



СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

СПбГУ
к.б.н. Орлова О.Г.

Сложности диагностики

получение **ложноотрицательного результата** :

- неправильное взятие материала,
- несвоевременная доставки его в лабораторию,
- несовершенная методика бактериологического исследования
- угнетение жизнеспособности или гибели возбудителя под действием проводимого лечения (если материал берется не в первые дни заболевания, а уже на фоне этиотропной терапии)

Сложности диагностики

получение ***ложноположительного результата*** :

- контаминация материала
- бактерионосительство
- выделение условно-патогенных микроорганизмов

Сложности диагностики

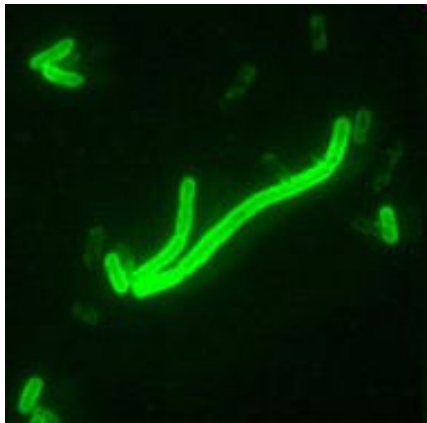
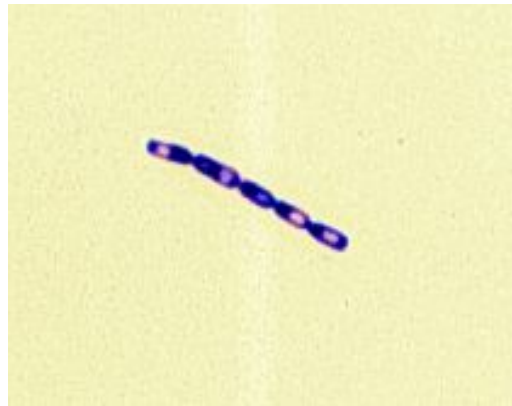
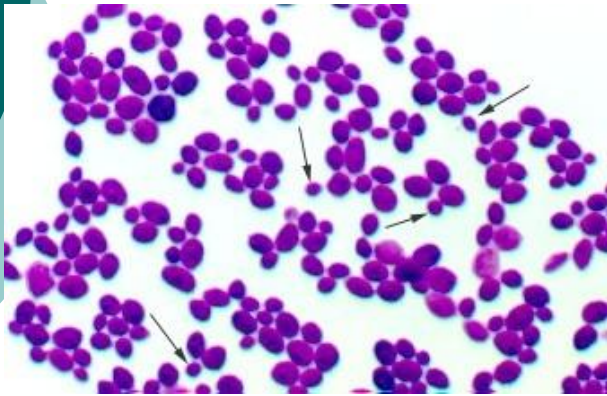
Выделенный микроорганизм **является** возбудителем, если:

- подтверждена триада Коха
- многократность обнаружения данных видов,
- массивность роста бактерий в посевах на плотные питательные среды,
- антигенная и фаговаровая однородность выделяемых субкультур
- диагностического нарастания титров гомологичных антител при серологических исследованиях.

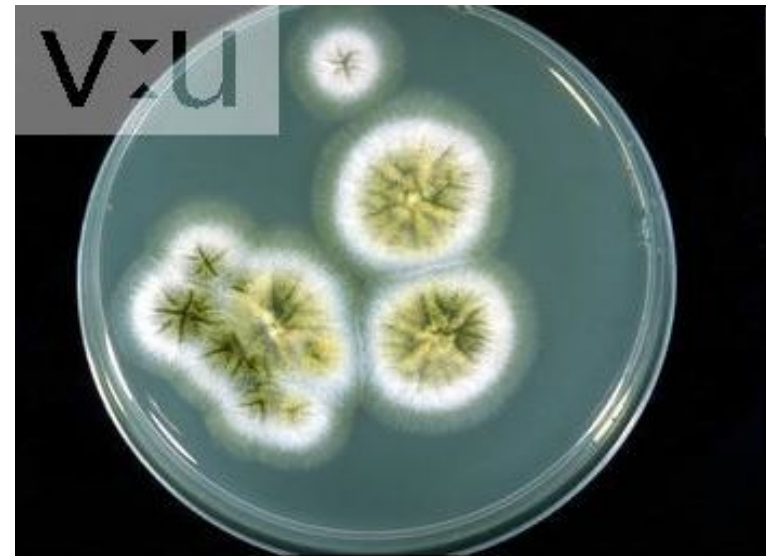
Микробиологические методы диагностики делятся на:

- методы **прямого** обнаружения возбудителя в организме больного — бактериоскопическое и бактериологическое исследования;
- методы **косвенного** доказательства наличия возбудителя в организме больного — иммунологические исследования, направленные на обнаружение специфических антигенов в инфицированном материале или антител в сыворотке крови и различных секретах организма больного.

Бактериоскопическое исследование



Бактериологический метод

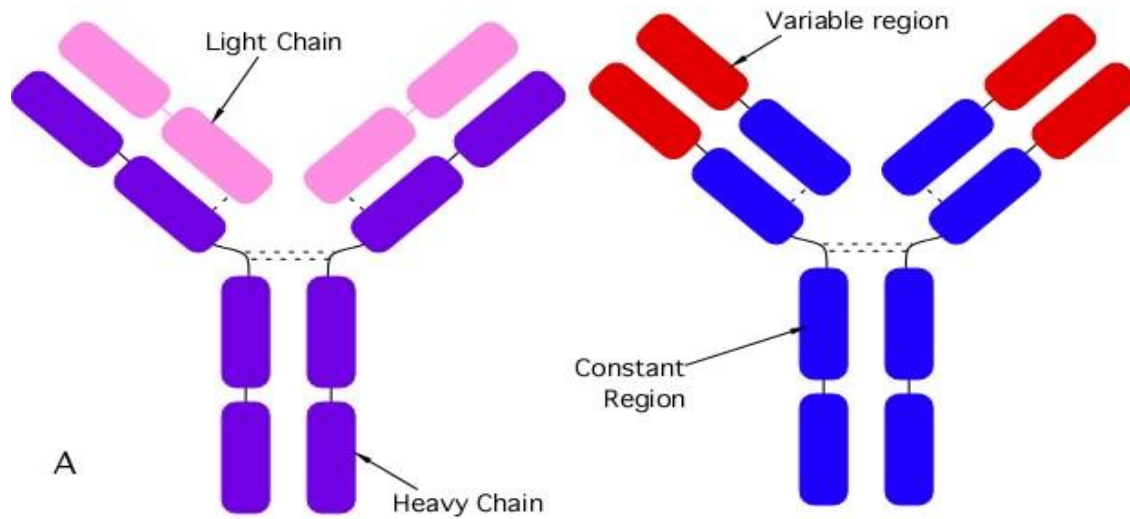




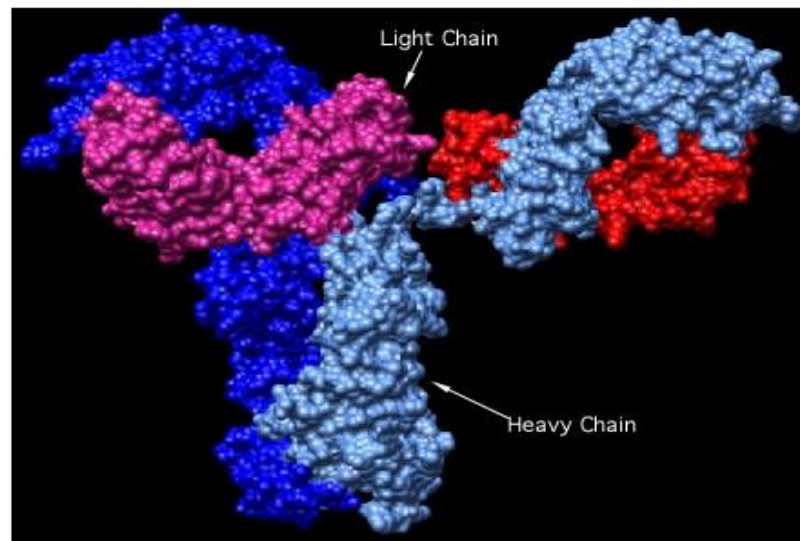
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ, СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (лат. serum сыворотка + logos учение) –

- методы изучения **определенных антител** в сыворотке крови больных,
 - выявления **антигенов микроорганизмов или тканей** с целью их идентификации,
- основанные на реакциях иммунитета.

Строение антител (Ig)

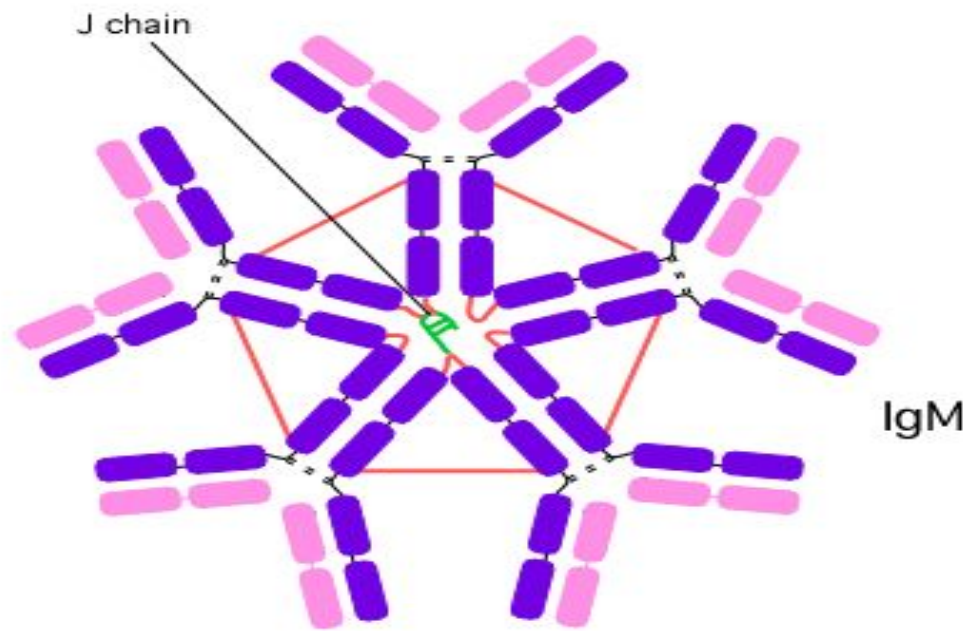
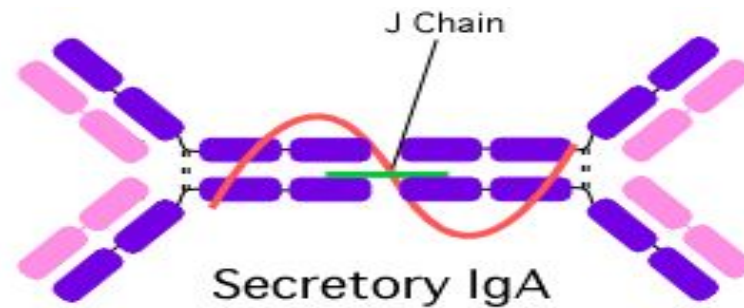
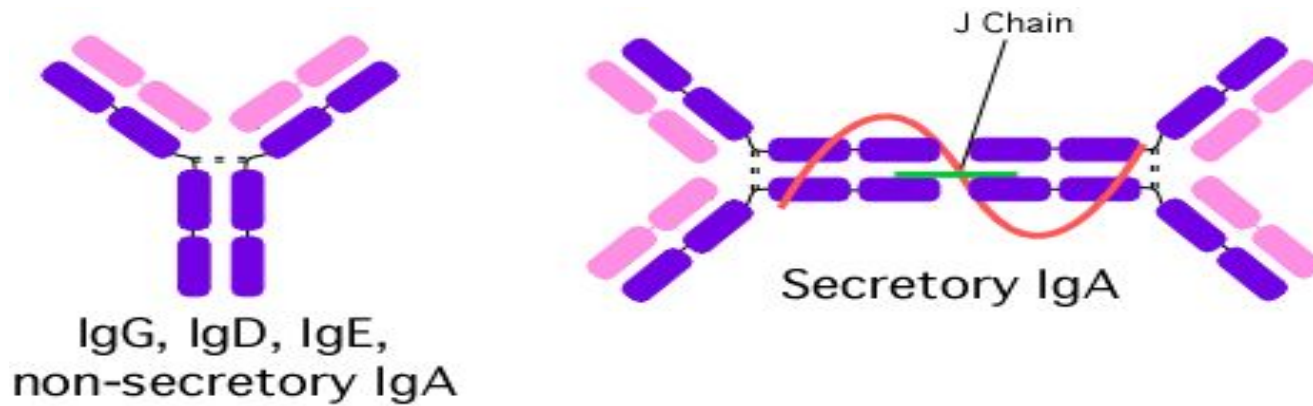



A



B.

Строение и классы ИММУНОГЛОБУЛИНОВ





**В основе иммунологических
реакций лежит специфическое
взаимодействие антигена с
антителом.**

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

- При определении **антигена** - минимальная концентрация вещества, определяемая данной тест-системой.
- При определении **антител** – процент образцов, давших положительный результат в данной тест-системе, от общего количества обследованных образцов, содержащих выявляемые антитела.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Процент образцов, давших отрицательный результат в данной тест-системе, от общего количества обследованных образцов, действительно не содержащих выявляемый маркер.

ППЗ и ОПЗ

- **Положительное прогнозируемое значение (ППЗ)** – вероятность того, что пациент с положительным результатом анализа действительно болен (инфицирован).
- **Отрицательное прогнозируемое значение (ОПЗ)** – вероятность того, что пациент с отрицательным результатом анализа действительно здоров (не инфицирован).

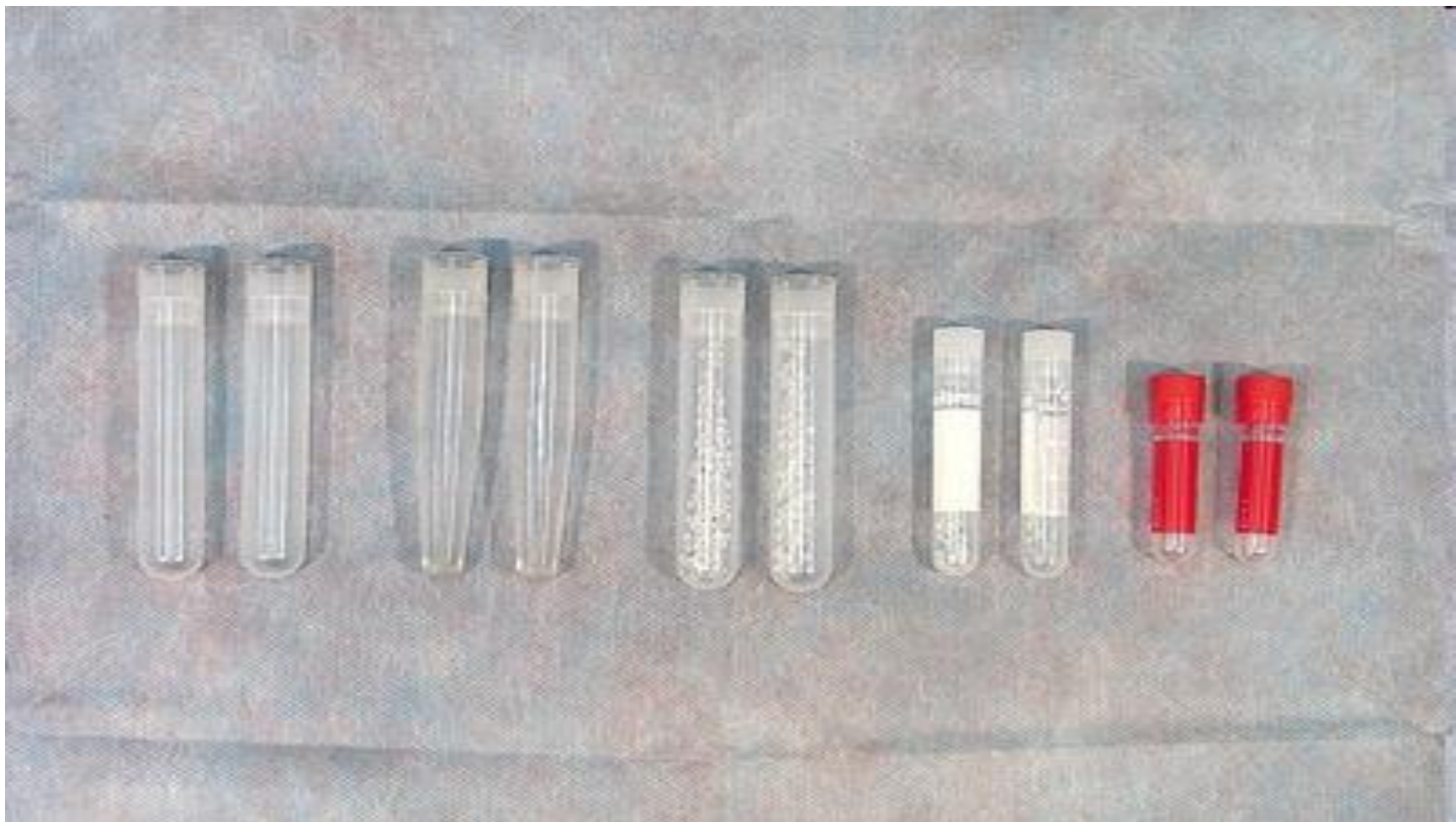
ЗАВИСИМОСТЬ ППЗ И ОПЗ ОТ РАСПРОСТРАНЁННОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Распространён- ность заболевания	Чувствительность и специфичность 95 %		Чувствительность и специфичность 98 %		Чувствительность и специфичность 99 %	
	ППЗ	ОПЗ	ППЗ	ОПЗ	ППЗ	ОПЗ
(%)						
1	16	99,9	33	99,9	50	99,9
2	27,9	99,9	50	99,9	66,9	99,9
5	50	99,7	72	99,9	83,9	99,9
10	67,9	99,4	84	99,8	91,7	99,9
20	82,6	98,7	91	99,5	96,1	99,7
50	95	95	98	98	99	99
75	98,3	83,7	99	94	99,7	97
100	100		100		100	

Сыворотка крови



Пробирки - контейнеры для получения сыворотки крови



Варианты иммунологических реакций:

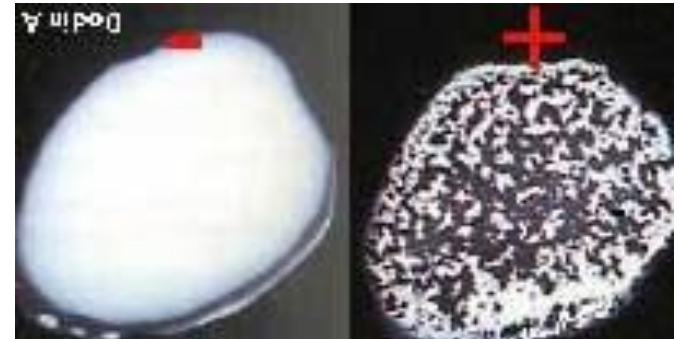
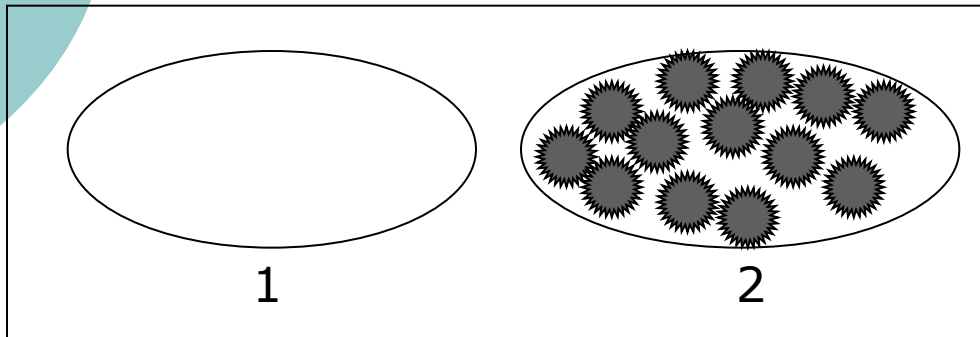
- **Прямые**, основаны на взаимодействии антигена с антителом (агглютинация, преципитация)
- **Опосредованные** реакции или не прямые, взаимодействие антигена и антитела через посредника (реакция не прямой гемагглютинации, реакция связывания компонента)
- Реакции **с использованием меченых** антител или антигенов (иммуноферментный, радиоиммунный анализ, метод флуоресцирующих антител).

Реакция агглютинации, варианты:

- **Ориентировочная РА**
- **Развернутая РА**
- **Реакция Кастеллани**
- **РНГА**
- **РЛА**
- **Реакция Кумбса**
- **Ко-агглютинации**

Реакция агглютинации (ориентировочная, для идентификации микроорганизма)

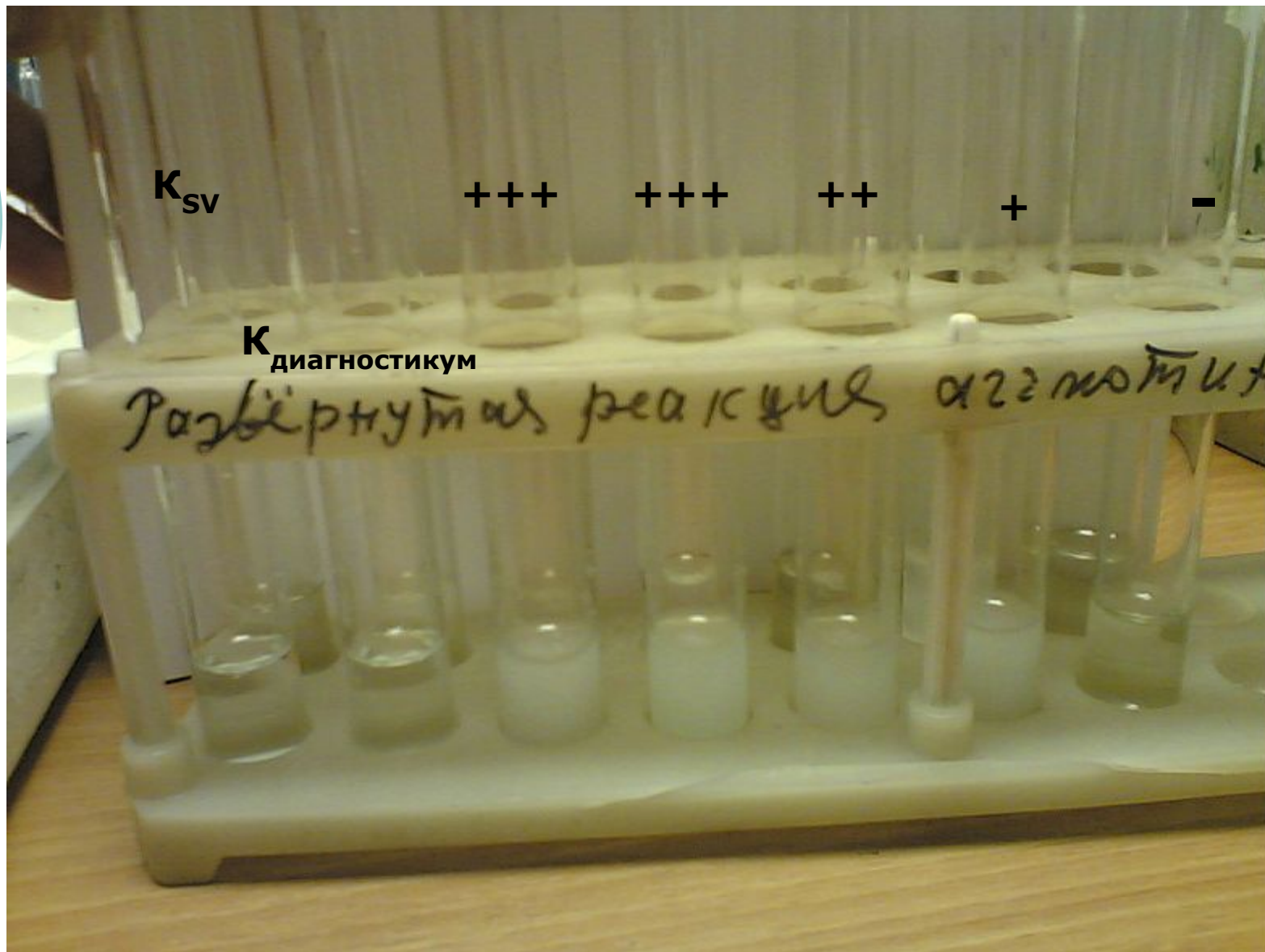
1. Физ. р-р + культура микроорганизмов
2. Сыворотка (1:100) + культура микроорганизмов



1. Отсутствие агглютинации
2. Наличие агглютинации

Возможна спонтанная агглютинация – R-формы бактерий

Развернутая реакция агглютинации



А. Кастеллани

метод Кастеллани (А. Castellani, р. 1878 г., итал. врач) — метод извлечения противобактериальных антител из иммунной сыворотки крови путем их сорбции на убитых бактериях соответствующего штамма (удаление АТ, реагирующих с групповыми АГ); применяется для изучения антигенных свойств бактерий, главным образом кишечной группы, а также для изготовления моноспецифических сывороток.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Метод обнаружения и идентификации антигенов или антител, основанный на возникающем в их присутствии феномене агглютинации эритроцитов, на поверхности которых были предварительно адсорбированы соответствующие специфические антитела или антигены.

Отличается большей чувствительностью и специфичностью.

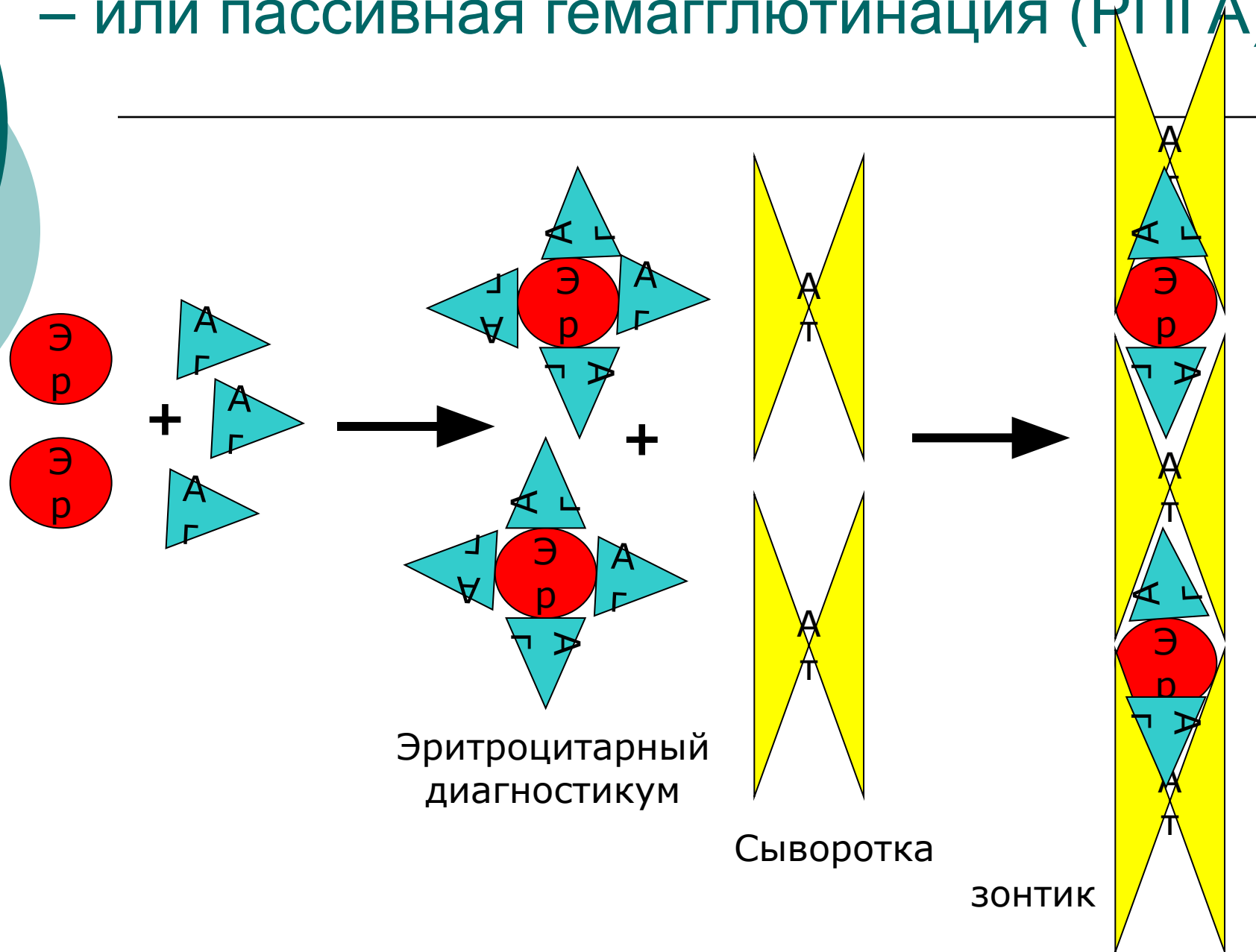
1. АГ (АТ) + эритроциты \longrightarrow нагруженные эритроциты

2. Нагруженные эритроциты + иммунная сыворотка или АГ

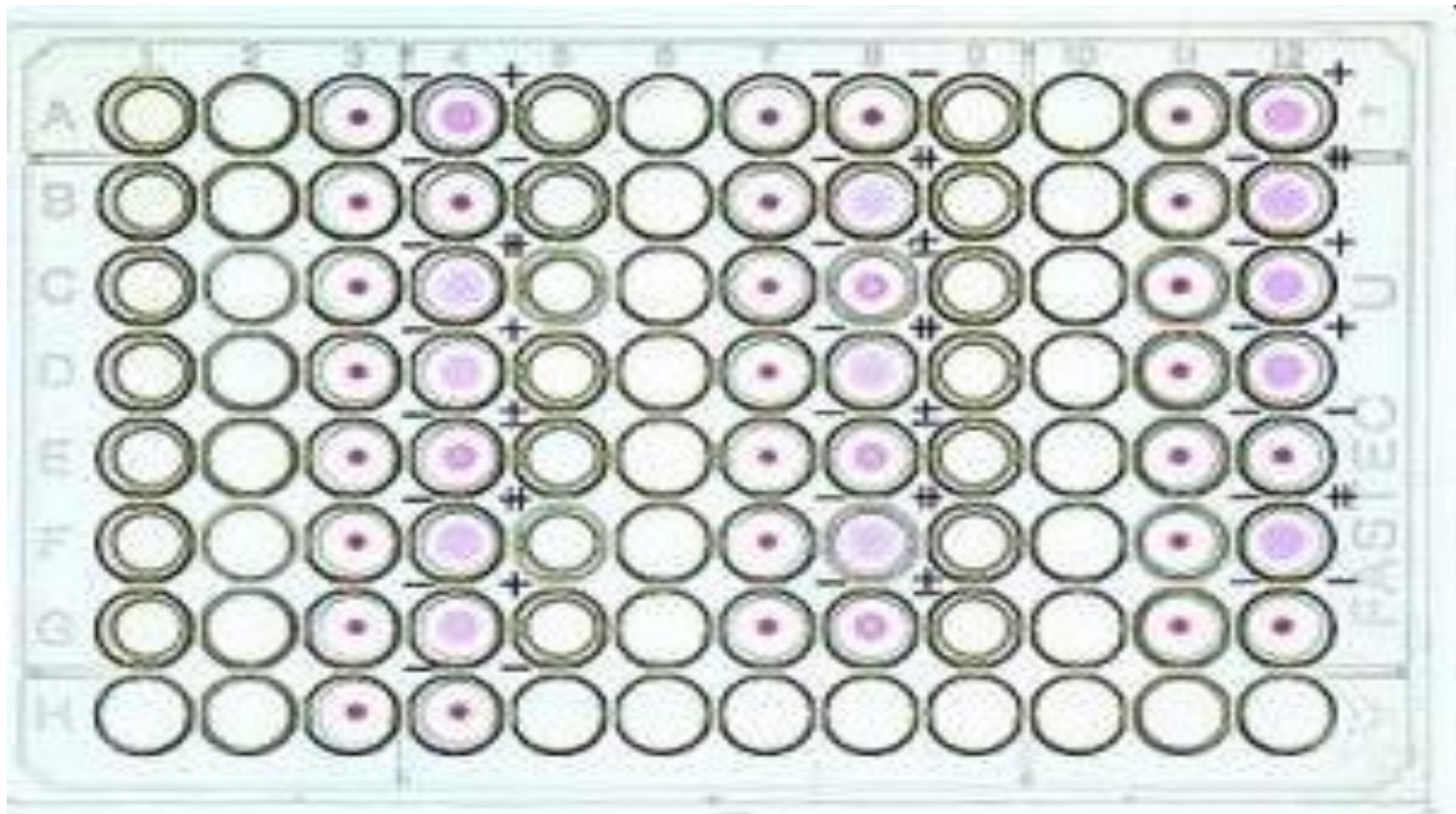
Положительная
Реакция (зонтик)

Отрицательная
Реакция (пуговка)

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) – или пассивная гемагглютинация (РПГА)



РНГА в иммунологическом планшете на выявление HBsAg



Постановка и результат 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
Диагностикум ботулинический эритроцитарный аггительный типА	0,1			0,1		
типВ		0,1			0,1	
типЕ			0,1			0,1
Инкубация при 37°C - 1 час						
Результат:	-	-	+	-	-	-

Наблюдаемая картина



Условные обозначения:

 - нет гемагглютинации (пуговка) ;

 - есть гемагглютинация (зонтик).

Тест-система для проведения РНГА



Нормальная
сыворотка

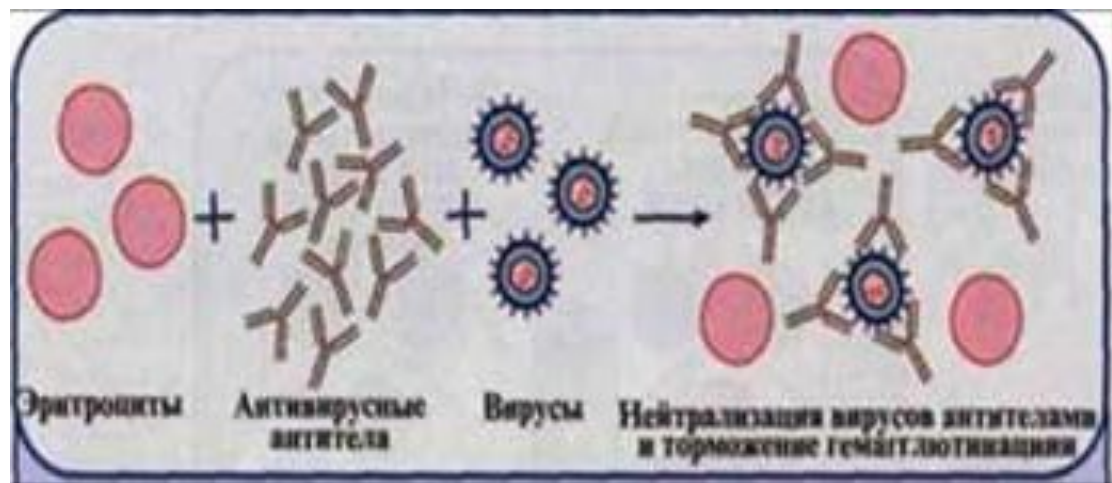
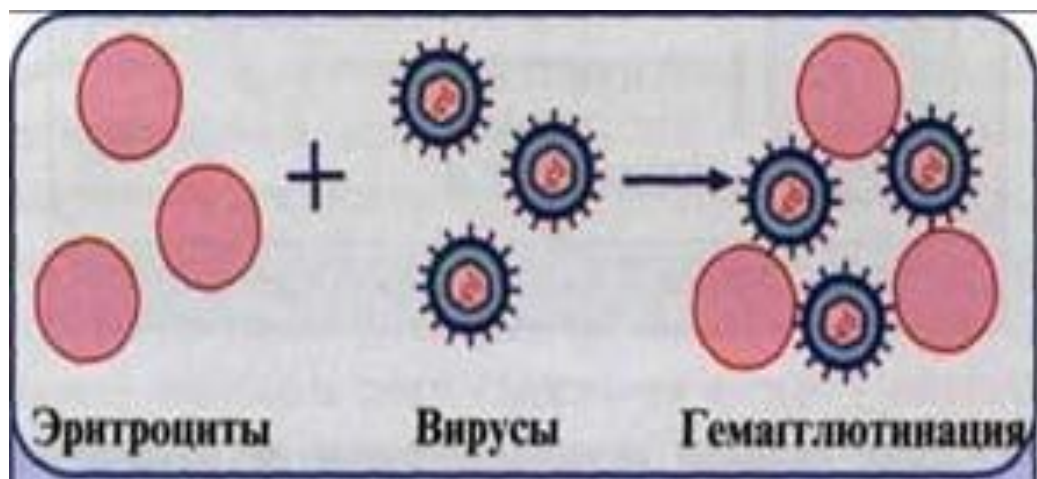
Эритроцитарный
диагностикум

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

метод идентификации вирусов или выявления противовирусных антител в сыворотке крови больного.


в присутствии иммунной к вирусу сыворотки крови агглютинация эритроцитов отсутствует

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) (схема)



РЕАГЕНТЫ:

тестовая сыворотка
(содержащая или нет искомые
антитела- (Ab)- Y

вирус- 

дается время для протекания
реакции в растворе

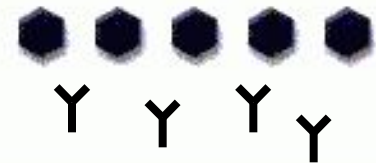
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ОБР-Ц

АНТИТЕЛА К ВИРУСУ
ПРИСУТСТВУЮТ



ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ ОБР-Ц

АНТИТЕЛА К ВИРУСУ
ОТСУТСТВУЮТ



РЕАГЕНТЫ:

красные кровяные тельца
(эритроциты)
подходящего организма
(RBC) 

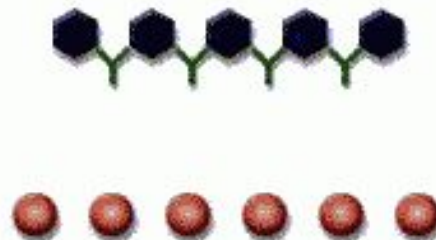
связывание гликопротеинов
оболочки вируса с RBC
ингибируется



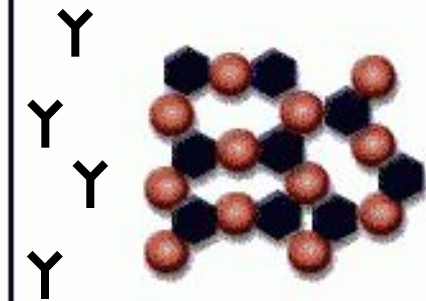
гликопротеины оболочки
вируса связываются с RBC





ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ-
ингибирование гем-агглютинации
эритроцитов антителами к вирусу



ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ- вирус
вызывает гем-агглютинацию
эритроцитов




Результаты РТГА при типировании вируса гриппа

Типоспецифическая противогриппозная сыворотка	Разведение сыворотки					Контроль		
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	Сыворотки	Вируса	Эритроцитов
H3N1								
H1N1								
H3N2								

Результаты реакции учитывают по отсутствию гемагглютинации.

Условные обозначения:

 - торможение гемагглютинации (пуговка) ;

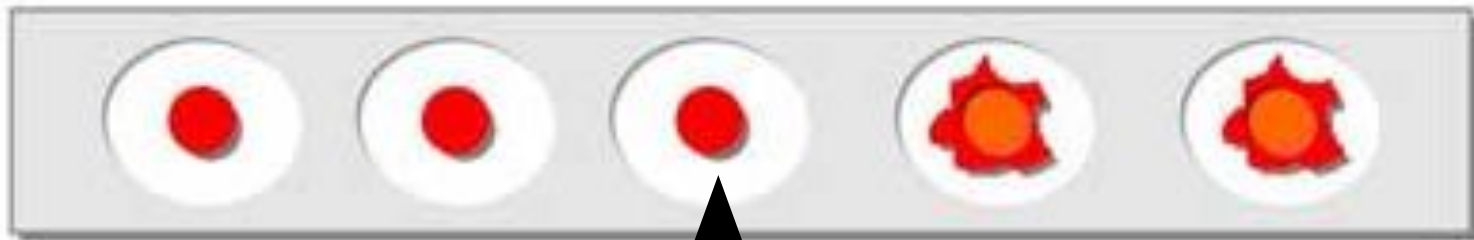
 - гемагглютинация (зонтик).

Исследуемый материал содержит вирус гриппа тип А с антигеном H3N2

Определение титра антител крови больного по РТГА

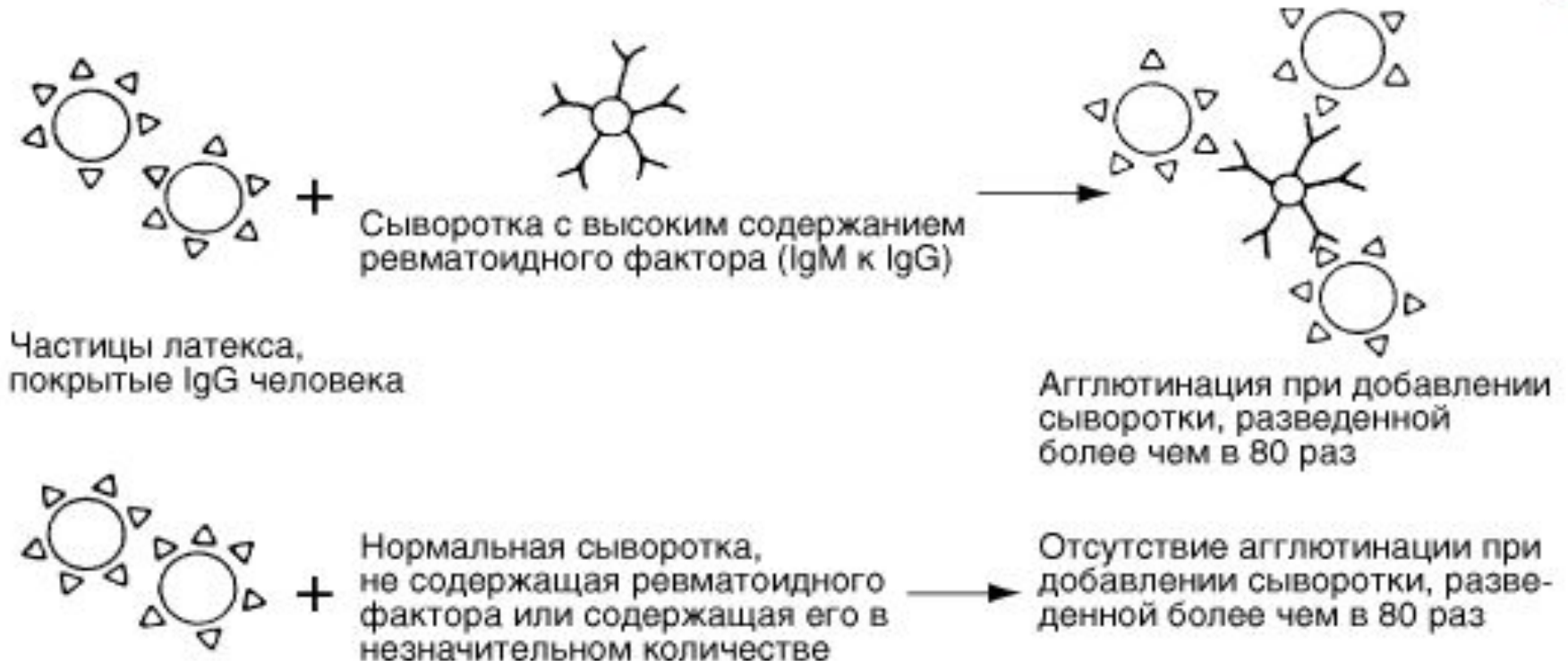
Титр антител определяют по последней лунке с положительной РТГА.

Разведение сыворотки **1:10** **1:20** **1:40** **1:80** **1:160**



титр антител равен 1:40.

Реакция латекс-агглютинации (РЛА)



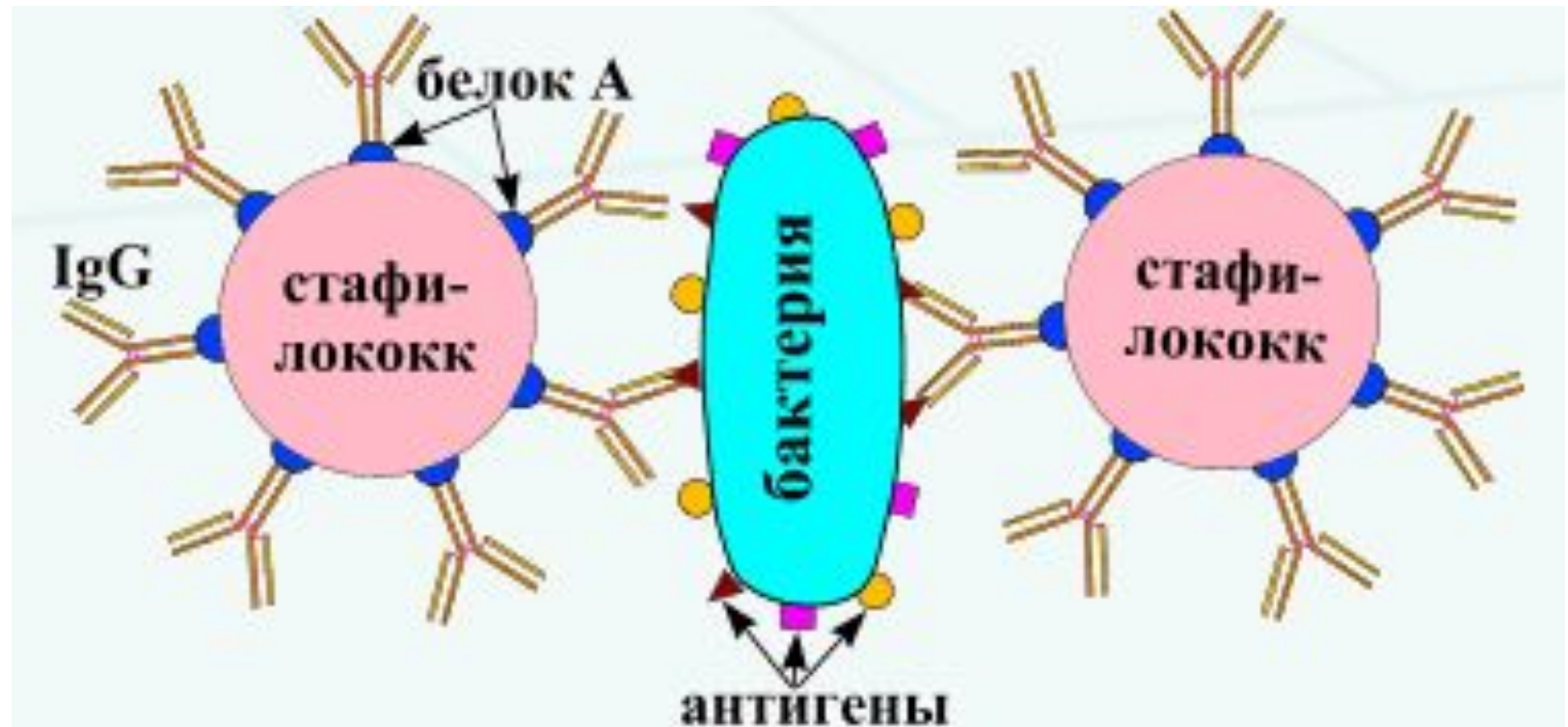
- **Частицы латекса** (искусственные эритроциты) используют в качестве носителя АГ.
- **Ревматоидный фактор** - это аутоантитела анти-IgG (к Fc-фрагменту IgG), относящиеся к классу IgM. В сыворотке ревматоидный фактор обычно присутствует в виде комплекса с IgG. В высоком титре ревматоидный фактор выявляется в крови у 80% больных с тяжелым прогрессирующим ревматоидным артритом.

Реакция коаггутинации (РКА)

В качестве носителя используются:

- **Белок А *S.aureus*** (неспецифически адсорбирует на своей поверхности Fc-фрагменты иммуноглобулина G)
- **Белок G стрептококков**
- **Инертные носители** (активированный уголь)

Схема реакции коагглютинации



Реакция Кумбса с неполными антителами (бруцеллез, резус-конфликт)

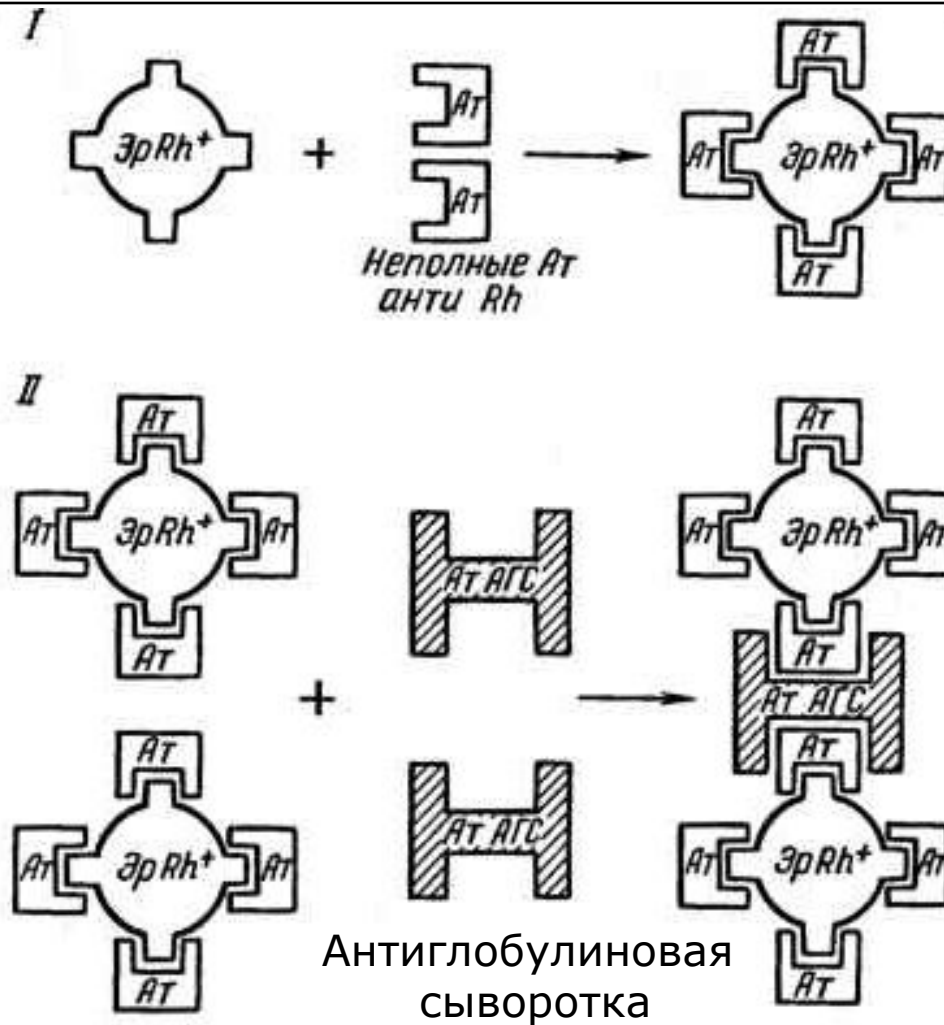


Рис. 54. Реакция Кумбса (схема).



Занятие №2

Реакция преципитации

Осаждение специфических мелкодисперсных антигенов эквивалентным количеством антител
(в присутствии электролита)

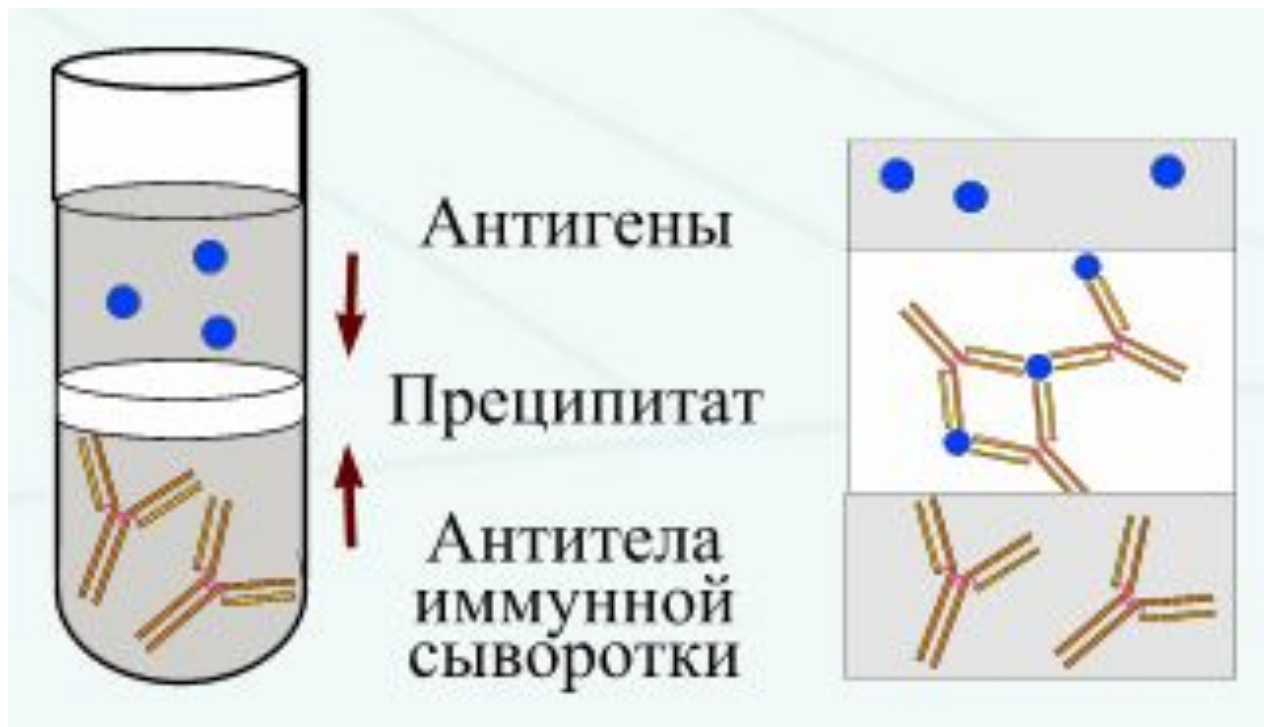
Варианты:

- в жидкой среде - по типу реакции флокуляции, кольцепреципитации
- в плотной среде в агаре (геле).

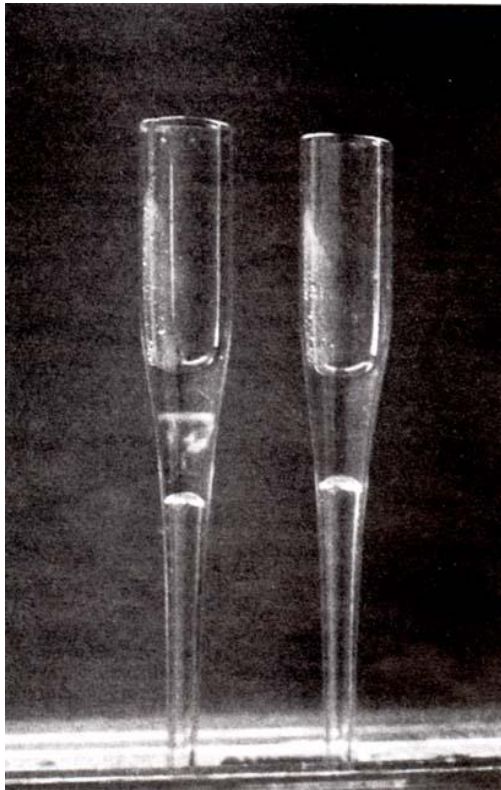
Реакции преципитации:

- кольцепреципитации
- реакция флокуляции
- реакция преципитации в геле по Оухтерлони,
- радиальная иммунодиффузия по Манчини,
- реакция иммуноэлектрофореза

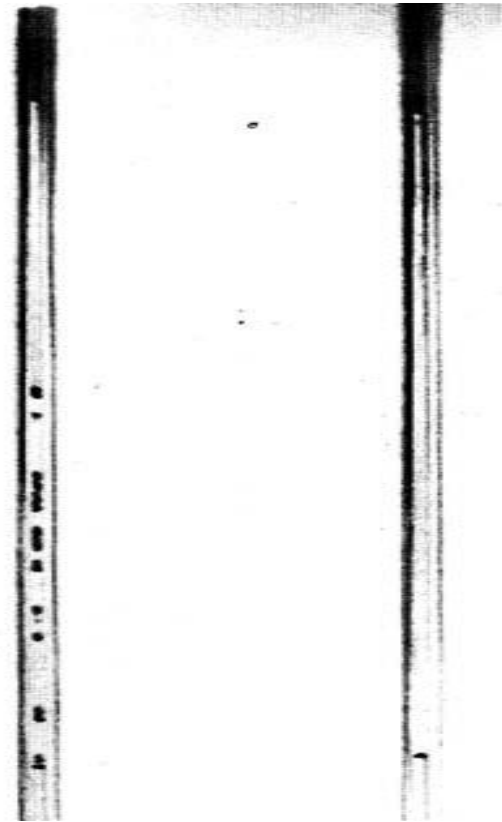
Реакция кольцепреципитации



Реакция преципитации в растворе

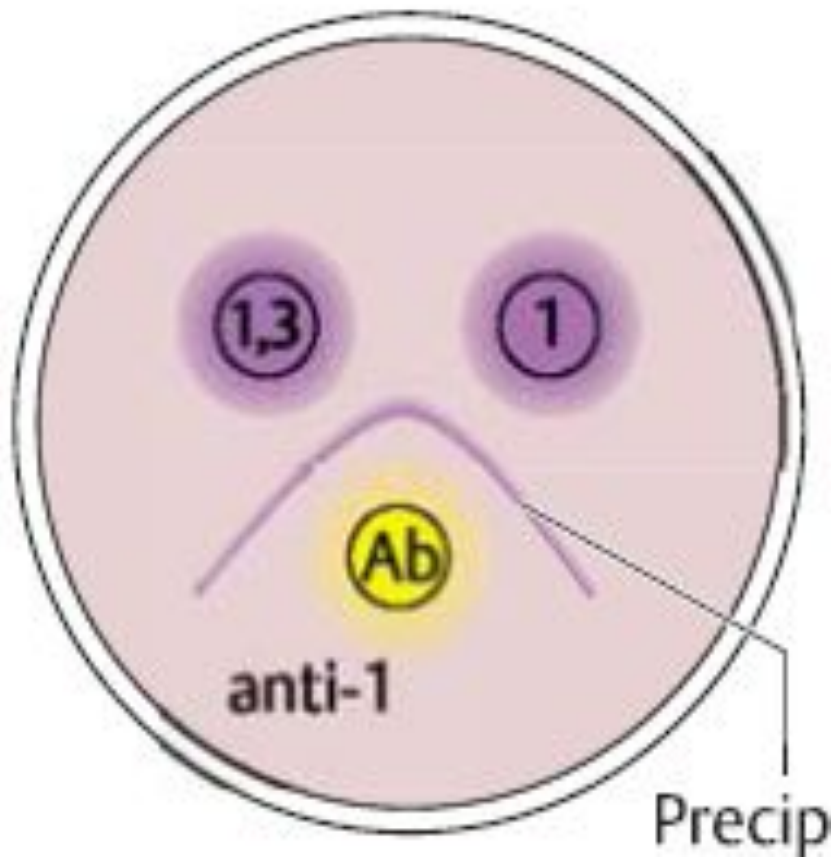


Реакция
кольцепреципитации



Реакция преципитации в
капиллярных пробирках
(флокуляция)

Реакция преципитации в геле по Оухтерлони

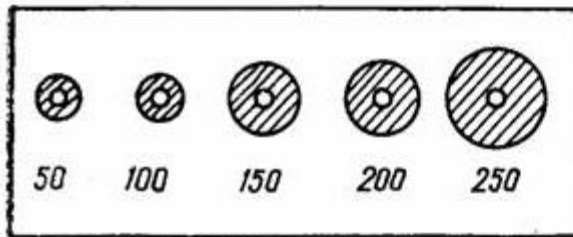


Реакция преципитации в геле по Манчини

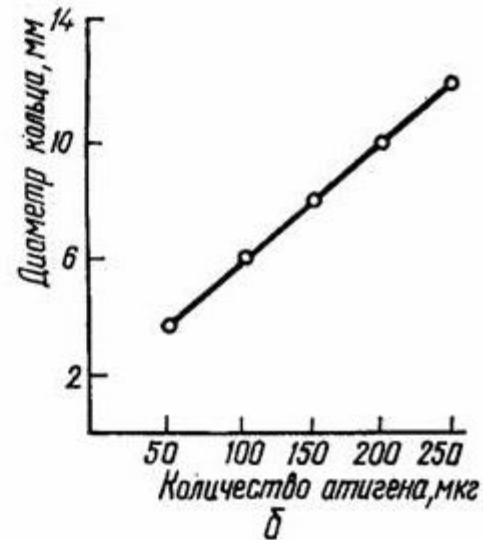
Gel containing Ab



Precipitin ring



a



Реакция иммуноэлектрофореза

(вирусный гепатит, клещевой энцефалит, менингококковая инфекция и др.).



Прибор иммуноэлектрофоретический ПИЭФ-1

Реакция иммунного лизиса: Реакция связывания комплемента (РСК)

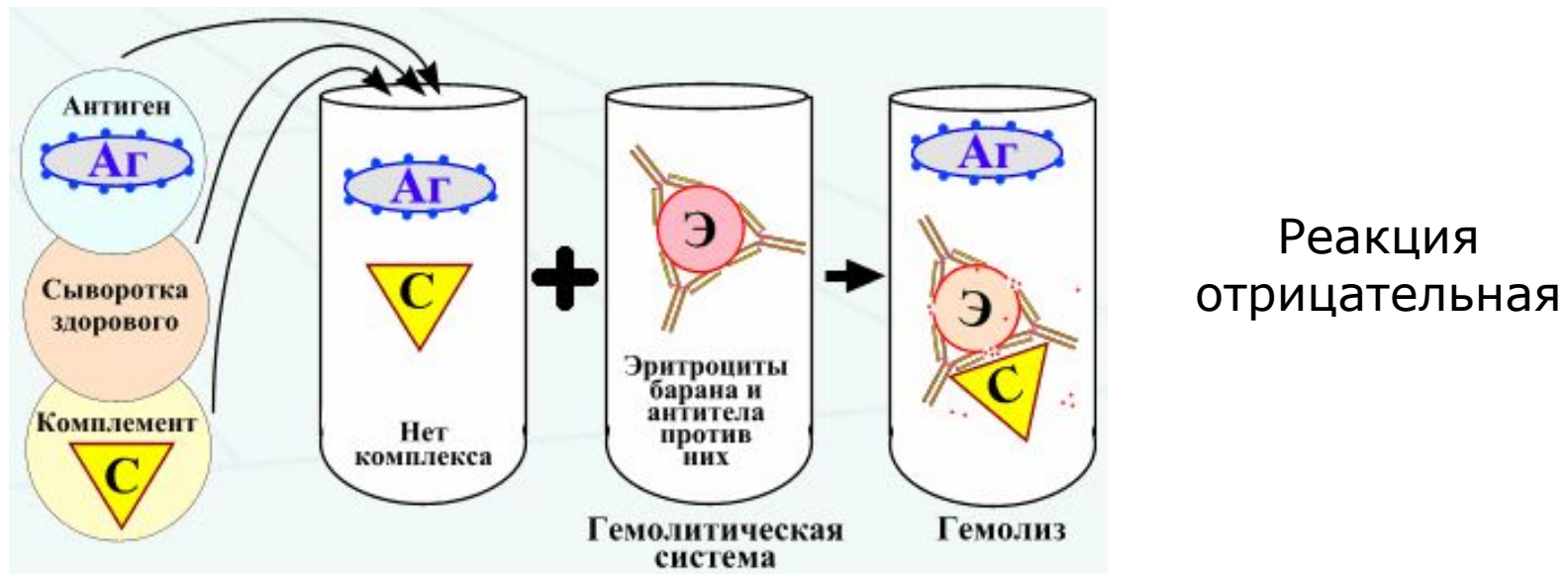
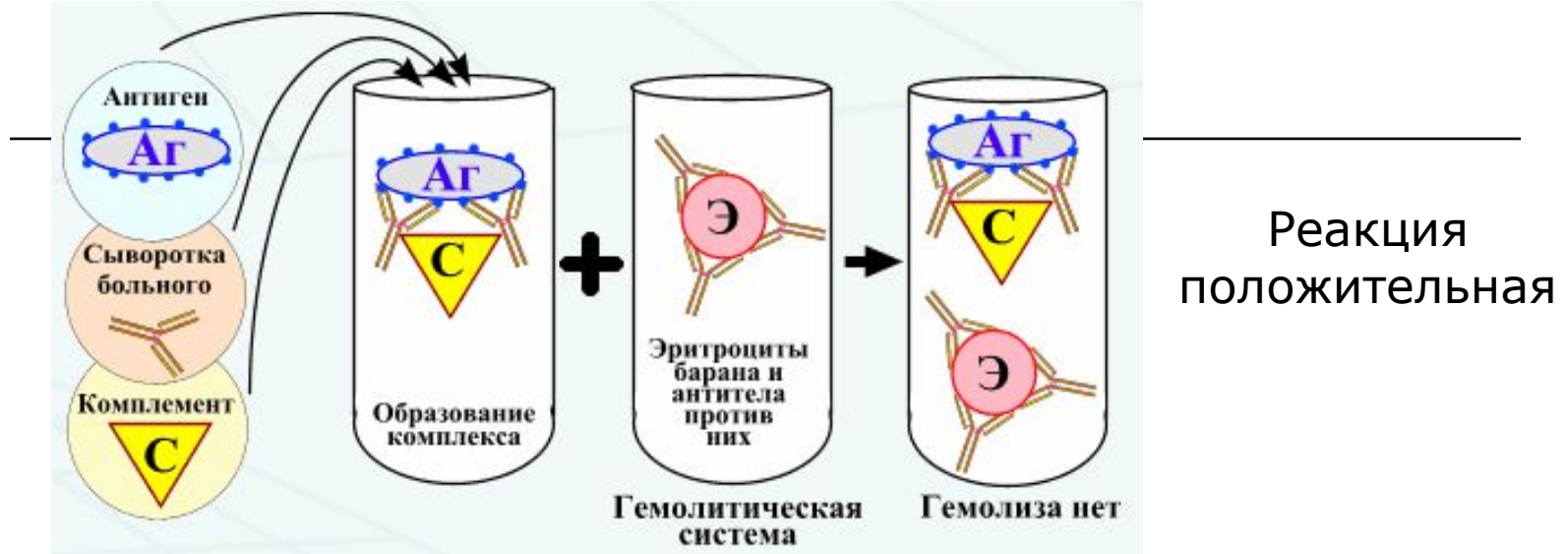
Реакция Борде— Жангу [по имени бактериологов Ж. Борде (J. Bordet) и О. Жангу (O. Gengou), 1901], высокоспецифичная и очень чувствительная серологическая реакция, основанная на свойстве комплекса антиген — антитело фиксировать свободный комплемент, применяемая при диагностике многих бактериальных и вирусных и некоторых протозойных и гельминтозных болезней, а также для изучения процессов, сопровождающихся изменением количества антигена или антител.

РСК протекает в 2 фазы:

- 1) Взаимодействие АТ, АГ и комплемента, в результате которого свободный комплемент связывается образовавшимся комплексом АГ—АТ (специфич. фаза);
- 2) индикация реакции сенсibilизир. эритроцитами (неспецифич. фаза).

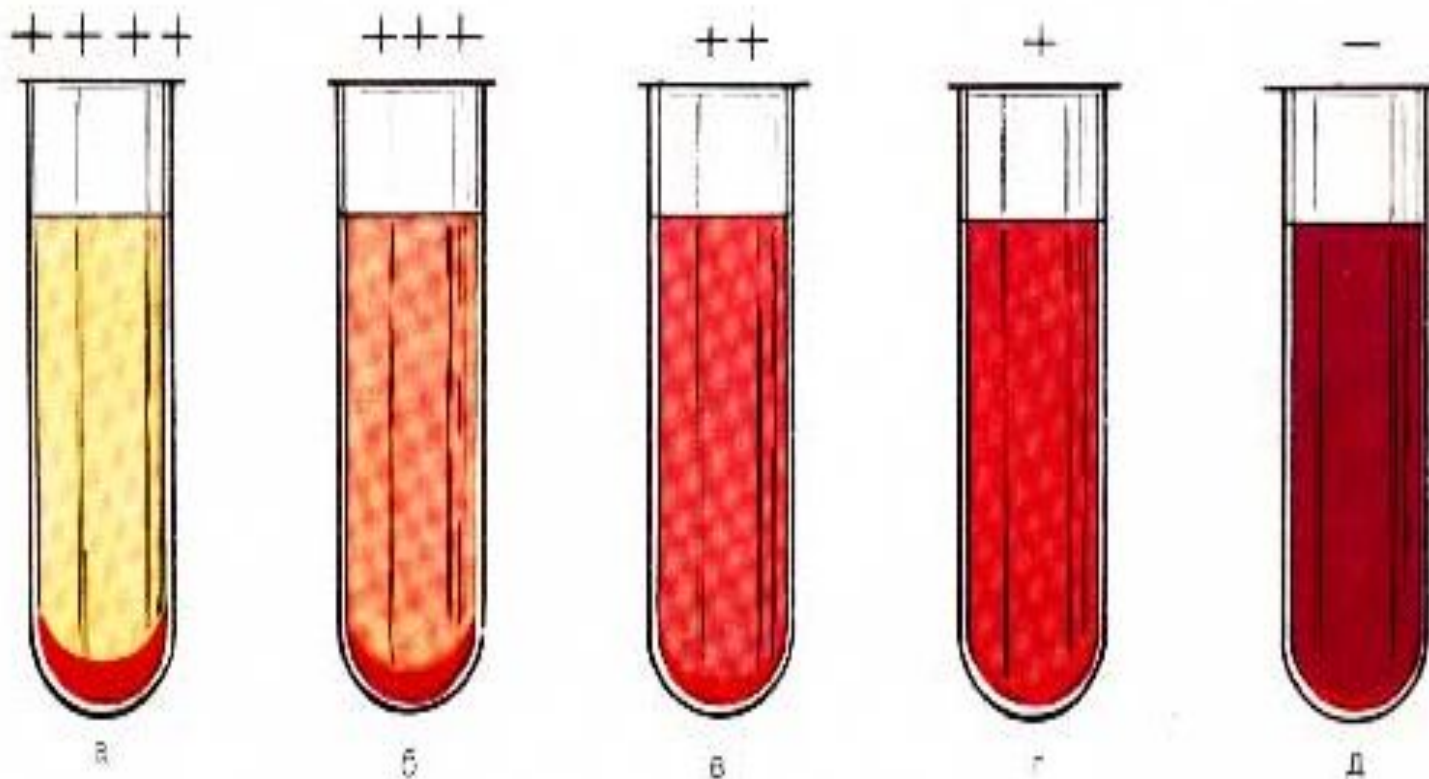
В РСК используют 2 системы: **специфич.** бактериол., состоящую из АТ (испытуемой сыворотки), АГ и комплемента, а также **неспецифич.** "индикаторную", содержащую гемолизин (гемолитич. сыворотка) и взвесь эритроцитов барана. АГ соединяется с АТ только в присутствии комплемента. Если испытуемая сыворотка содержит АТ, гомологичные взятому АГ, то присутствующий в реагирующей смеси комплемент адсорбируется образующимся комплексом АГ—АТ и теряет способность лизировать сенсibilизированные эритроциты, т. е. без комплемента гемолизин (гемолитич. антитело) не разрушает эритроциты (реакция положительная). В тех случаях, когда между АГ и АТ испытуемой сыворотки нет специфич. родства, комплекс не образуется и комплемент остаётся в свободном состоянии. При добавлении гемолитич. системы в этом случае несвязанный комплемент вызывает гемолиз сенсibilизированных эритроцитов (реакция отрицательная).

Реакция связывания комплемента



Реакция Вассермана (RW) относится к группе реакций связывания компонента

(A. P. Wassermann, нем. бактериолог, 1866-1925) - иммунологическая реакция, применяемая в диагностике сифилиса)



Результаты реакции Вассермана: а - полная задержка гемолиза (++++); б - выраженная задержка гемолиза (+++); в - частичная задержка гемолиза (++); г - слабая задержка гемолиза (+); д - полный гемолиз «лаковая кровь» (-). Реакция положительна при частичной, выраженной и полной задержке гемолиза, определяемой по степени окрашивания содержимого пробирок от светло-розового до ярко-красного. Негемолизированные эритроциты впоследствии образуют осадок красного цвета.

Иммунофлюоресцентный метод Кунса

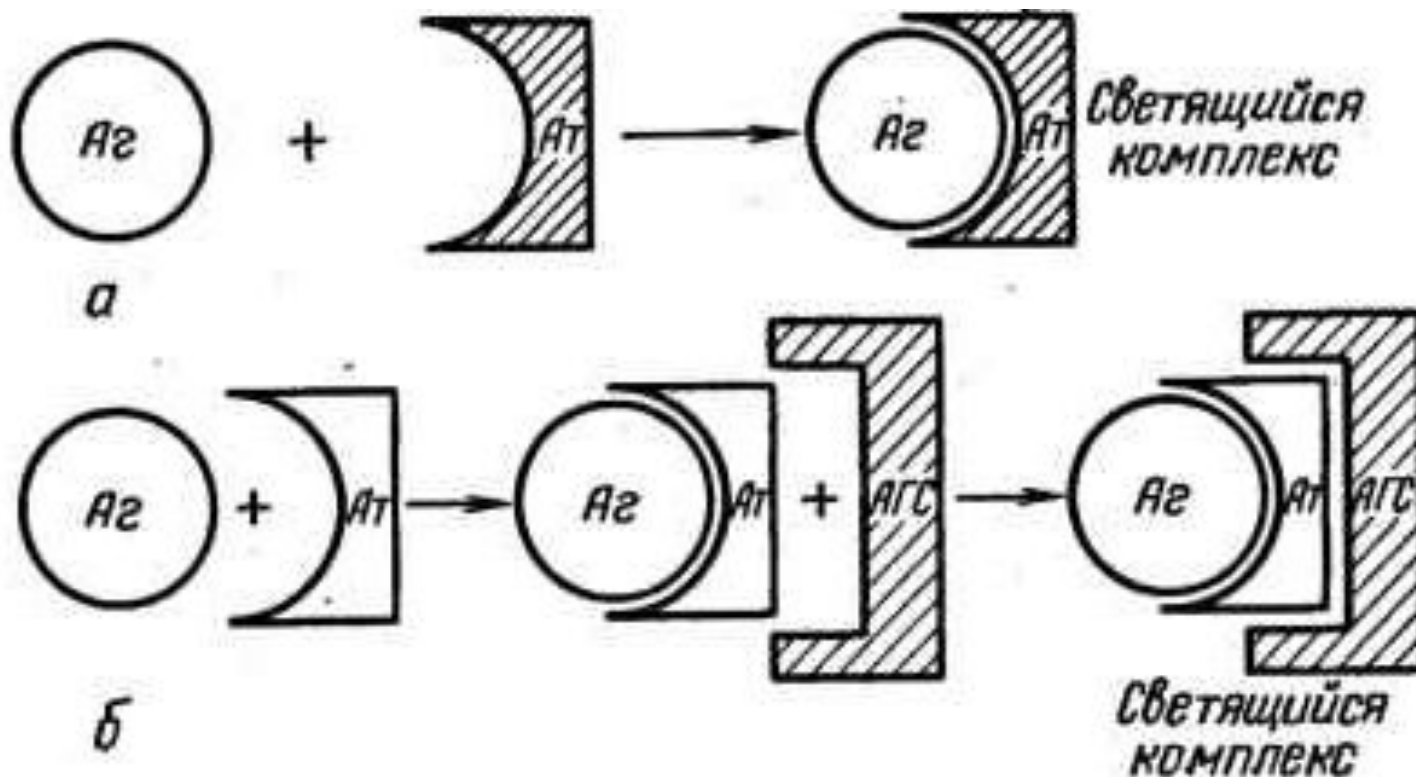


Рис. 55. Иммунофлюоресцентный метод Кунса (схема).

а — прямой метод; *б* — непрямой метод; *АГ* — антиген; *Ат* — антитело; *АГС* — антиглобулиновая сыворотка.

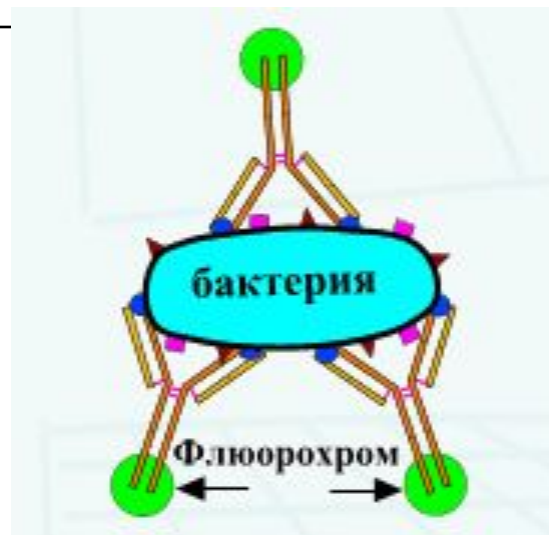
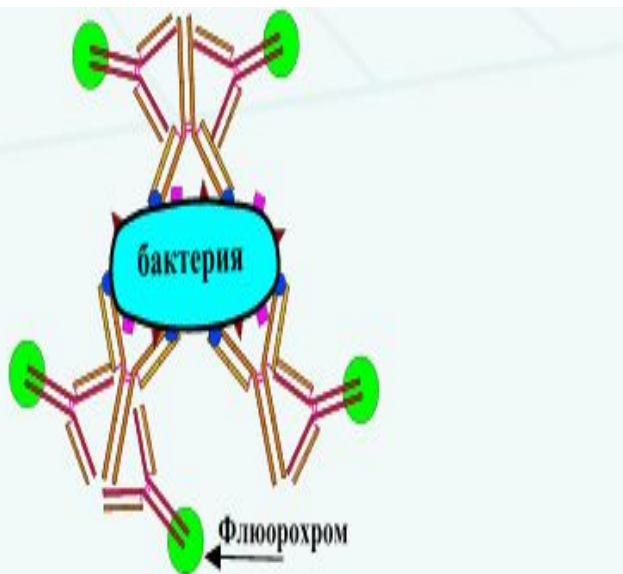
Кунса)-

или реакция иммунофлюорисценции(РИФ):

Прямой

флюорисцирующие АТ+
исследуемый АГ

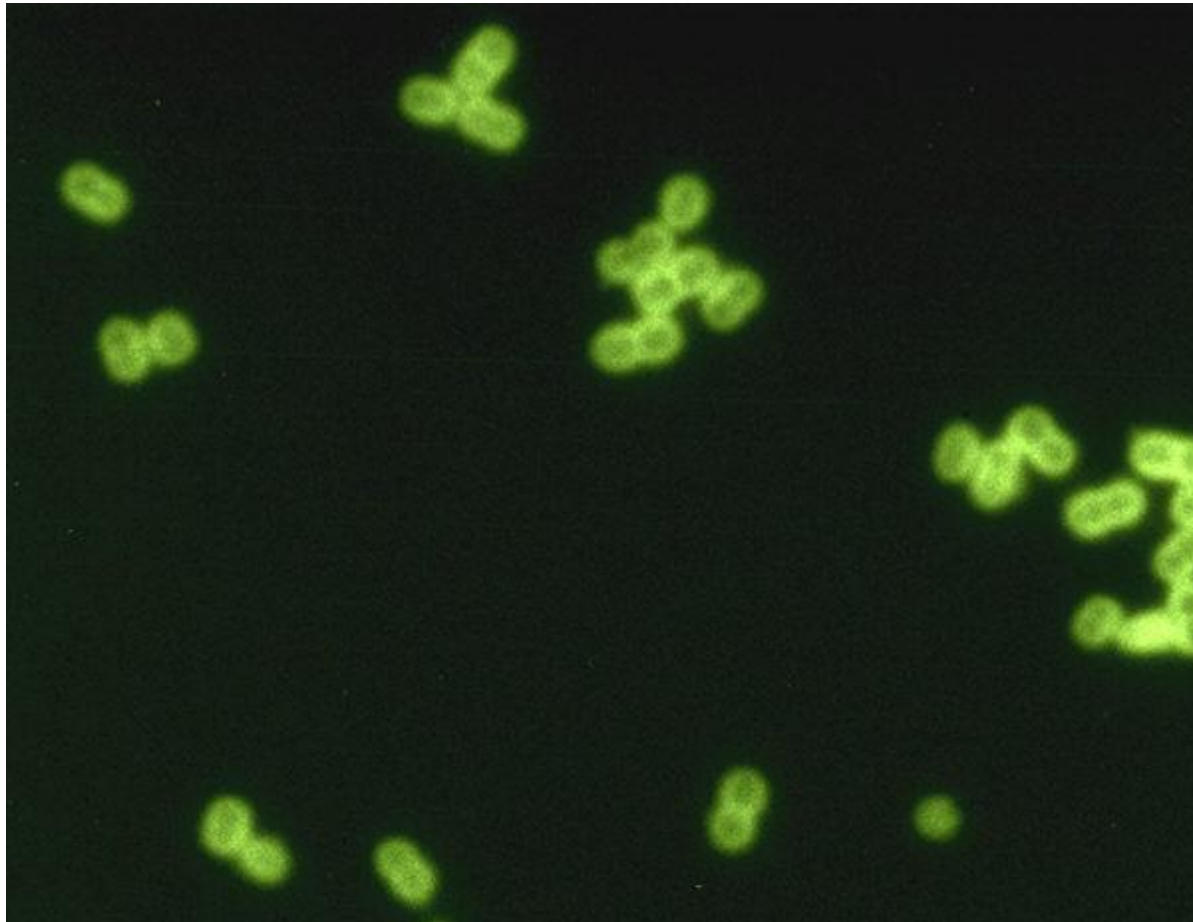
Светящийся комплекс



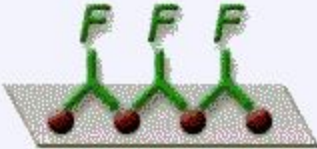
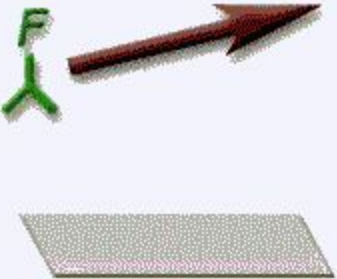

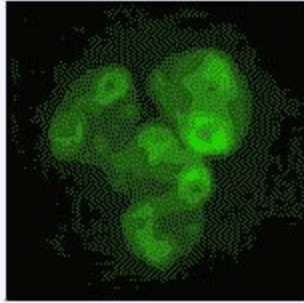



Светящийся комплекс

- **Непрямой** – универсальная флюорисцирующая сыворотка + специфические АТ + исследуемый АГ

Иммунофлюоресцентный анализ



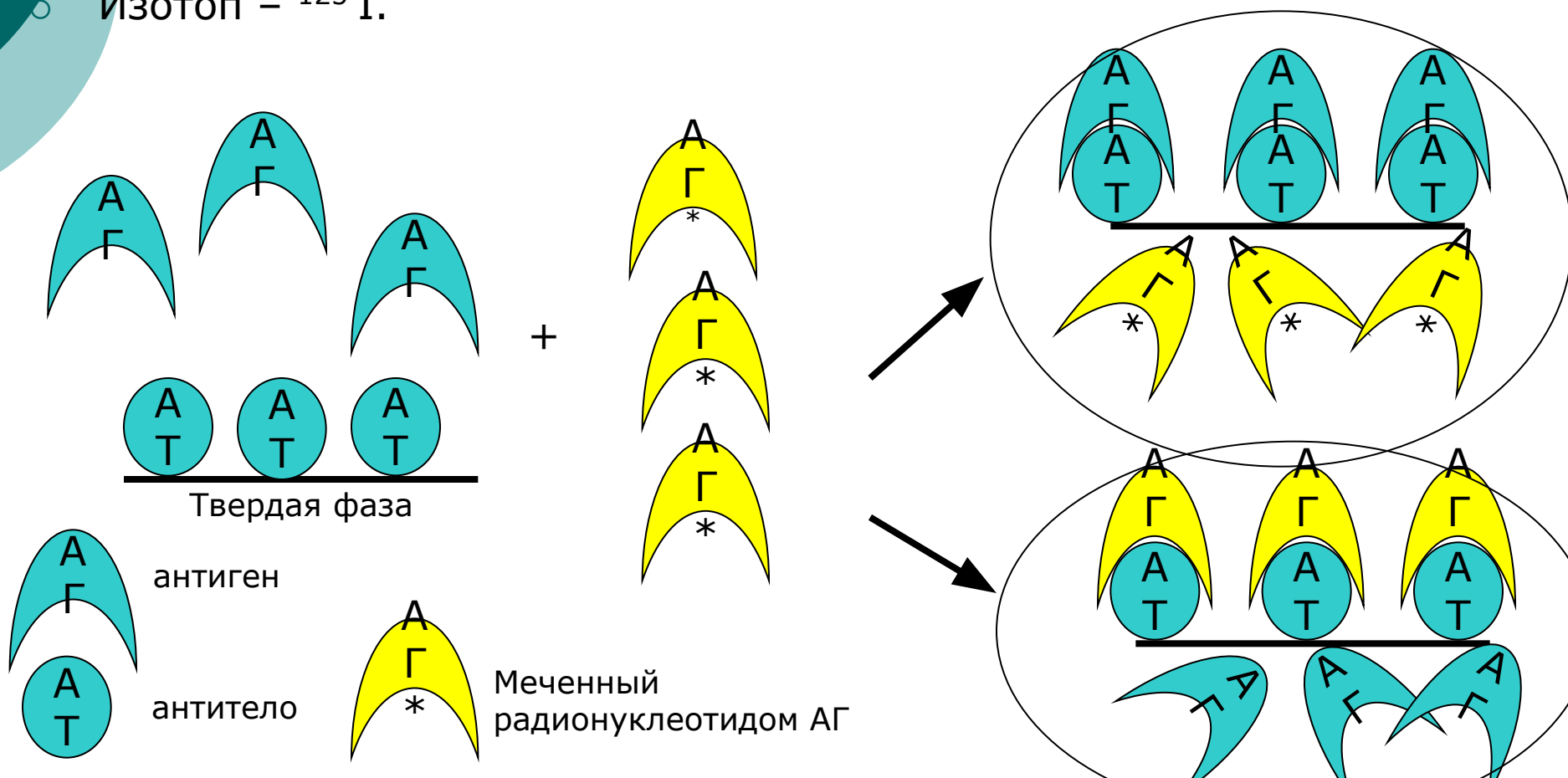
<p>реагенты: неизвестный образец закрепляется на пленке (может содержать искомые антигены-</p> <p style="text-align: center;">● Ag</p>	<p>ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ОБР_Ц</p> <p>Ag присутствует на пленке</p> 	<p>ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ ОБР_Ц</p> <p>Ag отсутствует на пленке</p> 
<p>реагенты: меченные флуоресцеином антитела к искомому антигену (дается время для протекания реакции связывания) несвязавшиеся антитела смывают</p> <p style="text-align: center;">F</p>		
<p>ПРОЦЕДУРА: наблюдение под флуоресцентным микроскопом</p>  <p>РЕЗУЛЬТАТ: ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ- зеленая флуоресценция ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ- отсутствие флуоресценции</p>		

Immunofluorescence Assay (IFA) or Fluorescent Antibody (FA) Test
ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЛИ ТЕСТ НА ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА

Радиоиммунный анализ (РИА) твёрдофазный

Высоко чувствительный метод. Применяют для количественного определения различных веществ : гормонов, белков сыворотки крови, лекарственных препаратов, микробных антигенов.

Изотоп – ^{125}I .



Иммуноферментный анализ (ИФА)

Содержание набора

(Сифилис ИФА 96)



Промывающий
раствор

Буфер для разведения
конъюгата

Стоп-
раствор

Стрипированный
микропланшет

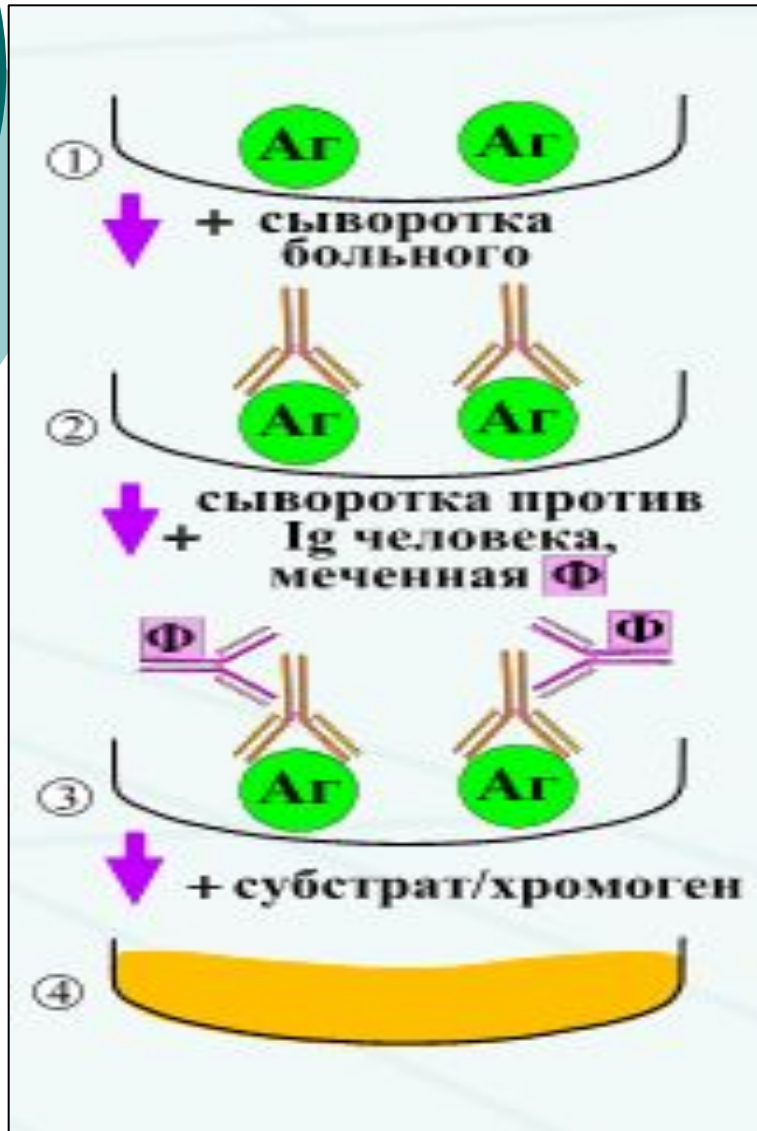
Положительный и
отрицательный
контроли



Конъюга
Т

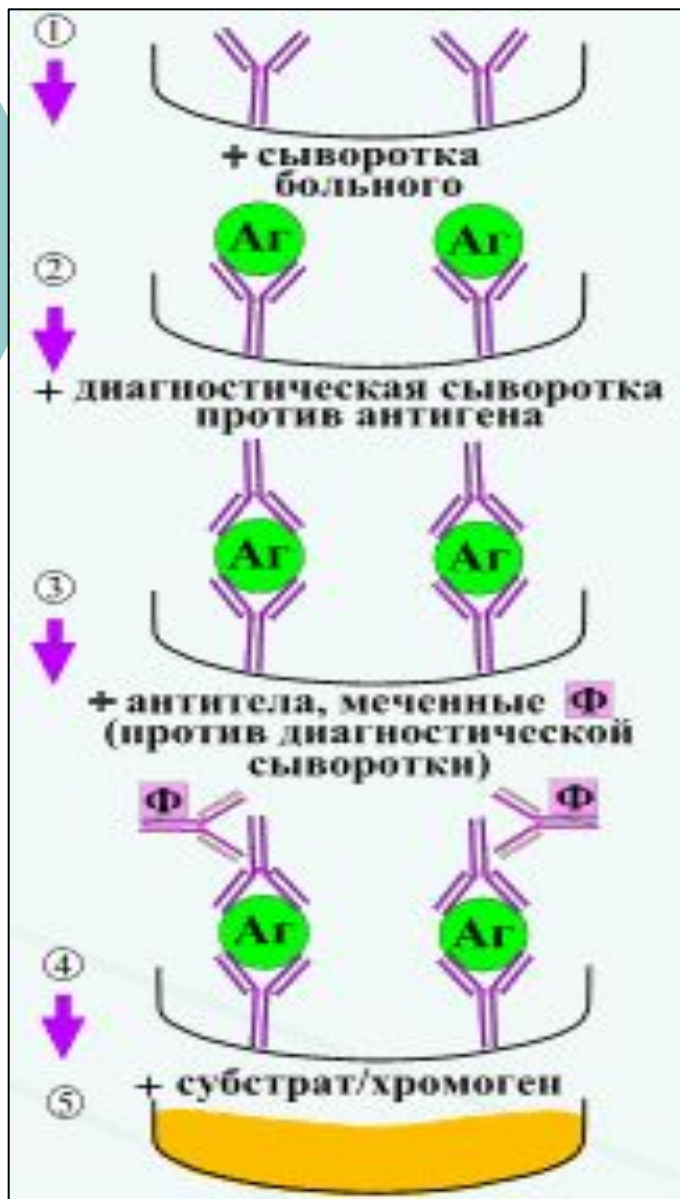
Субстрат

Схема иммуноферментного анализа твёрдофазный вариант



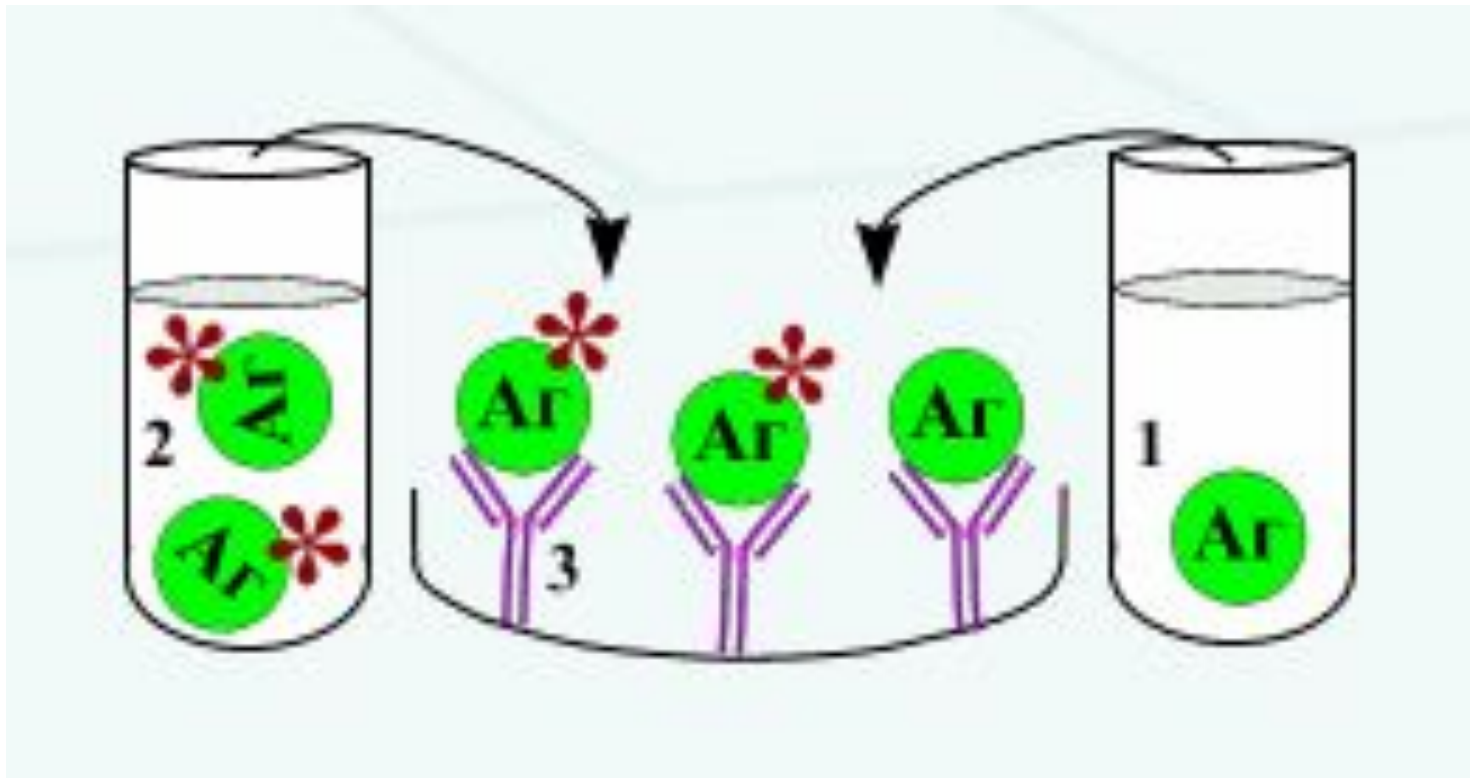
Определение
антител в
сыворотке
больного с
сорбированным
антигеном

Схема иммуноферментного анализа твердофазный вариант



Определение антигена
в сыворотке больного
с сорбированными
диагностическими
антителами

Конкурентный вариант ИФА для определения антигенов





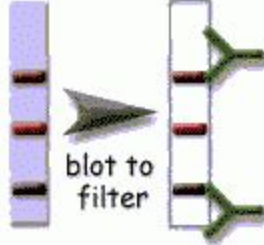
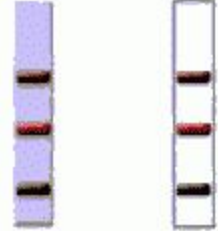


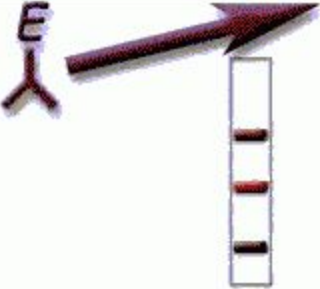

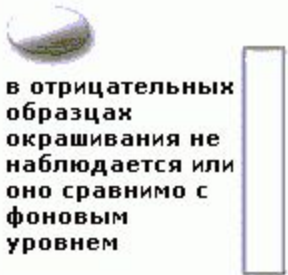


Иммунологические планшеты, используемые для постановки ИФА



Автоматический биохимический и иммуноферментный анализатор



<p>РЕАГЕНТЫ: образцовые антигены искомой патологии наносятся на пластину</p>  <p>для гель-электрофореза и разделяются по молекулярным массам</p>	<p>ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ</p>  <p><i>ЭЛЕКТРОФОРЕЗ</i></p>	<p>ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ</p>  <p><i>ЭЛЕКТРОФОРЕЗ</i></p>
<p>ПРОЦЕДУРА: перенесение (blot) разделенных антигенов на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр</p> <p>на фильтр наносят исследуемую сыворотку. дают время на протекание реакции связывания антител (если есть), после чего несвязавшийся материал смывают</p> 	 <p>blot to filter</p>	
<p>РЕАГЕНТЫ: конъюгат антител к исследуемым антителам с ферментом (пероксидаза хрена или фосфатаза) реагирует на фильтре, после некоторого времени несвязавшийся конъюгат смывают</p> 	<p>конъюгат присоединяется только к тем антителам, против которых выработаны молекулы его антител</p> 	
<p>РЕАГЕНТЫ: фильтр обрабатывается неокрашенным субстратом фермента в конъюгате. Окрашивание появляется только по местам патологического антигена (ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ Р-Я) или окраска не появляется вовсе (ОТРИЦ. Р-Я), либо по местам примесных антигенов.</p>	<p>фермент превращает неокрашенный субстрат в окрашенный продукт точно в месте расположения полосы Ag</p> 	<p>в отрицательных образцах окрашивания не наблюдается или оно сравнимо с фоновым уровнем</p> 

ПРОЦЕДУРА "WESTERN BLOT"