

Серологические методы исследования

ИММУНИТЕТ

```
graph TD; A[ИММУНИТЕТ] --> B[ВИДОВОЙ (врожденный)]; A --> C[приобретенный]; C --> D[естественный]; C --> E[искусственный]; D --> F[ИММУНИТЕТ новорожденных]; E --> G[активный]; E --> H[пассивный];
```

ВИДОВОЙ (врожденный)

приобретенный

естественный

искусственный

**ИММУНИТЕТ
новорожденных**

активный

пассивный

АНТИГЕНЫ

Антигены- вещества различного происхождения, несущие признаки генетической чужеродности и вызывающие развитие иммунных реакций

Свойства АГ:

- Иммуногенность— способность индуцировать иммунный ответ
- Антигенность — способность АГ избирательно реагировать со специфичными АТ
- Специфичность — структурные особенности, отличающие один АГ от другого.

Полные антигены - это вещества, вызывающие полноценный иммунный ответ и обладающие свойствами: иммуногенностью, антигенностью и специфичностью.

Гаптены - неполные антигены, относительно простые вещества, способные участвовать в иммунологических взаимодействиях, но не способные самостоятельно индуцировать иммунный ответ

Основные типы антигенной специфичности

1. *Видовая*- характерна для всех особей одного вида (общие эпитопы).

2. *Групповая*- внутри вида (изоантигены, которые характерны для отдельных групп).
Пример- группы крови (ABO и др.).

3. *Гетероспецифичность*- наличие общих антигенных детерминант у организмов различных таксономических групп. Имеются перекрестно-реагирующие антигены у бактерий и тканей макроорганизма.

4. Патологическая. При различных патологических изменениях тканей происходят изменения химических соединений, что может изменять нормальную антигенную специфичность. Появляются “ожоговые”, “лучевые”, “раковые” антигены с измененной видовой специфичностью

5. Стадиоспецифичность. Имеются антигены, характерные для определенных стадий развития, связанные с морфогенезом

- Антигены бактерий по локализации подразделяют на капсульные (K) (представлены белками, полисахаридами),
- соматические (O) (Расположены не только в цитоплазме, а в основном на поверхности микробной клетки, имеют разнообразный химический состав, отличаются термостабильностью),
- жгутиковые (H) (термолабильные белковые комплексы жгутиков)
- антигены экзопродуктов. В свою очередь K - антигены разделяют на (L, B) термолабильные и (A, M) термостабильные антигены.

АНТИТЕЛА

Антитела - специфические белки гамма-глобулиновой природы, продукт секреторной деятельности плазматических клеток (конечной стадии дифференцировки В-лимфоцитов).

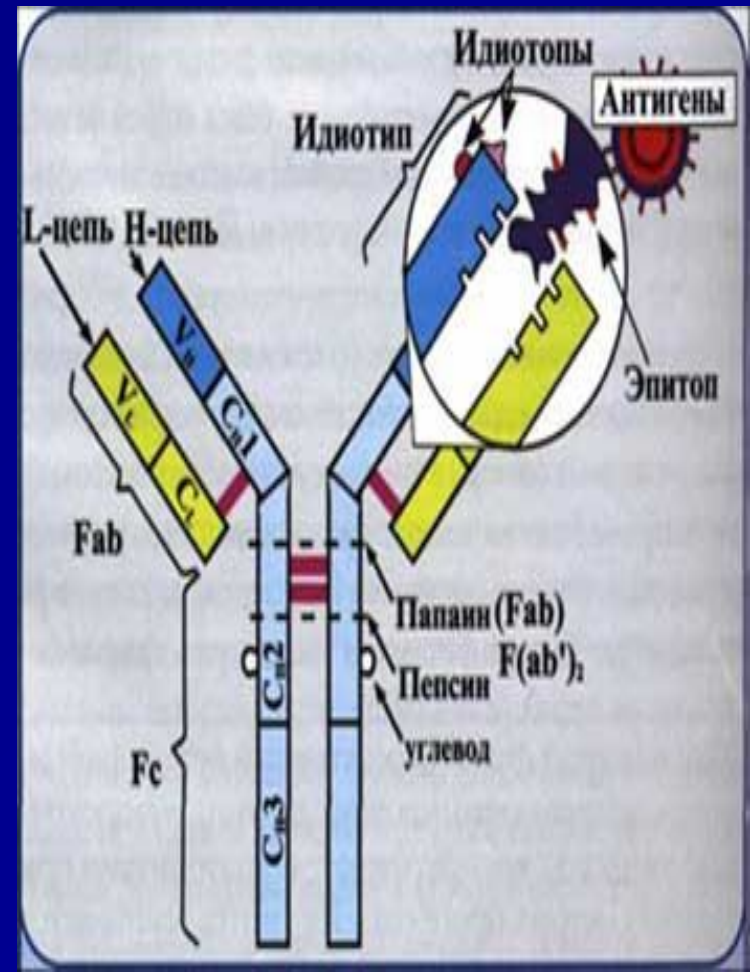
образующиеся в организме в ответ на антигенную стимуляцию и способные специфически взаимодействовать с антигеном.

по локализации:

- сывороточные
- секреторные
- поверхностные

КЛАССЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ:

1. Ig M.
2. Ig G.
3. Ig A.
4. Ig E.
5. Ig D.



Иммуноглобулины (Ig) разделены в зависимости от локализации на три группы:

- сывороточные (в крови);
- секреторные (в секретах - содержимом желудочно-кишечного тракта, слезном секрете, слюне, особенно - в грудном молоке) обеспечивают *местный иммунитет* (иммунитет слизистых);
- поверхностные (на поверхности иммунокомпетентных клеток, особенно В-лимфоцитов).

Основные биологические характеристики антител.

1. *Специфичность* - способность взаимодействия с определенным (своим) антигеном (соответствие эпитопа антигена и активного центра антител).

2. *Валентность*- количество способных реагировать с антигеном активных центров (это связано с молекулярной организацией- моно- или полимер). Иммуноглобулины могут быть *двухвалентными* (IgG) или *поливалентными* (пентамер IgM имеет 10 активных центров). Двух- и более валентные антитела называются *полными антителами*.

- 3. *Аффинность* - прочность связи между эпитопом антигена и активным центром антител, зависит от их пространственного соответствия.
- 4. *Авидность* - интегральная характеристика силы связи между антигеном и антителами, с учетом взаимодействия всех активных центров антител с эпитопами. Поскольку антигены часто поливалентны, связь между отдельными молекулами антигена осуществляется с помощью нескольких антител.

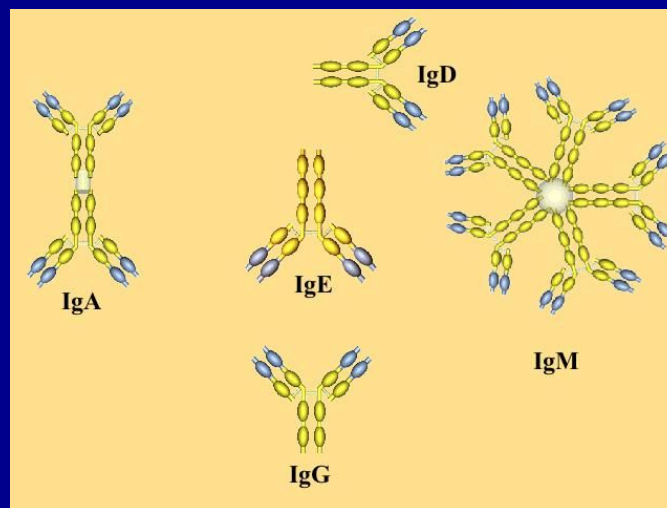
5. *Гетерогенность* - обусловлена антигенными свойствами антител, наличием у них трех видов антигенных детерминант:

- *изотипические* - принадлежность антител к определенному классу иммуноглобулинов;

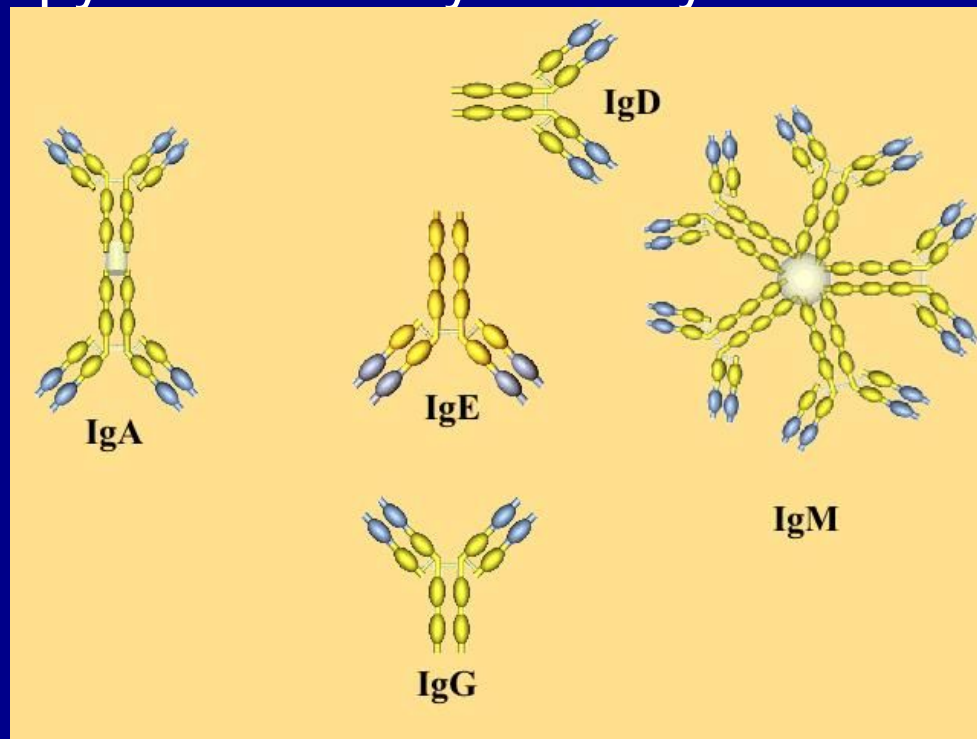
- *аллотипические* - обусловлены аллельными различиями иммуноглобулинов, кодируемых соответствующими аллелями Ig гена;

- *идиотипические* - отражают индивидуальные особенности иммуноглобулина, определяемые характеристиками активных центров молекул антител.

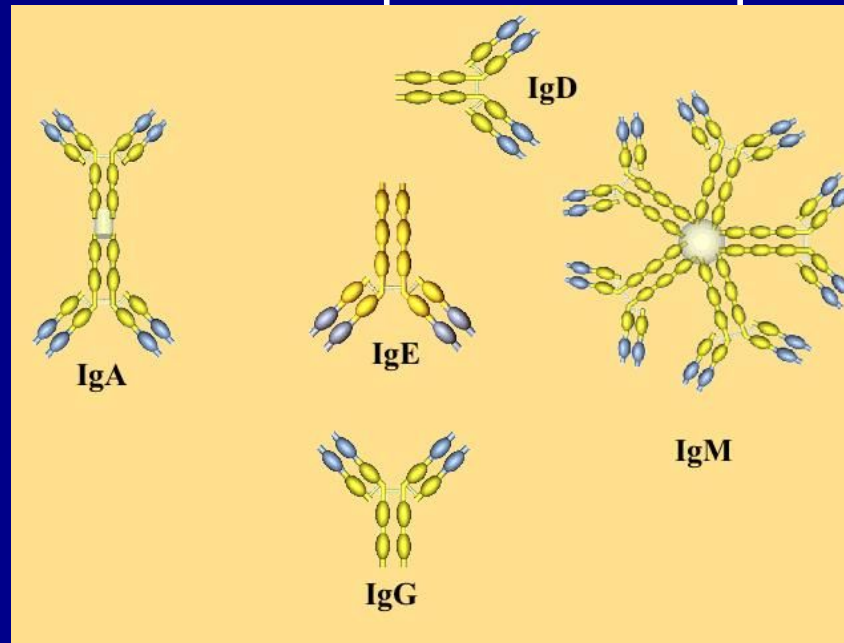
- IgG является основным иммуноглобулином сыворотки здорового человека (составляет 70-75 % всей фракции иммуноглобулинов), наиболее активен во вторичном иммунном ответе и антитоксическом иммунитете. Благодаря малым размерам, является единственной фракцией иммуноглобулинов, способной к транспорту через плацентарный барьер и тем самым обеспечивающей иммунитет плода и новорожденного.



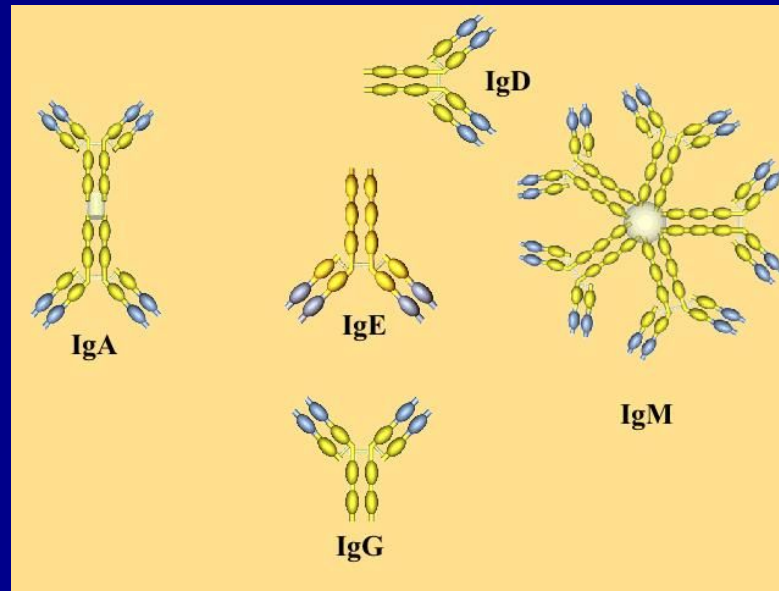
- IgM представляют собой пентамер основной четырёхцепочечной единицы, содержащей две μ -цепи. . Появляются при первичном иммунном ответе В-лимфоцитами на неизвестный антиген, составляют до 10 % фракции иммуноглобулинов. Являются наиболее крупными иммуноглобулинами.



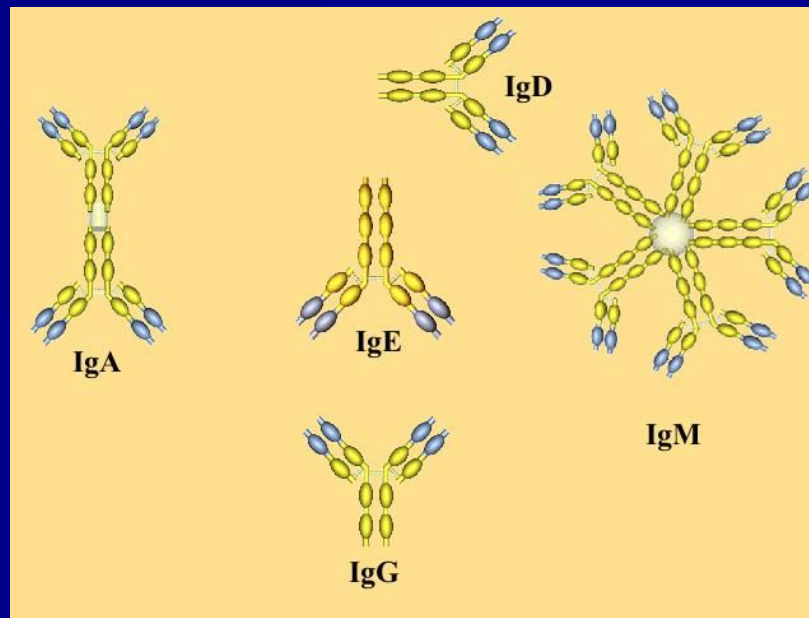
- IgA сывороточный IgA составляет 15-20 % всей фракции иммуноглобулинов, при этом 80 % молекул IgA представлено в мономерной форме у человека. Основной функцией IgA является защита слизистых оболочек дыхательных, мочеполовых путей и желудочно-кишечного тракта от инфекций.



- IgD составляет менее одного процента фракции иммуноглобулинов плазмы, содержится в основном на мембране некоторых В-лимфоцитов. Функции до конца не выяснены, предположительно является антигенным рецептором с высоким содержанием связанных с белком углеводов для В-лимфоцитов, ещё не представлявших антигену.



IgE в свободном виде в плазме почти отсутствует. Способен осуществлять защитную функцию в организме от действия паразитарных инфекций, обуславливает многие аллергические реакции. Механизм действия IgE проявляется через связывание с высоким сродством ($10^{-10}M$) с поверхностными структурами базофилов и тучных клеток, с последующим присоединением к ним антигена, вызывая дегрануляцию и выброс в кровь высоко активных аминов (гистамина и серотонина — медиаторов воспаления), на чем основано применение аллергических диагностических проб.



Серологические исследования

- Реакции иммунитета широко используют для диагностики инфекционных заболеваний у человека.
- Различают реакции, в которых по известным антителам определяют неизвестные антигены, и реакции, направленные на поиск неизвестных антител по известным антигенам.
- Перспективны методы, основанные на обнаружении в ранний период болезни микробных антигенов в различных субстратах.

ДОСТОИНСТВА МЕТОДА:

- высокая специфичность,
- относительная простота,
- доступность, безопасность,
- быстрота получения результатов.
- определение классов Ig чётко характеризует этапы инфекционного процесса

Методы выявления микробных АГ - важный инструмент экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, а количественное их определение в динамике инфекционного процесса служит критерием эффективности проводимой антимикробной терапии.

НЕДОСТАТКИ МЕТОДА: при острых инфекционных заболеваниях обнаружение АТ часто бывает ретроспективным диагнозом, т.к. они появляются в достаточных титрах к 7-8 дню от начала болезни

- Реакция агглютинации (РА) [от лат. agglutinatio, склеивание] позволяет выявить Аг, локализованные на поверхности сравнительно крупных частиц (микроорганизмы, клетки различного происхождения). Механизм РА описывает «теория решётки», согласно которой двухвалентное АТ взаимодействует одним активным центром с детерминантой одной молекулы Аг.

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА)

- В этих реакциях принимают участие **антигены в виде частиц** (микробные клетки, эритроциты и другие корпускулярные антигены), которые склеиваются антителами и выпадают в осадок.



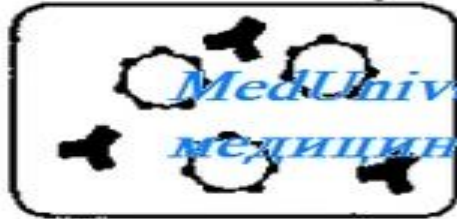
РАЗВЕРНУТАЯ РА

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА)

- Существует два основных метода постановки РА:
- 1) ориентировочная РА на предметном стекле, наступающая в течение нескольких минут. Применяется только с целью идентификации вида (серотипа) выделенной из организма больного чистой культуры по его специфичности как АГ к серотипу АТ;
- 2) развернутая РА в пробирках, которая учитывается через 2 часа выдерживания при 37 °С и на следующий день стояния при комнатной температуре. Применяется с целью идентификации микроба и обнаружения АТ в сыворотке крови.

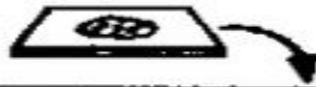
- Для определения АТ в сыворотке крови больного ставят развёрнутую реакцию агглютинации (РА).
- к серии разведений сыворотки (титру) крови добавляют диагностикум
- диагностикум — взвесь убитых микроорганизмов или частицы с сорбированными Аг.
- Максимальное разведение, дающее агглютинацию Аг, называют титром сыворотки крови.

Отрицательная
РА



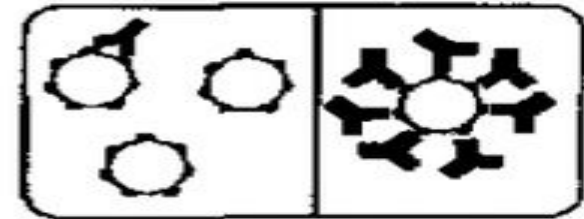
А

Положительная
РА



Б

Феномен прозоны



1

В

2

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА)

Схема реакции агглютинации на стекле

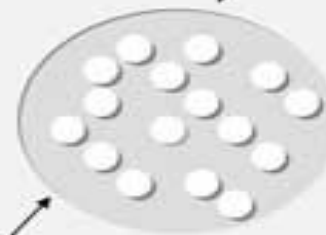
Изотонический раствор

Диагностическая сыворотка (АТ)

1



2



Бактериальная культура (Аг)

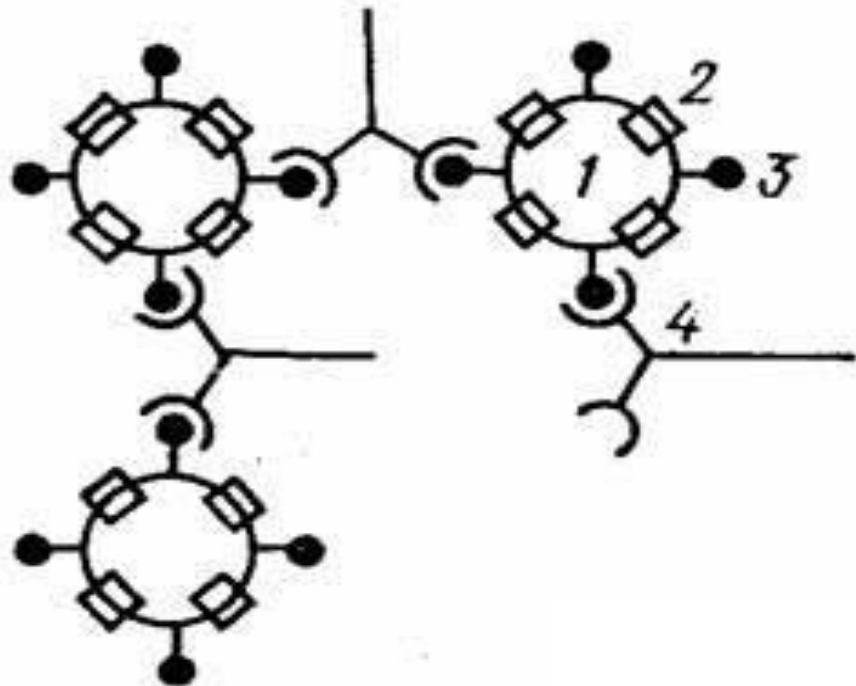
1 - контроль; 2 – агглютинат (хлопья) положительная реакция.

РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ РПГА

- Реакция не прямой, или пассивной, гемагглютинации (РНГА, РПГА) — одна из наиболее чувствительных серологических реакций. Основана на способности АТ взаимодействовать с Аг, фиксированными на различных эритроцитах, которые при этом агглютинируют. Для большей стабильности диагностикумов эритроциты формализируют.
- широко применяют для диагностики инфекционных болезней, установления беременности, выявления повышенной чувствительности к лекарствам

РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ РПГА:

эритроциты (1), нагруженные антигеном (3),
связываются специфическими антителами (4).



Результат РНГА (РПГА)



Положительный («зонтик»)

Отрицательный («пуговка»)

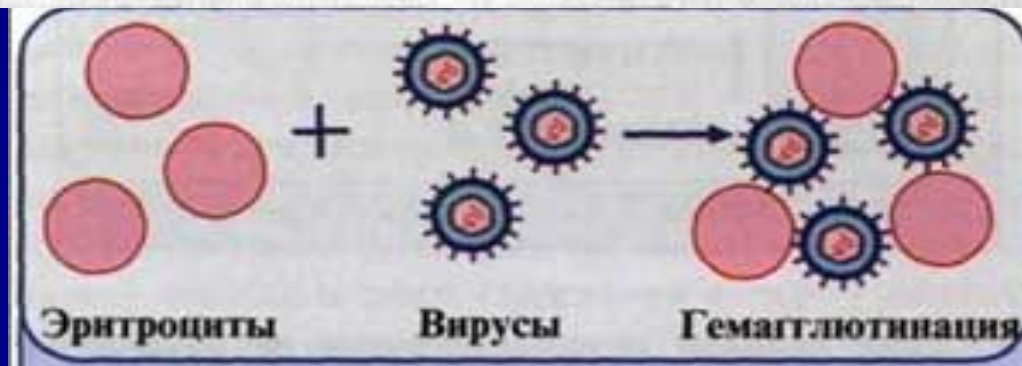
РЕАКЦИЯ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РТГА)

- В отличие от РНГА, включает три компонента; Аг, АТ и Аг (АТ), адсорбированные на эритроцитах.
- Первоначально Аг реагирует с АТ (стандартная антисыворотка), затем в смесь вносят эритроциты, сенсibilизированные аналогичным Аг (или АТ). Если при взаимодействии Аг с АТ в системе не остаются свободные АТ (или Аг), то агглютинации эритроцитарного диагностикума не наблюдают.

РЕАКЦИЯ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РТГА)

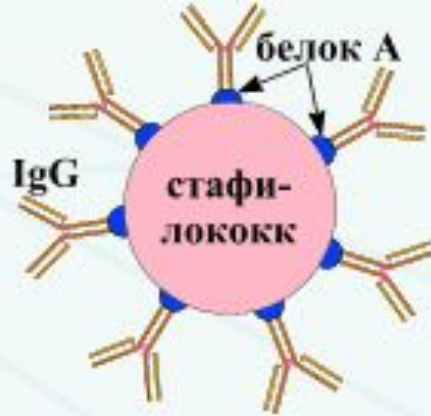
- Используется для определения титров специфических антител к тем или иным вирусам, а также для серологической идентификации и типирования изолятов вирусов из клинического материала от больных.

РЕАКЦИЯ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РТГА)

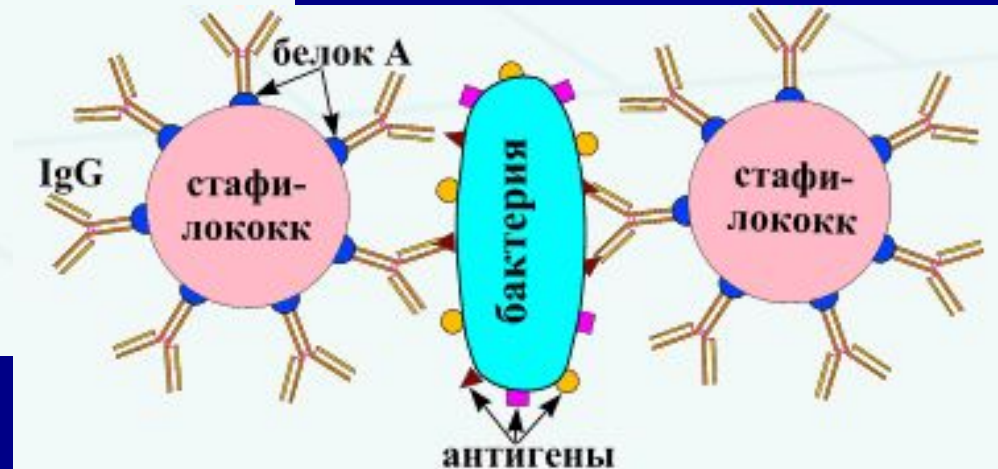


АТ связывают вирусы и нейтрализуют их, лишая возможности агглютинировать эритроциты. Визуально этот эффект и проявляется в «торможении» гемагглютинации.

РЕАКЦИЯ КОАГГЛЮТИНАЦИИ (РКА)



Антительный диагностикум



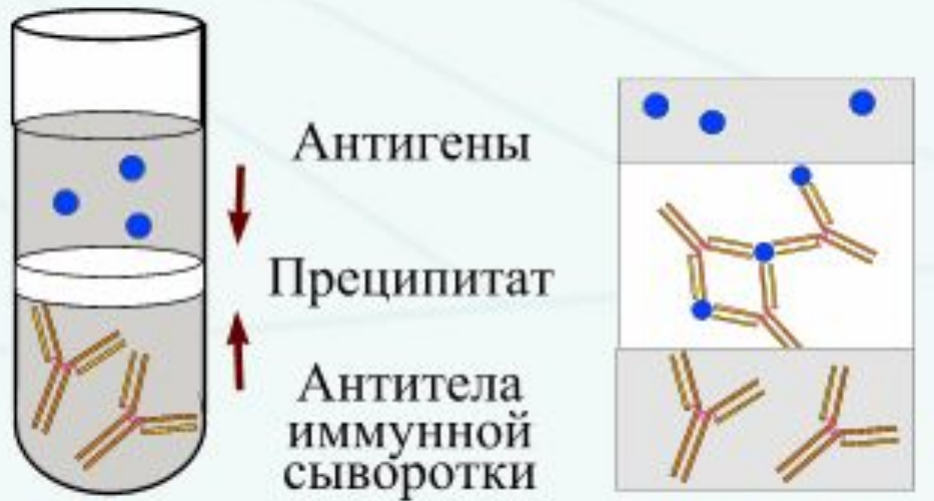
Реакция коагглютинации

применяют для определения антигенов с помощью антител, адсорбированных на белке А клеток стафилококка

Применение реакции коагглютинации перспективно для быстрого обнаружения бактериальных антигенов в крови, спинномозговой жидкости, мокроте и другом материале.

РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ (РП)

основана на феномене образования видимого осадка (преципитата) после взаимодействия растворимых либо находящихся в коллоидном дисперсном состоянии АГ с АТ



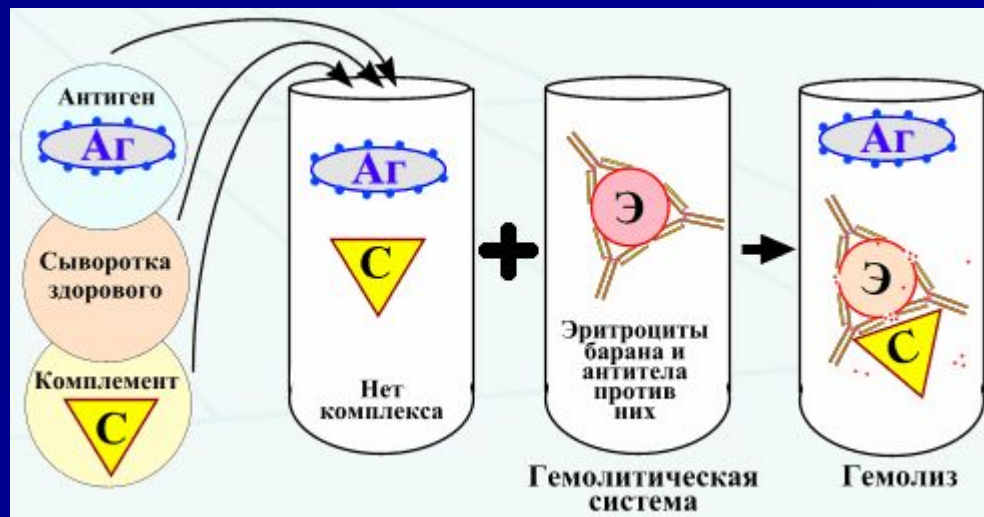
Схемы реакций кольцепреципитации и диффузии в геле.

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)



при соответствии друг другу АГ и АТ происходит связывание комплемента и во 2-й фазе гемолиза сенсibilизированных АТ эритроцитов не произойдет (реакция положительная).

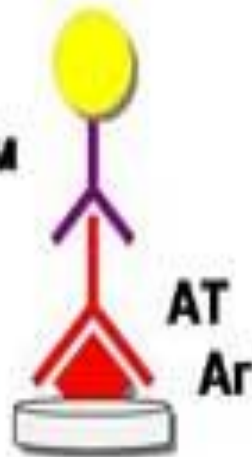
если же комплекс АГ - АТ не образуется, то комплемент остается свободными во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит – антиэритроцитарное АТ, вызывая гемолиз (реакция отрицательная).



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Антитела к АТ,
меченные ферментом



Выявление антител

Антитела к Аг,
меченные ферментом

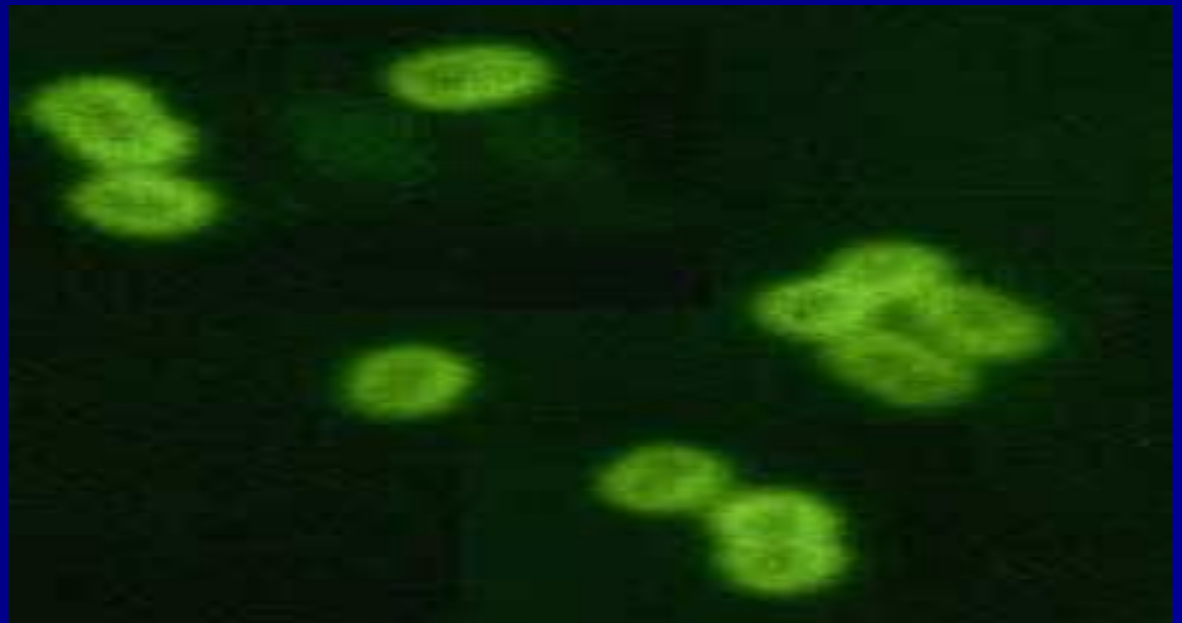


Выявление антигена

Метод основан на специфическом связывании АТ с АГ, при этом один из компонентов конъюгирован с ферментом, в результате реакции с соответствующим хромогенным субстратом образуется окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически.

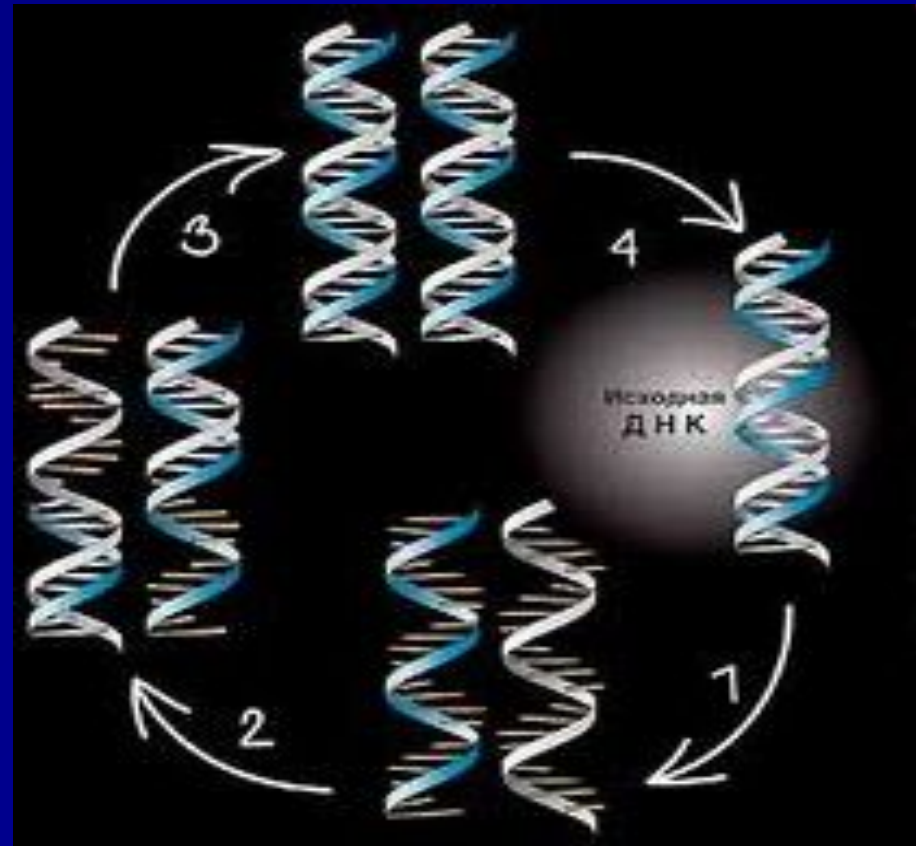
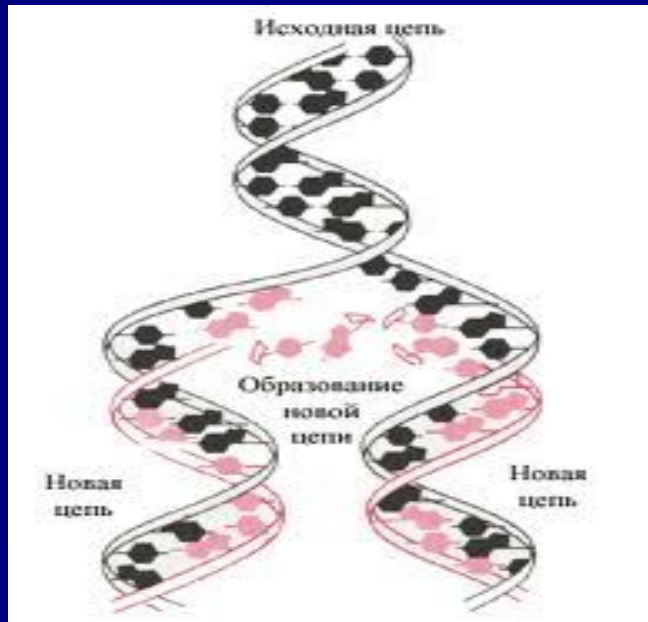
МЕТОД ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ (МФА) или РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ)

Данный метод является экспрессным и высокочувствительным. При прямом методе к исследуемой взвеси микробов, фиксированной на стекле, добавляют сыворотку, меченную флуорохромом. Образующийся комплекс антиген-антитело при освещении ультрафиолетовыми (сине-фиолетовыми) лучами дает **ярко-зеленое** свечение. Светящийся комплекс выявляют при люминесцентной микроскопии



ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

Основу метода составляет многократное образование копий определённого участка ДНК. ПЦР позволяет получить большие количества изучаемого фрагмента ДНК даже в том случае, если в распоряжении исследователя имеется всего лишь одна исходная молекула ДНК. Идентификацию копий ДНК проводят различными методами, например электрофорезом или ИФА



Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

