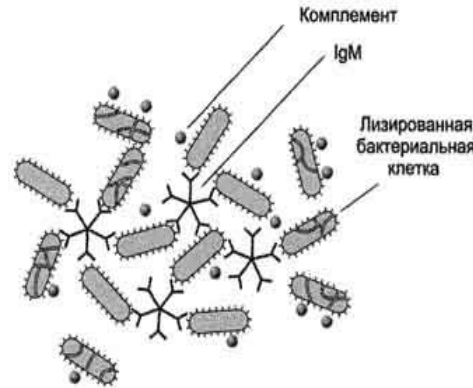
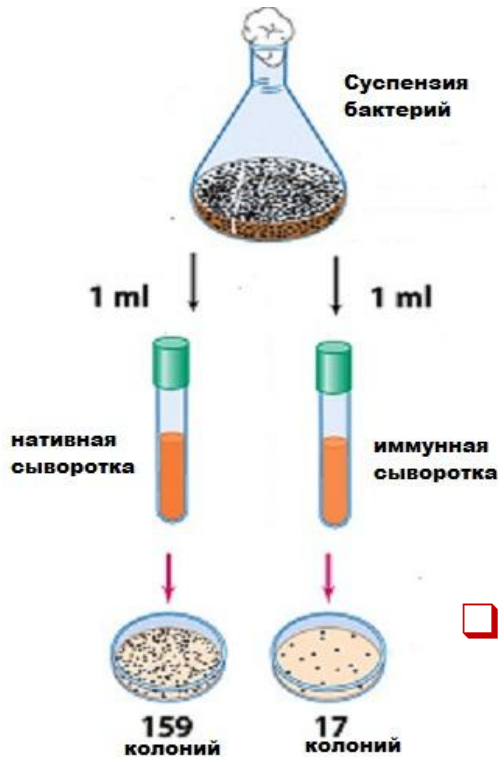
- При отсутствии антигена в исследуемой сыворотке диагностикум взаимодействует со стандартной сывороткой и наблюдаем гемагглютинацию
- При наличии антигена в исследуемой сыворотке антитела в нашей диагностической сыворотке будут нейтрализованы и агглютинации эритроцитов не будет

Реакции с участием комплемента

- Сущность этих реакций состоит в том, что при взаимодействии специфических антител с антигенами клеток (эритроцитов, бактерий), на их поверхности образуется комплекс антиген-антитело, который активирует комплемент по классическому пути, вследствие чего наступает лизис этих клеток.








Реакция иммунного бактериолиза



- ❑ Нативная сыворотка обладает бактерицидной активностью,
- ❑ В иммунной сыворотке в присутствии специфических антител-бактериолизина и комплемента лизис бактерий идет существенно интенсивнее
- ❑ Под воздействием бактериолизина в присутствии комплемента микробы теряют подвижность, меняют форму (набухают), распадаются и, наконец, совсем растворяются.
- ❑ Реакция бактериолиза применяется с целью идентификации холерных вибрионов (р. иммобилизации вибрионов холерными сыворотками) и определения бактериолизина в сыворотке; при сифилисе (р. иммобилизации трепонем), при лептоспирозе (р. агглютинации-лизиса).

Реакция иммунного гемолиза

Ингредиенты, мл	Пробирки				
	опыт	контроль			
	1	2	3	4	5
Изотонический раствор	—	0,5	0,5	1,0	—
Гемолизин в тройном титре	0,5	0,5	—	—	0,5
3% взвесь эритроцитов барана	0,5	0,5	0,5	0,5	—
3% взвесь чужеродных эритроцитов	—	—	—	—	0,5
Комплемент 1:10	0,5	—	0,5	—	0,5

Результат					
-----------	------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

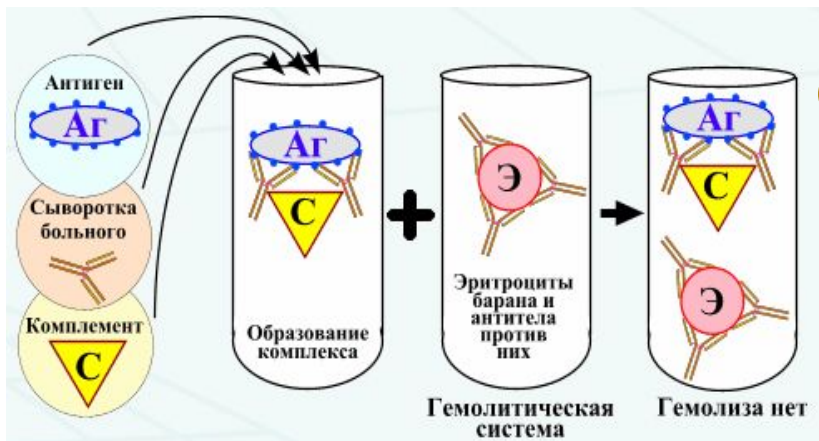
- Как видно из результатов опыта, гемолиз происходит только в присутствии аг (эритроциты барана), соответствующих антител и комплемента
- В отсутствии одного из ингредиентов гемолиза не наблюдается

Реакция связывания комплемента (РСК)

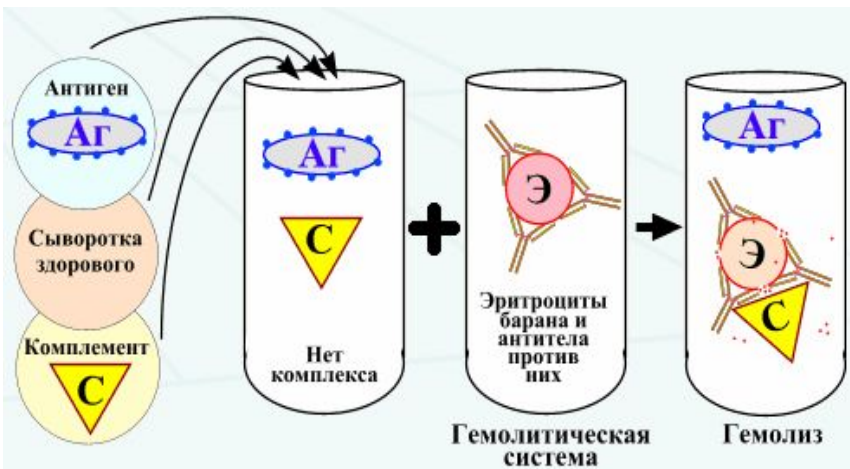
- РСК - сложная серологическая реакция. В ней участвуют комплемент и две системы антиген - антитело.
- **Первая система** – *специфическая* : *антиген, антитело (испытываемая сыворотка) и комплемент* (сыворотка морских свинок)
- **Вторая система** – неспецифическая индикаторная – *гемолитическая* (эритроциты барана с гемолитической сывороткой, лишенной собственной активности комплемента).

Реакция связывания комплемента (РСК)

- ❖ 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.



- ❖ При соответствии друг другу **антигенов** и **антител** они образуют **иммунный комплекс**, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется **комплемент (С)**, таким образом происходит связывание комплемента комплексом **антиген - антитело**, и тогда во 2-й фазе гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет (реакция положительная)



- ❖ Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исследуемом образце нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит - антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз (реакция отрицательная).

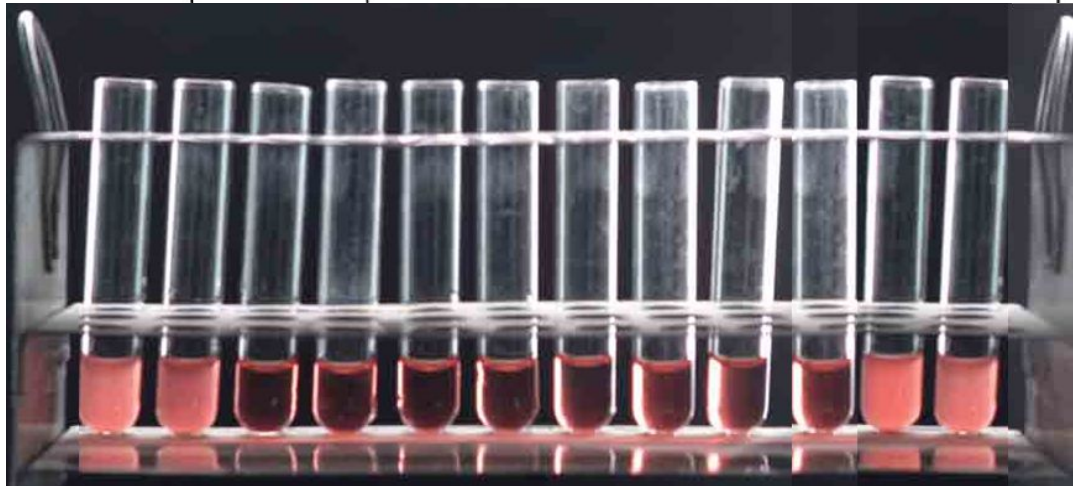


РСК. Титрование комплемента

Ингредиенты, мл	Пробирки											
	опыт										контроль	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	гемолитической системы	эритроцитов
Изотонический раствор	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5
Комплемент 1:10	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	—	0,5
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—
3% взвесь эритроцитов барана	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,5

Пробирки тщательно встряхивают и инкубируют при 37 °С 1 ч

Результат	Нет гемолиза	Гемолиз	Нет гемолиза
-----------	--------------	---------	--------------



В приведенном примере титр комплемента в разведении 1:10 равен 0,15 мл.

В опыте активность комплемента может снизиться за счет неспецифической адсорбции его другими компонентами реакции, поэтому для опыта количество комплемента увеличивают: берут следующую за титром дозу. Это - рабочая доза.

В приведенном примере она равна 0,2 мл комплемента в разведении 1:10.

Так как все компоненты, участвующие в РСК, должны быть взяты в равных объемах (в нашем примере он равен 0,5 мл), необходимо к рабочей дозе комплемента (0,2 мл 1:10) добавить 0,3 мл изотонического раствора

Для приготовления гемолитической системы смешивают равные объемы гемолитической сыворотки и взвеси эритроцитов.

РСК. Основной опыт



1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 K1 K2 K3 K4

K1 – контроль сыворотки (сыворотка +
комплемент+ГС)

K2 – контроль антигена
(антиген+комплемент+ГС)

K3- контроль гемолитической системы (2мл
ГС+физраствор)

K4 – контроль комплемента (2 мл ГС+ 0,5мл
комплемента)

Специфическая система:

1. Антитела (сыворотка в различных разведениях).
 2. Антиген - диагностикум
 3. Комплемент по 0,5 мл
- Смешивают, инкубируют 60 минут при 37° С.

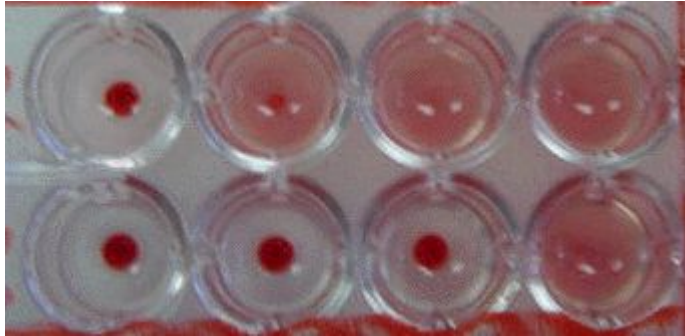
Индикаторная система Добавляют по 2 мл гемолитической системы (ГС)
Смешивают, инкубируют 30 минут при 37°С.

Учитывают результаты реакции.

В нашем примере результат положительный.

Титр сыворотки 1:80

Микрореакция связывания комплемента (МРСК)



- Микрореакция ставится по тому же принципу, что и РСК, но с меньшими объемами в микроплатах

- Пример МРСК с парными сыворотками
- В сыворотке, взятой через 5 дней после первого исследования титр выше, что свидетельствует о развитии иммунного ответа на данный антиген

Реакция радиального гемолиза (РРГ)



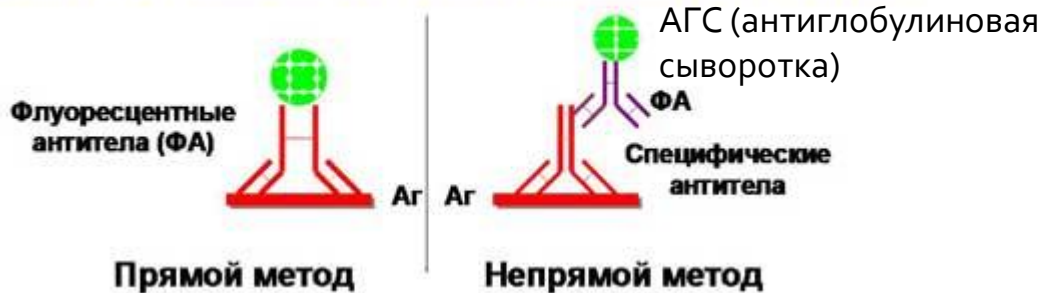
- ❑ Реакцию радиального гемолиза (РРГ) ставят в лунках геля из агара, содержащего эритроциты барана и комплемент.
- ❑ После внесения в лунки геля гемолитической сыворотки (антител против эритроцитов барана) вокруг них, в результате радиальной диффузии антител, образуется зона гемолиза.
- ❑ Таким образом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

Реакция иммунофлюоресценции (метод Кунса)

- **Иммунофлюоресцентный метод (РИФ, реакция иммунофлюоресценции, реакция Кунса)** - *качественный метод* выявления специфических Аг с помощью Ат, конъюгированных с флюорохромом. Обладает высокой чувствительностью и специфичностью.
- **Применяется для экспресс-диагностики** инфекционных заболеваний (идентификация возбудителя в исследуемом материале), а также для определения Ат и поверхностных рецепторов и маркеров лейкоцитов (иммунофенотипирование) и др. клеток.
- Обнаружение бактериальных и вирусных антигенов в инфекционных материалах, тканях животных и культурах клеток при помощи флюоресцирующих антител (сывороток) получило широкое применение в диагностической практике.
- Приготовление флюоресцирующих сывороток основано на способности некоторых флюорохромов (например, изотиоцианата флюоресцеина) вступать в химическую связь с сывороточными белками, не нарушая их иммунологической специфичности.

Реакция иммунофлюоресценции (метод Кунса)

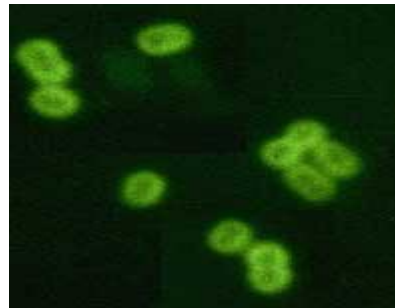
Схема Реакции иммунофлюоресценции (РИФ) (Кунса)



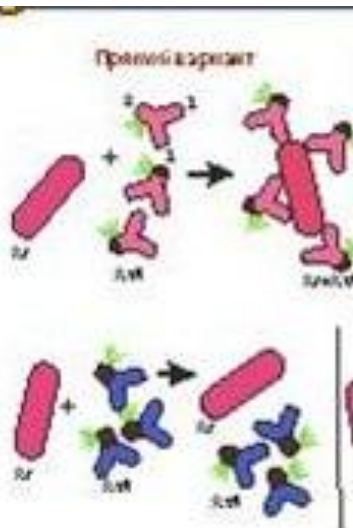
- Различают две разновидности метода: прямой, непрямой.

- Прямой метод РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными флуорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа.

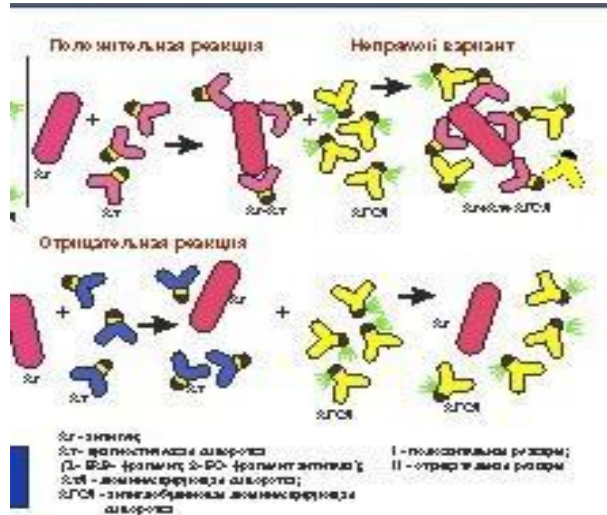
- Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.



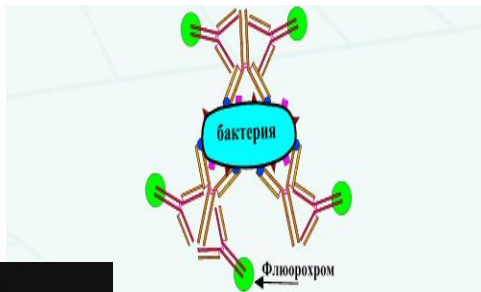
Пневмококки



Реакция иммунофлюоресценции (метод Кунса)

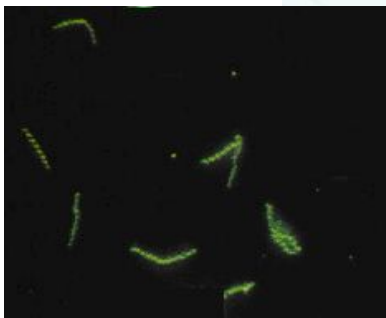


- Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген - антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флуорохромом.
- Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают специфическими антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки.
- Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флуорохромами.



В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флуорохромом.

- Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе..



Treponema pallidum

Иммуноферментный анализ (англ. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

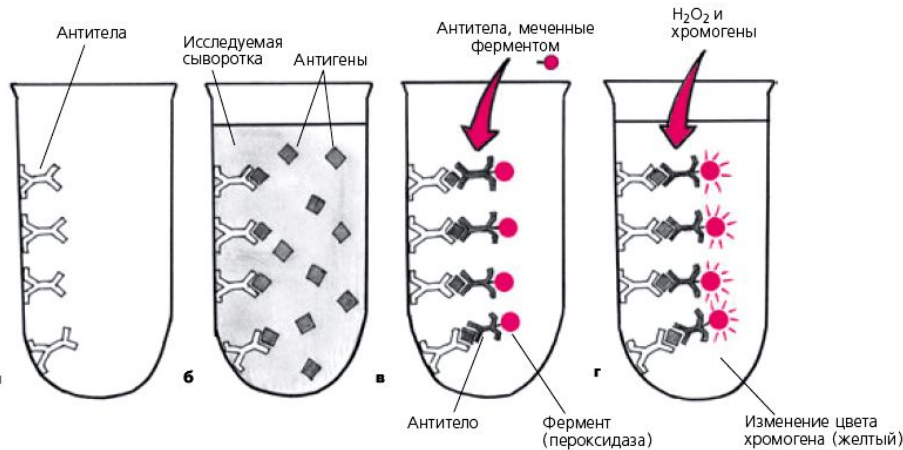


С помощью **ИФА** определяют наличие антигенов возбудителей различных инфекций, но значительно чаще метод ИФА применяется для определения наличия антител классов **IgA, IgM, IgG** к антигенам различных возбудителей болезней.

- ❑ Лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит **специфическая реакция антиген-антитело**.
- ❑ Метод основан на использовании антител с использованием фермента в качестве **метки**.

Иммуноферментный анализ

Прямой твердофазный ИФА



Фотография микропланшета

- ❑ При проведении этого варианта ИФА высокоспецифичные поли- или моноклональные антитела, адсорбированные на твердой фазе, инкубируют с исследуемым образцом.
- ❑ После процедуры отмывания в лунки вносят меченные ферментом антитела (конъюгат)
- ❑ Связанный с антителом фермент обнаруживают по изменению цвета раствора после добавления субстрата (перекись водорода) и хромогена



Результат ИФА.

Желтый цвет раствора в лунке является положительным результатом.

Иммуноферментный анализ

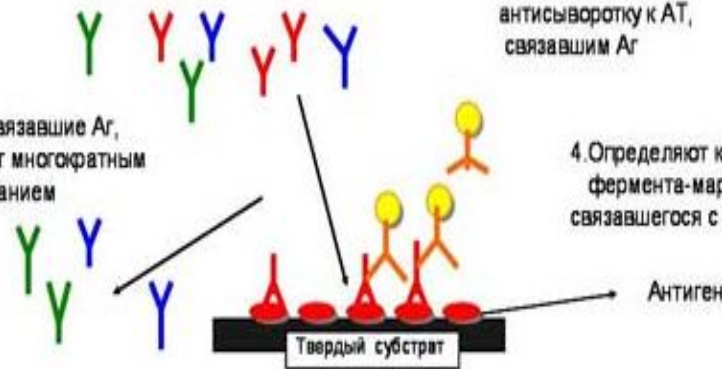
Непрямой твердофазный ИФА

1. Сыворотку инкубируют с Ag, фиксированным на твердом субстрате (пластиковая микропланшетка)

3. Вносят меченую ферментом антисыворотку к АТ, связавшим Ag

2. АТ, не связавшие Ag, удаляют многократным промыванием

4. Определяют количество фермента-маркера, связавшегося с АТ

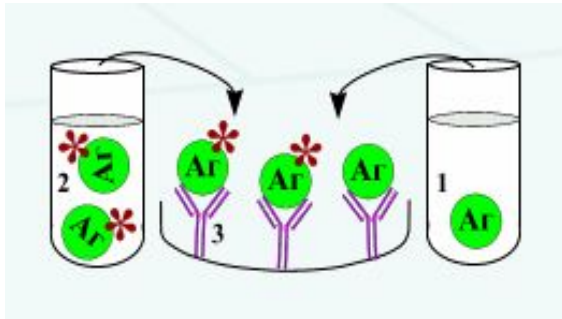


- ❑ В зависимости от цели анализа используют разные антиглобулиновые реагенты, выявляющие антитела всех изотипов, либо специфичные к отдельным классам и подклассам иммуноглобулинов.
- ❑ Основное достоинство метода состоит в универсальности конъюгата. Один и тот же конъюгат может служить для выявления антител человека к самым разным антигенам в любых образцах.

- ❑ Этот вариант ИФА используют обычно для выявления специфических антител.
- ❑ В лунках панелей адсорбируют стандартный антиген и инкубируют с образцами сыворотки или другого биологического материала, полученного от больного (спинномозговая жидкость, слюна и др.).
- ❑ Специфические антитела, связавшиеся с антигеном на твердой фазе, выявляют с помощью антиглобулинового конъюгата (антиглобулиновая сыворотка с ферментной меткой).

Иммуноферментный анализ

Конкурентный ИФА



Искомый антиген(1)
и меченый ферментом антиген(2)
конкурируют друг с другом за антитела (3),
сорбированные на твердой фазе.

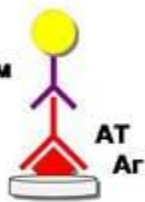
- ❑ Этот вариант анализа основан на конкуренции меченых (конъюгат) и немеченых (исследуемых) антител за связывание с антигеном, адсорбированным на твердой фазе.
- ❑ Количество фермента, присоединившегося к твердой фазе, уменьшится пропорционально содержанию в смеси свободных антител.
- ❑ Для определения антигена используется тот же вариант, но в этом случае искомый антиген конкурирует с меченым, стандартным антигеном за связывание с антителами, иммобилизованными на поверхности твердой фазы

Иммуноферментный анализ

Общая схема

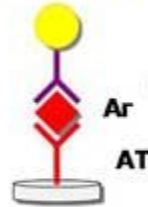
Иммуноферментный анализ (ИФА)

Антитела к АТ,
меченные ферментом



Выявление антител

Антитела к Аг,
меченные ферментом



Выявление антигена



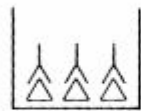
Анализатор иммуноферментный
полуавтоматический

А



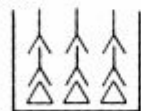
Антиген, сорбированный
на твердой подложке

Добавление исследуемой
пробы, содержащей антитела



Инкубация

Отмывание от несвязанных
антител, добавление меченых
антител к иммуноглобулинам



Инкубация

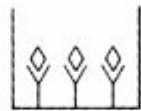
Отмывание от несвязанных меченых анти-
тел и добавление субстрата фермента

Б



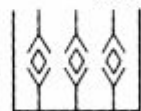
Антитело, сорбированное
на твердой подложке

Добавление исследуемой
пробы, содержащей антиген



Инкубация

Отмывание от несвязанного
антигена, добавление меченых
антител к этому антигену

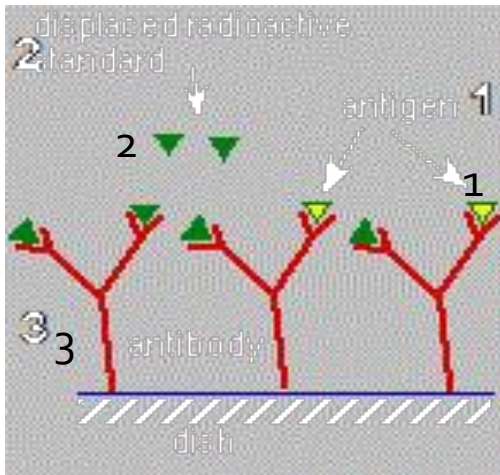


Инкубация



Иммуноферментный автоматический
анализатор

Радиоиммунологический анализ



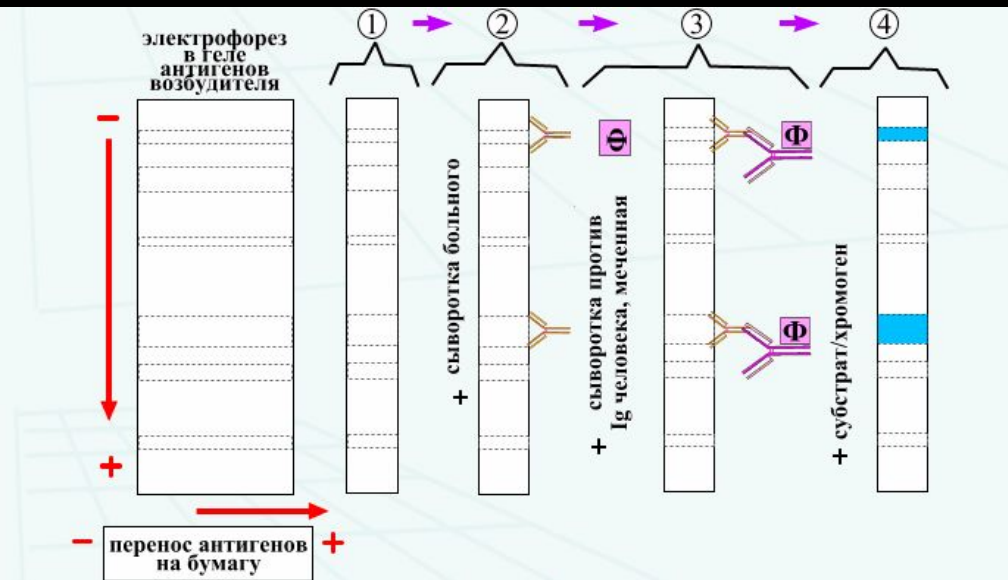
Радиоиммунологический анализ:

- 1 - антиген;
- 2 – стандартный антиген с радиоактивной меткой;
- 3 - антитело.

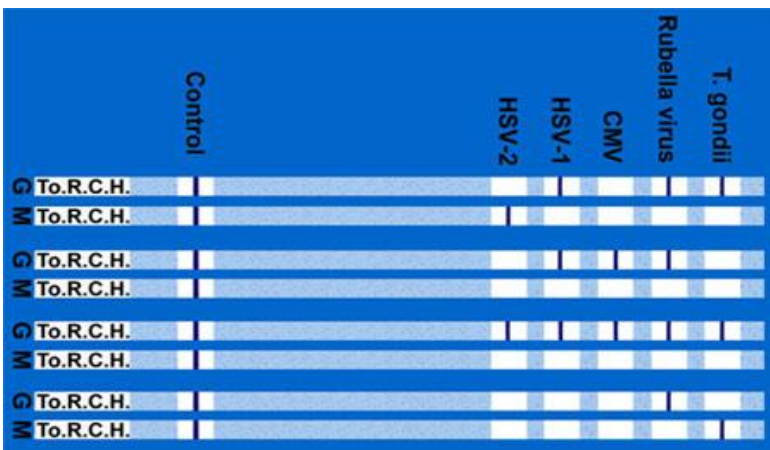
РИА - один из самых чувствительных методов иммунодиагностики. Его применяют для выявления антигена вируса гепатита В, у больных вирусным гепатитом.

- **Принцип.** В основе РИА лежит феномен конкуренции: связывание антител с антигеном, меченным радиоактивным изотопом, подавляется в присутствии немеченного антигена. Методика РИА проста и включает следующие основные этапы:
- **А.** К раствору антител добавляют меченный антиген и пробу (содержащую неизвестное количество немеченного антигена). Концентрацию антител в реакционной смеси подбирают так, чтобы число мест связывания было намного меньше общего числа антигенов. Концентрация меченного антигена должна превышать максимальную возможную концентрацию антигена в пробе.
- **Б.** Реакционную смесь инкубируют при определенной температуре. Меченный и немеченный антигены конкурентно связываются с антителами, при этом образуются иммунные комплексы, содержащие либо меченный, либо немеченный антиген. Таким образом, к концу инкубации в реакционной смеси присутствуют меченные и немеченные иммунные комплексы, а также свободные меченные и немеченные антигены. Количество меченных иммунных комплексов обратно пропорционально количеству немеченного антигена в пробе.
- **В.** Чтобы оценить количество меченных иммунных комплексов, их отделяют от свободного меченного антигена. Иммунные комплексы, имеющие большую молекулярную массу, чем свободные антигены, осаждают центрифугированием и измеряют радиоактивность осадка.
- **Г.** Определяют концентрацию антигена в пробе по калибровочной кривой.

Иммуноблоттинг



- ❑ 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 (стрипы) 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.



Пример: Лайн-блот для диагностики TORCH-инфекций (Токсоплазмоз, Краснуха, Цитомегаловирус, ВПГ 1 и ВПГ 2)

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ