

Тема: Прикладная ИММУНОЛОГИЯ

ПЛАН ЛЕКЦИИ

1. ПРИНЦИПЫ РЕГИСТРАЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА
2. ФЕНОМЕНЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИГЕН — АНТИТЕЛО
 - 2.1. Реакции взаимодействия антиген — антитело
3. Клеточные методы диагностики инфекционных болезней
4. Иммунные сыворотки и иммуноглобулины
5. Диагностические антигены и аллергены
6. Правила использования и хранения биопрепаратов, их транспортировка.

ПРИНЦИПЫ РЕГИСТРАЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Разнообразие форм иммунного ответа предопределяет широкий набор методов их регистрации. Однако каждой форме иммунореагирования соответствует только свой, определенный набор методов исследования, что важно знать для правильного подбора методов тестирования иммунного состояния организма.

При регистрации антителообразования необходимо учитывать наличие циркулирующих в крови и лимфе антител, секреторных, или местных, образующихся локально слизистыми покровами антител, и антител, содержащихся в клетках-продуцентах.

Сывороточные антитела представлены преимущественно IgG и IgM, которые, как уже указывалось, взаимодействуют в основном с растворимыми и корпускулярными антигенами соответственно.

Следовательно, антитела, ассоциированные с IgG, можно обнаружить при помощи реакций, основанных на феномене преципитации, а связанные с IgM — при помощи реакций, основанных на феномене агглютинации. Антитела, участвующие в формировании феномена преципитации (преципитины) выявляют в реакциях кольцевой преципитации (пробирочная) и преципитации в гелях (пластинчатая). В обоих вариантах ингредиенты реакции должны быть прозрачными, чтобы визуально зарегистрировать образовавшийся преципитат в виде кольца на границе двух сред при постановке пробирочной РП (реакция преципитации) или в виде линий между лунками с реагентами при постановке реакции диффузионной преципитации (РДП). Антитела, участвующие в формировании феномена агглютинации (агглютинины) выявляют в реакциях агглютинации - пробирочной,

пластинчатой, кольцевой в различных вариантах. Агглютинат обычно хорошо виден глазом в форме беловато-сероватых трудно разбиваемых при встряхивании комочков. Для выявления агглютининов в молоке реакцию ставят с подкрашенным антигеном.

Для повышения чувствительности серологических (лат. serum — сыворотка) реакций обычно растворимые антигены закрепляют на какой-либо крупной частице, получая искусственный корпускулярный антиген (например, в реакциях латекс-агглютинации или непрямой гемагглютинации), или вводят вторую, индикаторную систему (например, в реакции связывания комплемента).

Во всех этих реакциях уровень антител определяют в титрах, принимая за последний наибольшее разведение сыворотки, обеспечивающее положительный результат реакции.

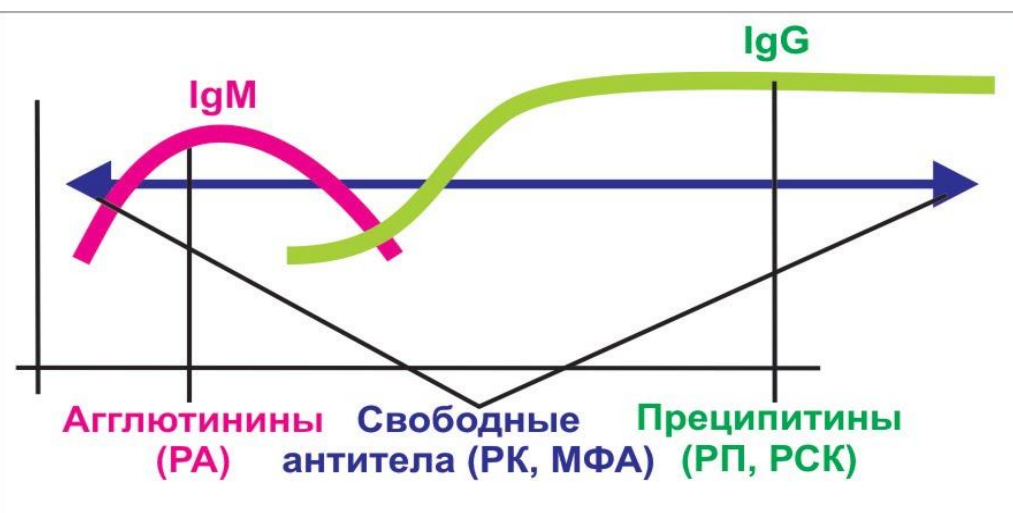
Практически приходится часто использовать целый набор серологических методов диагностики для одной какой-либо болезни. Особенно показателен в этом отношении бруцеллез. Для его диагностики применяют две основные серологические реакции — РА и РСК. Первой выявляют свежие случаи болезни, второй — развитие инфекционного процесса

Диагностические серологические тесты не позволяют строго разграничить вакцинальный и эпизоотический процессы у бруцеллезного скота. Их можно разграничить при исследовании классов иммуноглобулинов в динамике. Если, скажем, через 1,5...2 месяца синтез IgM снизится или заместится синтезом IgG, то это будет характеризовать эпизоотический процесс, связанный с репликацией возбудителя в организме.

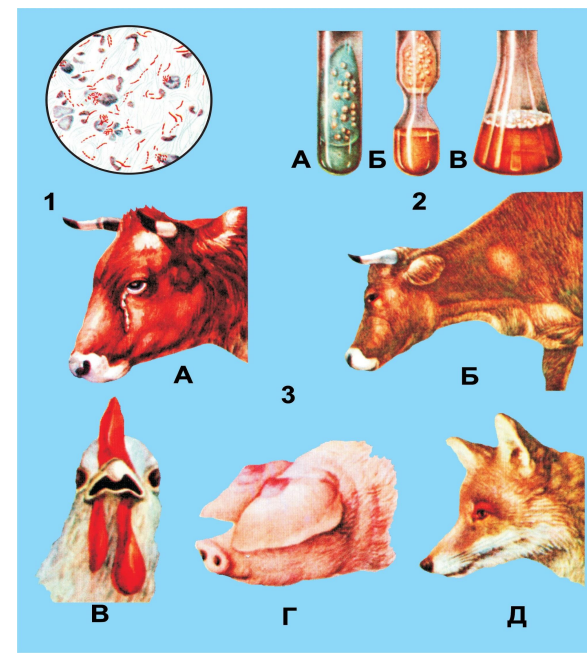
Наличие иммуноглобулинов определенного класса важно исследовать и в других случаях. Количество их устанавливают с помощью методов радиальной иммунодиффузии, а при низкой концентрации — радиоиммуноанализа. Метод радиальной иммунодиффузии основан на прямой зависимости диаметра кольца преципитата, который образуют иммуноглобулин пробы с антисывороткой, смешанной с гелем. Радиоиммуноанализ основан на учете радиоактивного антигена, оставшегося над осадком из-за конкурентного связывания нативного антигена. Последний метод более чувствителен (позволяет определять антиген в пикограммах), но требует специального оборудования и меченых реagens.

При определении титра *секреторных антител* к бактериям используют реакцию агглютинации со слюзью. Уровень секреторных антител не совпадает с содержанием сывороточных антител и в десятки раз превышает последние. Реже обнаруживают *антителопродуцирующие клетки*. Их индицируют при помощи меченых антител или антигенов.

Гиперчувствительность туберкулинового типа (ГТТ) тестируют на животных и лабораторными методами. При определении ГТТ на животных предположительно сенсibilизированным вводят внутрикожно (предпочтительно), подкожно, наносят на скарифицированную кожу или на слизистую оболочку глаз аллерген. В положительном случае через 12...48 ч на месте аппликации последнего развивается продуктивное воспаление, по степени выраженности которого судят о контакте организма с микробом, гомологичным применённому аллергену.



Серологическое тестирование бруцеллезного процесса у рогатого скота



Из лабораторных тестов чаще других используют *реакцию бласттрансформации лимфоцитов* и *реакцию задержки подвижности (миграции) макрофагов*. Реакцию трансформации сенсibilизированных лимфоцитов в бласты (большие клетки с сетчатым хроматином в отличие от глыбчатых бухтовок хроматина зрелых малых лимфоцитов) под действием гомологичного аллергена можно поставить в пенициллиновых флаконах со средой 199. Если через 3...5 дней культивирования лейкоцитов во флаконах с гомологичным аллергеном будет больше лимфобластов, чем во флаконах без аллергена, реакцию считают положительной.

Реакцию миграции макрофагов ставят также в среде 199, которой заливают фиксированные на две чашки Петри капилляры, заполненные тщательно отмытыми лейкоцитами предположительно сенсibilизированного животного. В среде с гомологичным аллергеном миграция макрофагов из капилляров подавляется соответствующим фактором лимфоцитов; в среде, не содержащей гомологичного аллергена, макрофаги выходят и распространяются по дну чашки Петри вокруг выходного отверстия капилляров на гораздо больших площадях. Данная реакция является чувствительным и специфичным тестом на ГЗТ и вместе с реакцией бласттрансформации лимфоцитов используется для диагностики туберкулеза.

ФЕНОМЕНЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИГЕН — АНТИТЕЛО

Знание механизмов взаимодействия антигенов с антителами раскрывает сущность многообразных иммунологических процессов и реакций, возникающих в организме под влиянием патогенных и непатогенных агентов.

При оптимальном соотношении антигена с антителом происходит полное взаимное насыщение всех валентностей и образуются прочные комплексы, выпадающие в осадок. При избытке антител часть активных центров остается свободной и образование комплекса задерживается. В случае избытка антигена возникают рыхлые комплексы и замедляется выпадение осадка. При максимальном избытке антигена, когда связаны все активные центры антитела, образование комплексов прекращается и осадок не выпадает. Специфичность антител, обуславливающая механизм их взаимодействия с антигеном, связана с конфигурацией активных центров, которые должны строго соответствовать детерминантным группам антигена.

Реакция между антителом и антигеном протекает в две стадии, первая — специфическая (непосредственное соединение активного центра антитела с антигенной детерминантой), вторая — неспецифическая, когда отличающийся плохой растворимостью иммунный комплекс антиген—антитело выпадает в осадок. Неспецифическая стадия, как правило, возможна в присутствии растворов электролитов и визуально проявляется по-разному в зависимости от физического состояния антигена. Если антигены корпускулярные, имеет место феномен агглютинации — склеивания различных химических частиц, сенсibilизированных антигенами, и клеток, в том числе микроорганизмов. Образующиеся конгломераты выпадают в осадок, при этом микробные клетки морфологически заметно не меняются: теряя подвижность, они остаются живыми. Антитела, участвующие в реакции агглютинации, называют *агглютинидами*, антигены — *агглютиногенами*, а образующийся агрегированный комплекс — *агглютинатом*. Поскольку антигенная структура микробов разнообразна, в их агглютинации принимают участие антитела разной специфичности.

Тождественность детерминантных участков антигенов микробов разных видов обеспечивает групповые реакции агглютинации с гетерологичными иммунными сыворотками.

Когда в реакции с антителами участвуют растворимые (молекулярные) антигены — белки или их комплексы с углеводами и липидами разного происхождения, бактериальные экстракты, лизаты и фильтраты бульонных культур, наблюдается феномен преципитации — осаждение антигена. Образующийся осадок носит название *преципитата*, антитела — *преципитинов*, а антигены — *преципитиногенов*.

Реакция, происходящая между антителами и антигеном и начинающаяся быстрым соединением детерминантной группы антигена со специфическим активным центром антитела (I стадия), осложняется далее образованием длинных цепей из чередующихся молекул антигена и антител, а также разветвлением этих цепей (II стадия). Во II стадии реакции происходит образование решетки антиген — антитело.

Окончательное формирование системы антиген — антитело протекает намного медленнее, чем I стадия реакции. Это не специфический процесс, в который могут включаться различные посторонние белки, захватываемые решетчатой структурой антиген — антитело и неспособные диффундировать сквозь узкие петли этой решетки в надосадочную жидкость. Скорость образования решетки зависит от температуры, ионной силы раствора и других условий.

Реакции взаимодействия антиген — антитело

Реакции между антигенами и антителами *in vitro*, имеющие диагностическое значение, называли *серологическими* (от лат. serum — сыворотка), так как источником антител служила сыворотка крови. При появлении методов иммунохимического анализа серологические реакции стали одной из широкого набора реакций, выявляющих механизмы взаимодействия между антигенами и антителами.

Антитела в зависимости от свойств антигена и условий взаимодействия с ним обладают нейтрализующим, иммобилизирующим, коагулирующим (осаждающим) и лизирующим (растворяющим) действиями. Нейтрализующее действие проявляется в реакциях нейтрализации токсина антитоксином, иммобилизирующее — в иммобилизации некоторых микроорганизмов, коагулирующее — в реакциях агглютинации и преципитации, лизирующее — в реакциях лизиса и связывания комплемента. Каждая из разновидностей серологических реакций имеет свои варианты, а их постановка — различные модификации, поэтому методические подходы к проведению реакций между антигеном и антителом довольно разнообразны.

Реакция нейтрализации (РН).

Реакции агглютинации (РА).

Реакция преципитации (РП).

Реакция лизиса (РЛ). Лизирующее (растворяющее) действие антител наглядно проявляется в реакциях лизиса и связывания комплемента. В основе реакций лизиса лежит взаимодействие корпускулярных антигенов со специфическими антителами. Иммуноглобулины при содействии комплемента разрушают эритроциты.

Реакция связывания комплемента

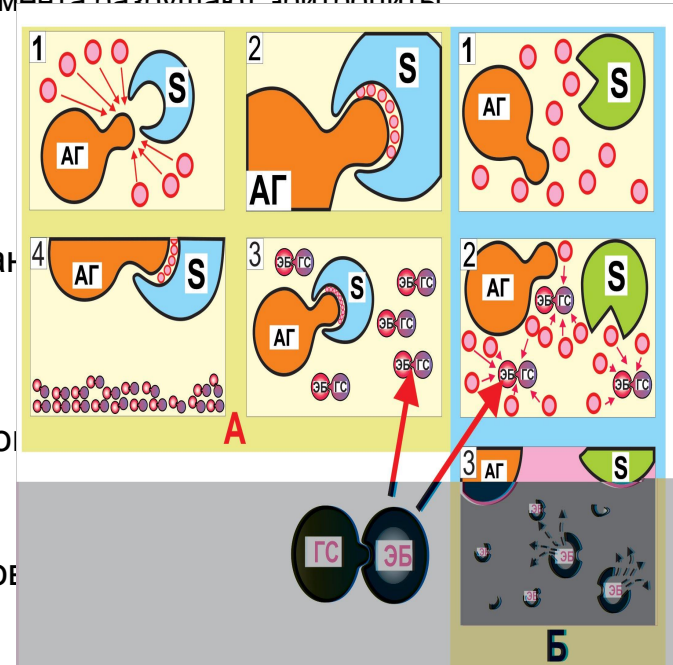
А- положительная реакция (осадок эритроцитов);

Б- отрицательная реакция (гемолиз эритроцитов);

- исследуемая сыворотка; ГС- гемолицин; ЭБ- эритроциты бара

А: 1- участие комплемента в реакции образования комплекса антиген-антитело; 2- расходование комплемента при взаимодействии антигена с антителом; 3- внесение гемолитической системы ; 4- формирование осадка эритроцитов

Б: 1- ввиду не соответствия антигена антителам комплемент остается свободным ; 2- комплемент участвует в лизисе эритроцитов гемוליцином ; 3- высвободившийся из эритроцитов гемоглобин окрашивает раствор в красный цвет (Кисленко В.Н., Руденко И.В., 2010).



Реакция иммунофлуоресценции (РИФ). В основу иммунофлуоресцентного метода положено взаимодействие антигена с антителом, при котором один из компонентов реакции (чаще антитело) обладает способностью к вторичной флуоресценции благодаря предварительному соединению с флуоресцентным красителем. Образовавшиеся таким образом иммунные комплексы становятся хорошо видимыми, ярко светящимися структурами на темном фоне под флуоресцентным микроскопом. В качестве флуоресцентных красителей используют флуоресцеин, изотиоцианат, родамин, В-изотиоцианат, лиссамин-родамин и другие, имеющие реакционно-способные группы (сульфохлорид, изотиоцианат и др.), которые соединяются со свободными аминогруппами молекул антител, не теряя при обработке флуорохромами специфического связывания с соответствующим антигеном.

Прямой и непрямой флуоресцентные методы. Прямой метод основан на непосредственном специфическом соединении антигена с мечеными антителами. Непрямой метод — на поэтапном выявлении комплексов антиген — антитело с помощью флуоресцентных красителей. Первый этап заключается в образовании иммунных комплексов определенного антигена (например, бактериальной клетки) со специфическими антителами (γ-глобулинами) иммунной сыворотки. Второй этап — в выявлении этого комплекса путем обработки его меченым анти-γ-глобулином. Обнаружение иммуноглобулинов иммунофлуоресцентным методом возможно, если антиген, использованный *in vitro* для образования антител, представляет собой растворимый белок. В этом случае он может быть конъюгирован с флуорохромом и в таком виде использоваться для обнаружения гомологичных антител.

Иммуноферментный анализ (ИФА). В основу метода положена конъюгация антитела или гаптена с ферментом, которая не приводит к утрате антителом или гаптенном специфичности, а ферментом — каталитической активности. Однако в составе комплекса антиген — антитело конъюгаты гаптен — фермент или антитело — фермент теряют свою каталитическую активность.

Соединение молекул антигена с ферментом осуществляется с помощью глутаральдегида — бифункционального реагента, взаимодействующего с ε-аминогруппами белковых молекул. В качестве фермента успешно применяют в зависимости от модификации метода либо пероксидазу, β-галактозидазу, щелочную и кислую фосфатазы (реже ацетилхолин, глюкоамилазу), либо лизоцим, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу и малатдегидрогеназу. Используемый для маркировки антител фермент не должен присутствовать в исследуемых клетках, содержащих антиген.

Принцип иммуногистохимического анализа с использованием ферментов заключается в следующем. Антитела, маркированные ферментом, соединяются со специфическим антигеном, фиксированным на твердом носителе (полистироловая пластина или другие непористые полимеры), образуя невидимый комплекс. Выявление иммунных комплексов, содержащих фермент, проводится с помощью цветной реакции, происходящей при добавлении ферментспецифического субстрата. Окрашенный комплекс антиген — антитело выявляется в световой или электронной микроскопии

Схема ИФА: 1 этап-внесение антигена, 2 этап- добавление исследуемой сыворотки, 3 этап-внесение противоглобулиновой сыворотки, меченой ферментом (Ф), 4 этап-учет реакции.

Радиоиммунологический анализ (РИА).
В радиоиммунологическом анализе специфичность реакции антиген-антитело сочетается с высокой чувствительностью, обеспечиваемой применением радиоактивной метки, благодаря которой можно определить количество азота антител до $1 \cdot 10^{-8}$ мг/мл. Для проведения анализа необходимо иметь антисыворотки и гомологичные антигены, маркированные каким-либо изотопом йода (^{125}I , ^{131}I), равно как и гаптены, маркированные ^{14}C или ^3H .

