

ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Титова Татьяна Николаевна
Кафедра лабораторной диагностики ИПО БГМУ

Уфа-2013

Реакции антиген-антитело

- основа диагностических реакций.

Фазы реакции:

- **специфическая фаза** - быстрое специфическое связывание активного центра антитела с детерминантой антигена.
- **неспецифическая фаза** - более медленная, проявляется видимыми физическими явлениями (образование хлопьев, помутнения); требует наличия определенных условий (электролитов, оптимального pH среды).

Прочность и количество связавшегося антигена зависят от свойств антител:

**аффинности,
валентности,
авидности.**

Серологические методы

(от лат. *serum* — сыворотка и *logos* — учение)

– методы изучения антител и антигенов с помощью реакций антиген-антитело, определяемых в сыворотке крови и других жидкостях, а также тканях организма.

ЦЕЛИ:

- **постановка диагноза** (обнаружение в сыворотке больного антител против антигенов возбудителя);
 - **идентификация антигенов** микробов, биологически активных веществ, групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, иммунных комплексов, рецепторов клеток и др. (с помощью диагностических сывороток).
-

Виды серологических реакций:

- агглютинации,
- преципитации,
- нейтрализации,
- р-ии с участием комплемента,
- р-ии с использованием меченых антител и антигенов (радиоиммунологический, иммуноферментный, иммунофлюоресцентный методы).

Различаются

- по регистрируемому эффекту,
- технике постановки.

Характеризуются **высокой чувствительностью и специфичностью.**

Реакция агглютинации

(от лат. *agglutinatio* - склеивание)

- реакция связывания антителами корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов или других клеток, нерастворимых частиц с адсорбированными на них антигенами, макромолекулярных агрегатов).

Протекает при наличии электролита (изотонического раствора NaCl)

Проявляется образованием хлопьев или осадка.

Применение:

- 1) определение антител в сыворотке крови больных (при бруцеллезе - реакции Райта, Хеддельсона, при брюшном тифе и паратифах -реакция Видаля и т.д.);
 - 2) определения возбудителя, выделенного от больного;
 - 3) определения групп крови с исп-ем моноклональных антител.
-

Схема реакции агглютинации



Ориентировочная реакция агглютинации

Определение (серотипирование) возбудителя, выделенного от больного.

На предметном стекле:

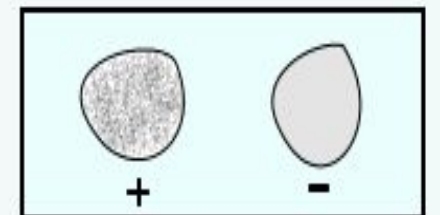
капля диагностической агглютинирующей сыворотки
(антитела) в разведении 1:10 или 1:20

+

чистая культура возбудителя, выделенного от больного.

Контроль: вместо сыворотки - каплю раствора натрия хлорида.

При появлении хлопьевидного осадка ставят *развернутую реакцию агглютинации*



Агглютинация
положительная Контроль
(нет агглютинации)

Развернутая реакция агглютинации

Определение (серотипирование) возбудителя, выделенного от больного.

Разведения агглютинирующей сыворотки

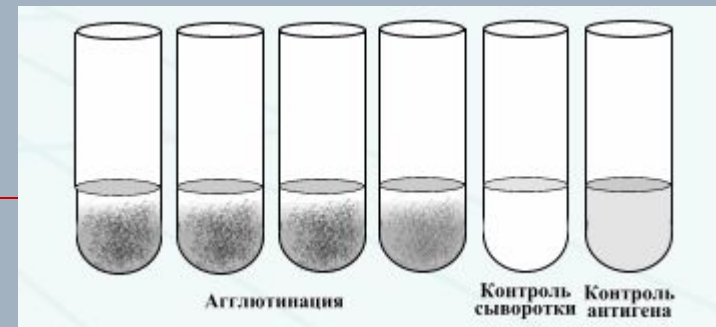
+

2—3 капли взвеси возбудителя.

Агглютинацию учитывают по количеству осадка и степени просветления жидкости.

Реакция положительная, если агглютинация отмечается в разведении, близком к титру диагностической сыворотки.

Контроли: сыворотка + р-рNaCl - должна быть прозрачной, взвесь микробов + р-рNaCl - равномерно мутной, без осадка.



Развернутая реакция агглютинации.

Определение у больного антител.

Разведения сыворотки крови больного

+

Диагностикум (взвесь убитых микробов)

инкубация при 37 °С

Отмечают наибольшее разведение сыворотки (титр сыворотки), при котором произошла агглютинация (осадок).

Характер и скорость агглютинации зависят от вида антигена и антител:

***O*-диагностикум**

(бактерии, убитые нагреванием, => *O*-антиген)

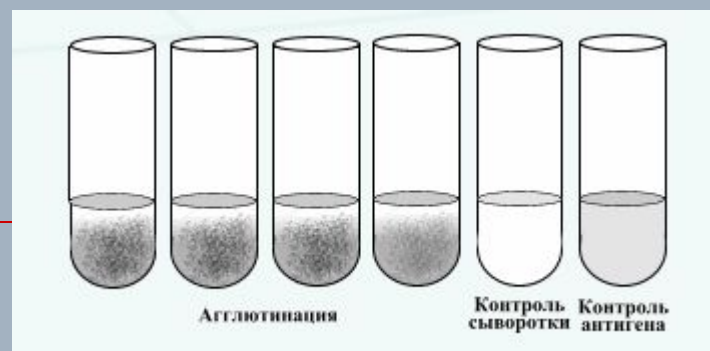
- мелкозернистая агглютинация.

***H*-диагностикум**

(бактерии, убитые формалином, => *H*-антиген)

- крупнохлопчатая агглютинация,

протекает быстрее.



Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА)

Определение у больного антител.

Сыворотка больного

+

Антигенный эритроцитарный диагностикум

(эритроциты с адсорбированными на них антигенами).

Результат: склеивание и выпадение эритроцитов на дно ячейки в виде фестончатого осадка.

Отрицательная реакция: эритроциты оседают в виде «пуговки».

Реакция обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА)

Например, обнаружение ботулинического токсина (+эритроцитарный антительный ботулинический диагностикум).

Применение РНГА:

- диагностика инфекционных болезней,
 - определения гонадотропного гормона в моче (беременность),
 - выявление повышенной чувствительности к лекарственным препаратам, гормонам и др.
-

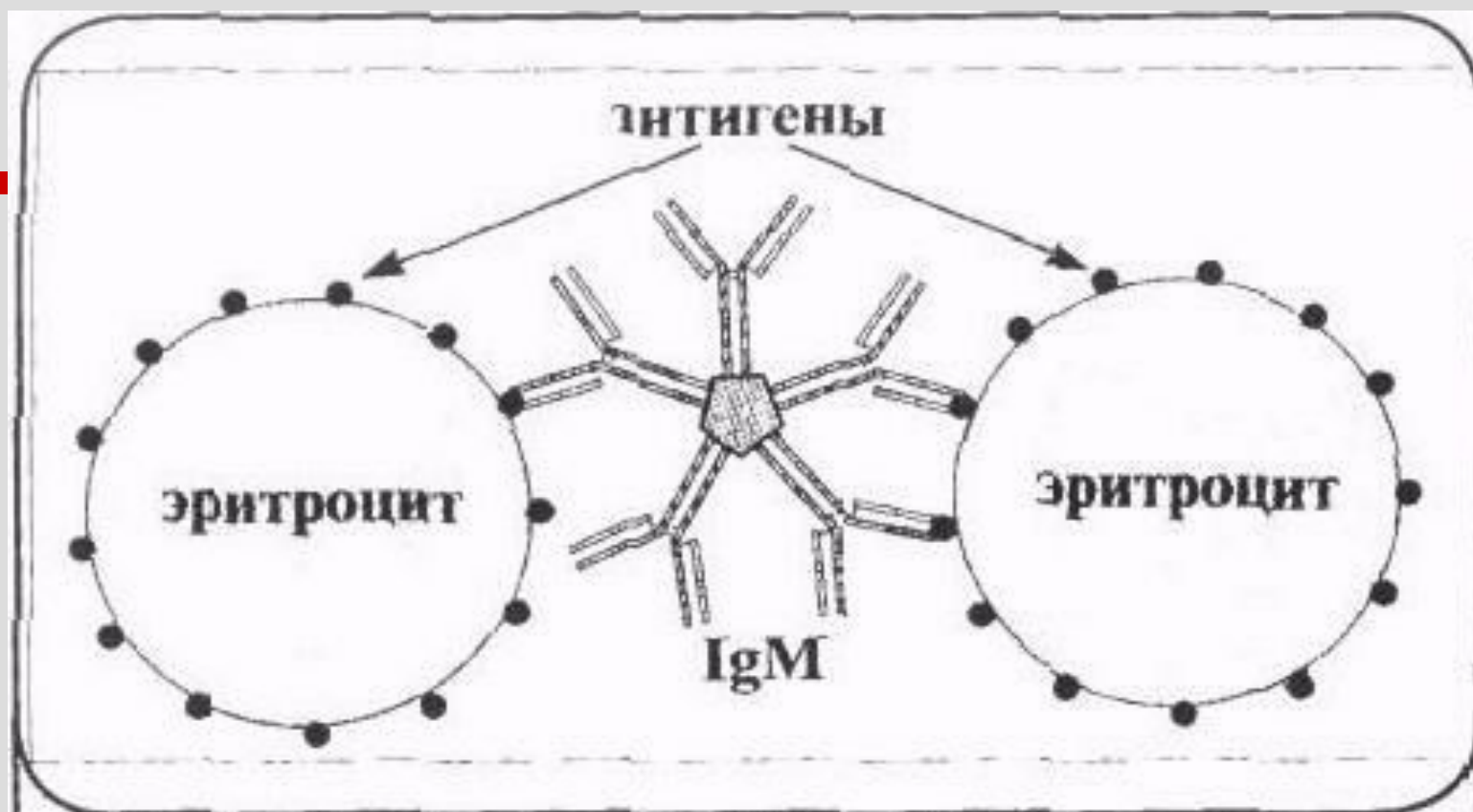


Рис. 13.2. Схема реакции не прямой (пассивной) гемагглютинации.

Реакция коаггутинации.

Принцип: стафилококки, содержащие белок А, имеющий сродство к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, неспецифически адсорбируют антимикробные антитела, которые затем взаимодействуют активными центрами с соответствующими микробами, выделенными от больных.

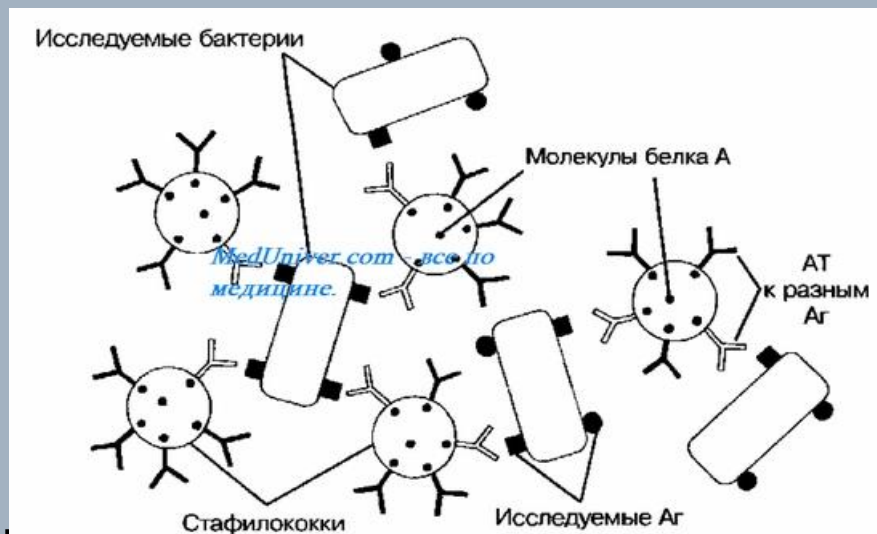
Стафилококки

+

Иммунная диагностическая сыворотка (предварительно)

+

Микробы, выделенные от больных (антигены)



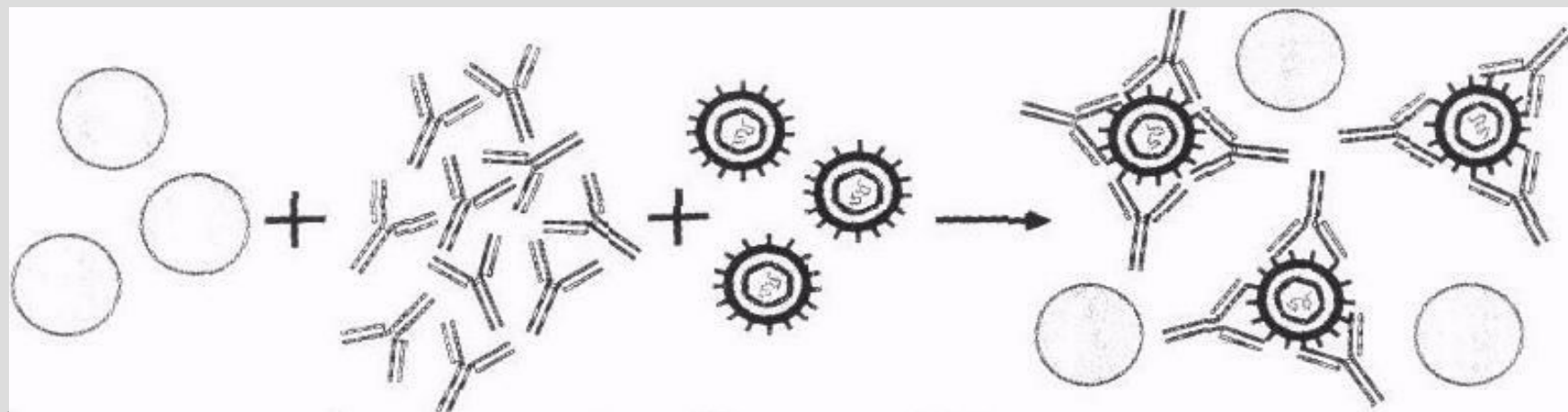
Результ: хлопья, состоящие из стафилококков, антител диагностической сыворотки и определяемого микроба.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Принцип: блокирование антигенов вирусов антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты.

Применение: диагностика многих вирусных болезней, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита и др.) могут агглютинировать эритроциты различных животных.

Вирусы



Эритроциты
животного

Антивирусные АТ

Нейтрализация вирусов

Реакция агглютинации для определения антирезусных антител (непрямая реакция Кумбса)

Обнаружение неполных антител.

Они специфически взаимодействуют с резусположительными эритроцитами (антигены), но не вызывают их агглютинации.

антирезусные антитела

+

резус-положительные эритроциты

+

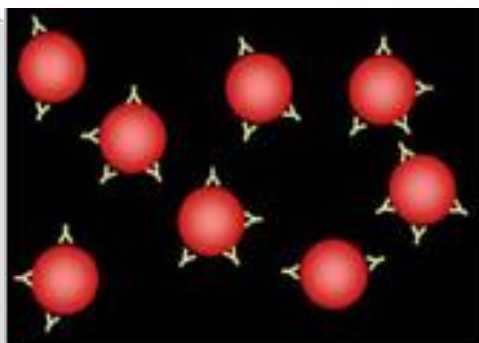
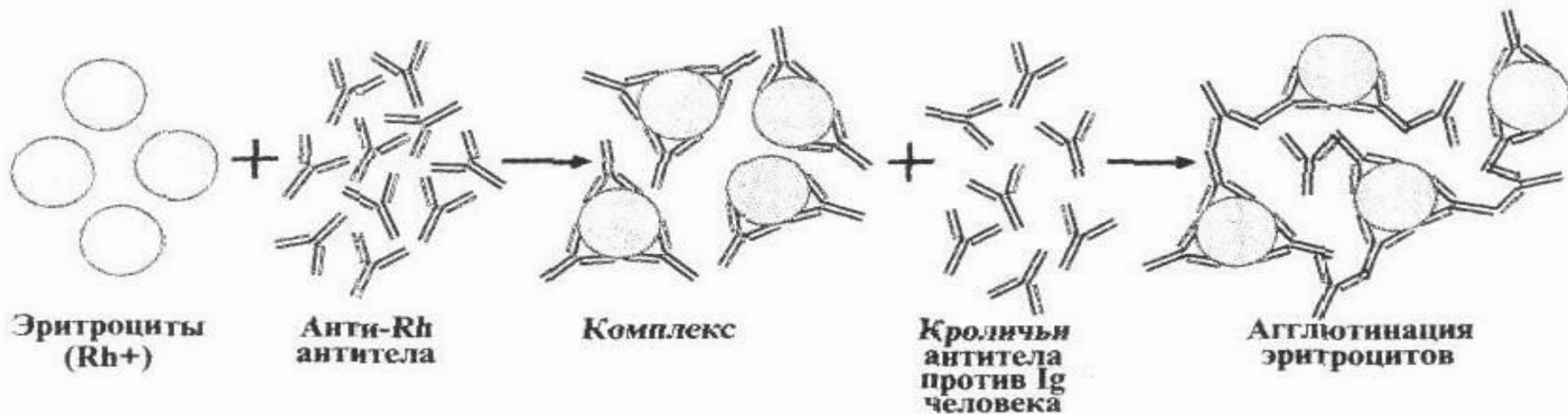
антиглобулиновая сыворотка

(антитела против иммуноглобулинов человека)

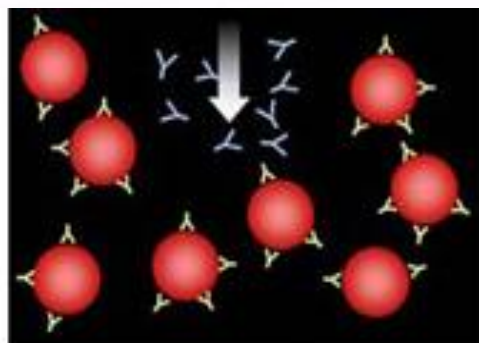
Результат: агглютинация эритроцитов.

Применение: диагностика патологических состояний, связанных с внутрисосудистым лизисом эритроцитов (ГБН: эритроциты резус-положительного плода соединяются с циркулирующими в крови неполными антителами к резус-фактору, которые перешли через плаценту от резус-отрицательной матери).

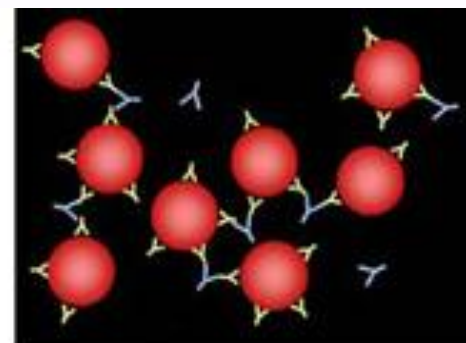
Схема реакции Кумбса



антитела, фиксированные на поверхности эритроцитов



добавление антиглобулиновой сыворотки



агглютинация эритроцитов

Реакция преципитации (от лат. *praecipito* - осаждать)

- формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения (*преципитата*).

Образуется при смешивании АГ и АТ в эквивалентных количествах (избыток одного из них снижает уровень образования иммунного комплекса).

Варианты постановки:

- в пробирках,
 - в гелях,
 - в питательных средах и др.
-

Реакция кольцепреципитации.

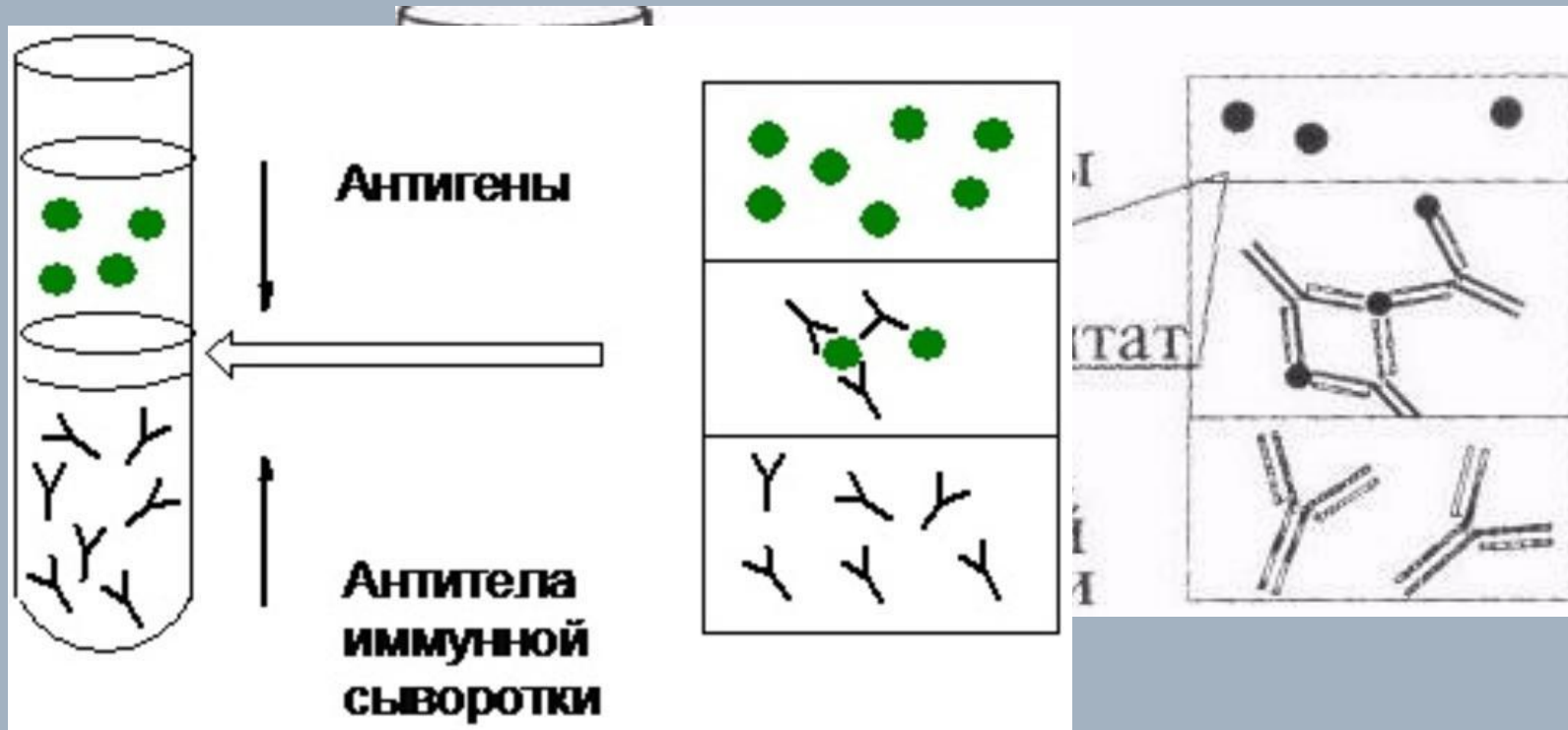
Проводят в узких преципитационных пробирках:

на иммунную сыворотку наслаивают растворимый антиген.

Результат: образуется непрозрачное кольцо преципитата

Реакция Асколи (при сибирской язве)

В качестве антигенов - прокипяченные и профильтрованные водные экстракты органов или тканей.



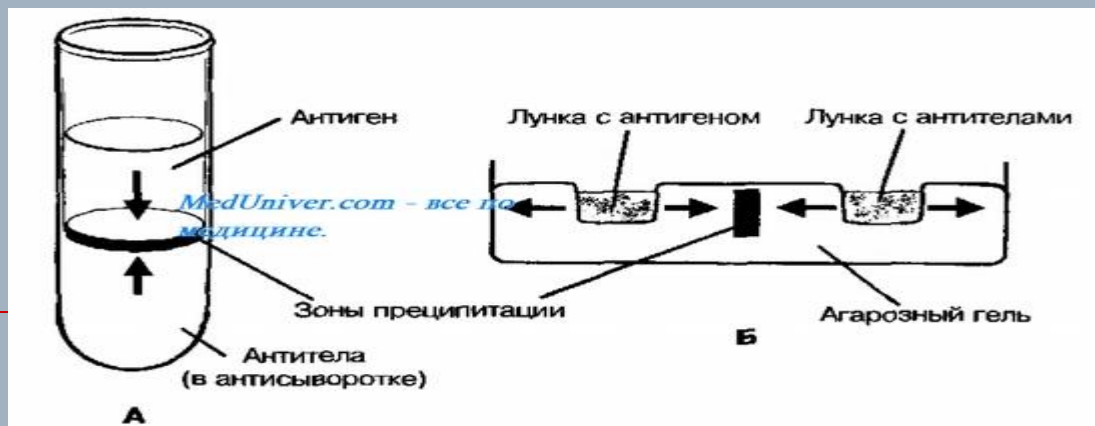
Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони.

Постановка:

1. растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку
2. после затвердевания в геле вырезают лунки (2-3 мм).
3. в лунки отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу.

Результат: в месте встречи образуется преципитат в виде белой полосы. (у идентичных антигенов линии преципитата сливаются; у неидентичных – пересекаются).

Применяется для обнаружения дифтерийной палочки.



Реакция радиальной иммунодиффузии.

Постановка:

1. иммунная сыворотка + расплавленный агаровый гель равномерно наливают на стекло.
2. после застывания делают лунки
3. в лунки помещают антиген.

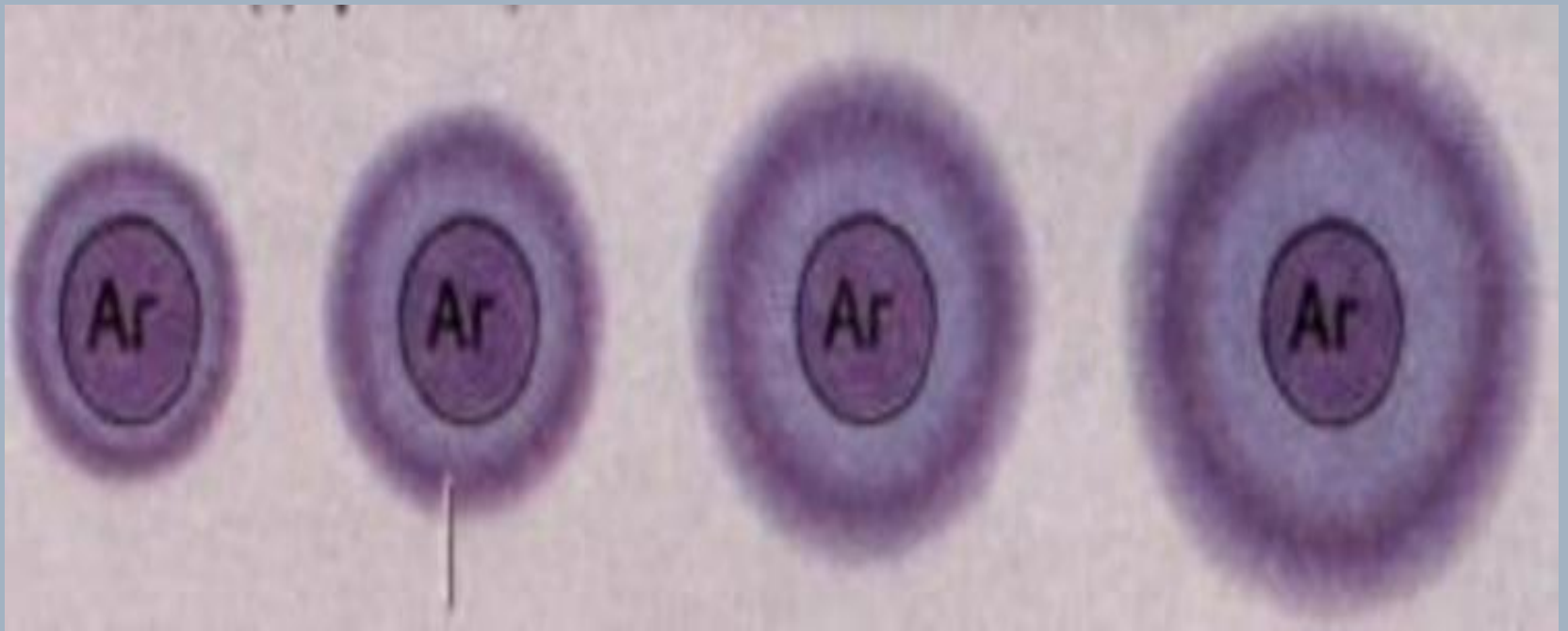
Результат: образование кольцевых зон преципитации вокруг лунок. Диаметр кольца пропорционален концентрации антигена.

Используется для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента и др.

Реакция радиальной иммунодиффузии по Манчини



Реакция радиальной иммунодиффузии по Манчини



Реакции с участием комплемента

- основаны на активации комплемента комплексом АГ-АТ.
-

Реакция связывания комплемента (РСК)

Принцип:

**АГ-АТ(Fc-фрагмент) + Комплемент = связывание
Комплемента.**

Постановка в две фазы:

1-я фаза - инкубация смеси антиген + антитело + комплемент;

2-я фаза (индикаторная) - выявление в смеси свободного комплемента; добавляем гемолитическую систему (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка с антителами к ним).



Оценка результатов:

- **реакция отрицательная** – свободный комплемент + комплекс эритроцит - антиэритроцитарное антитело = **гемолиз**;
- **реакция положительная** - связанный комплемент не вызывает гемолиза.

Применение РСК - диагностика инфекционных болезней (сифилис - реакция Вассермана, гонококки – реакция Борде-Жанга)

Реакции иммунного лизиса

Принцип:

АТ-АГ + комплемент = лизис клеток

(активация системы комплемента по классическому пути).

Разновидности:

- реакция гемолиза
 - реакция бактериолиза
-

Реакция радиального гемолиза (РРГ)

Постановка:

1. гель из агара + эритроциты барана (с адсорбированными антигенами вируса) + комплемент
2. делаем лунки
3. вносим в лунку сыворотку больного (АТ против вируса)

Результат: вокруг лунки образуется зона гемолиза.

Определяем антитела в сыворотке крови у больных гриппом, краснухой, клещевым энцефалитом.

Реакция бактериолиза

Принцип: антитела-лизины в присутствии комплемента способны растворять микробы и другие клеточные элементы.

Постановка: сыворотку б-го разводим бульоном
+
взвесь живых холерных вибрионов

Результат: бульон прозрачный (произошел лизис микробов)
Применяется для диагностики холеры.

Реакции с использованием меченых антител или антигенов

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

Основные разновидности метода:

- прямой,
- непрямой,
- с компонентом.

Является методом экспресс-диагностики для выявления антигенов микробов или определения антител.

Прямой метод РИФ

Принцип: АГ + АТ (меченные флюорохромами) = АГ-АТ
светится
в УФ-лучах люминесцентного микроскопа.

Результат: бактерии в мазке светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.

Непрямой метод РИФ

Принцип: выявление АГ-АТ с помощью антиглобулиновой сыворотки, меченной флюорохромом.

Постановка:

1. мазок из взвеси микробов + диагностическая сыворотка (антитела)
2. антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают
3. АГ-АТ + антиглобулиновая (против АТ) сыворотка, меченная флюорохромами

Результат: образуется комплекс **АГ-АТ-антиАТ(флюорохром)**, который наблюдают в люминесцентном микроскопе.

Преимущества: можно применять разные диагностические сыворотки.

Прямой метод



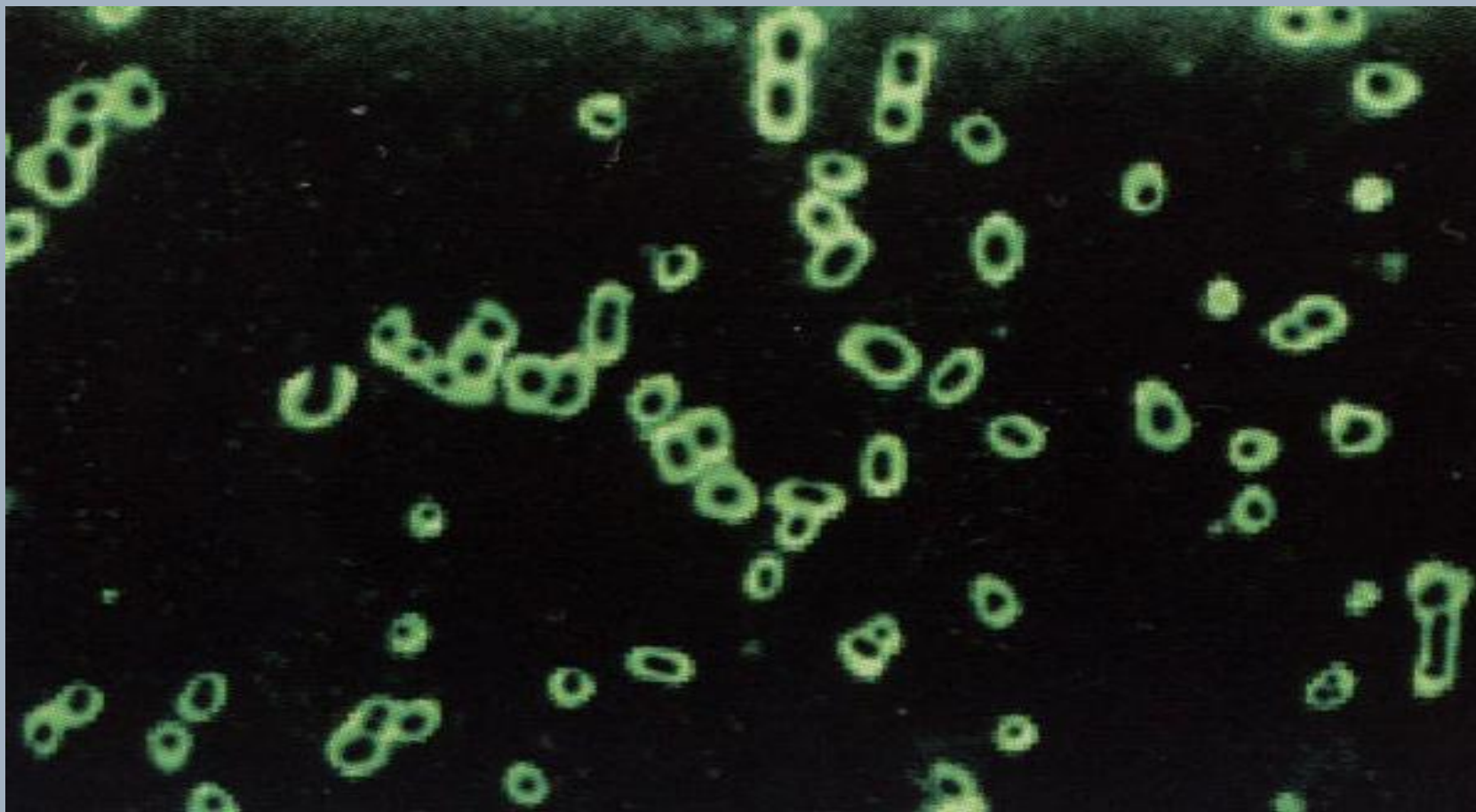
Непрямой метод



Рис. 13.10, а,б. Схема реакции прямой (а) и непрямой (б) иммунофлюоресценции.

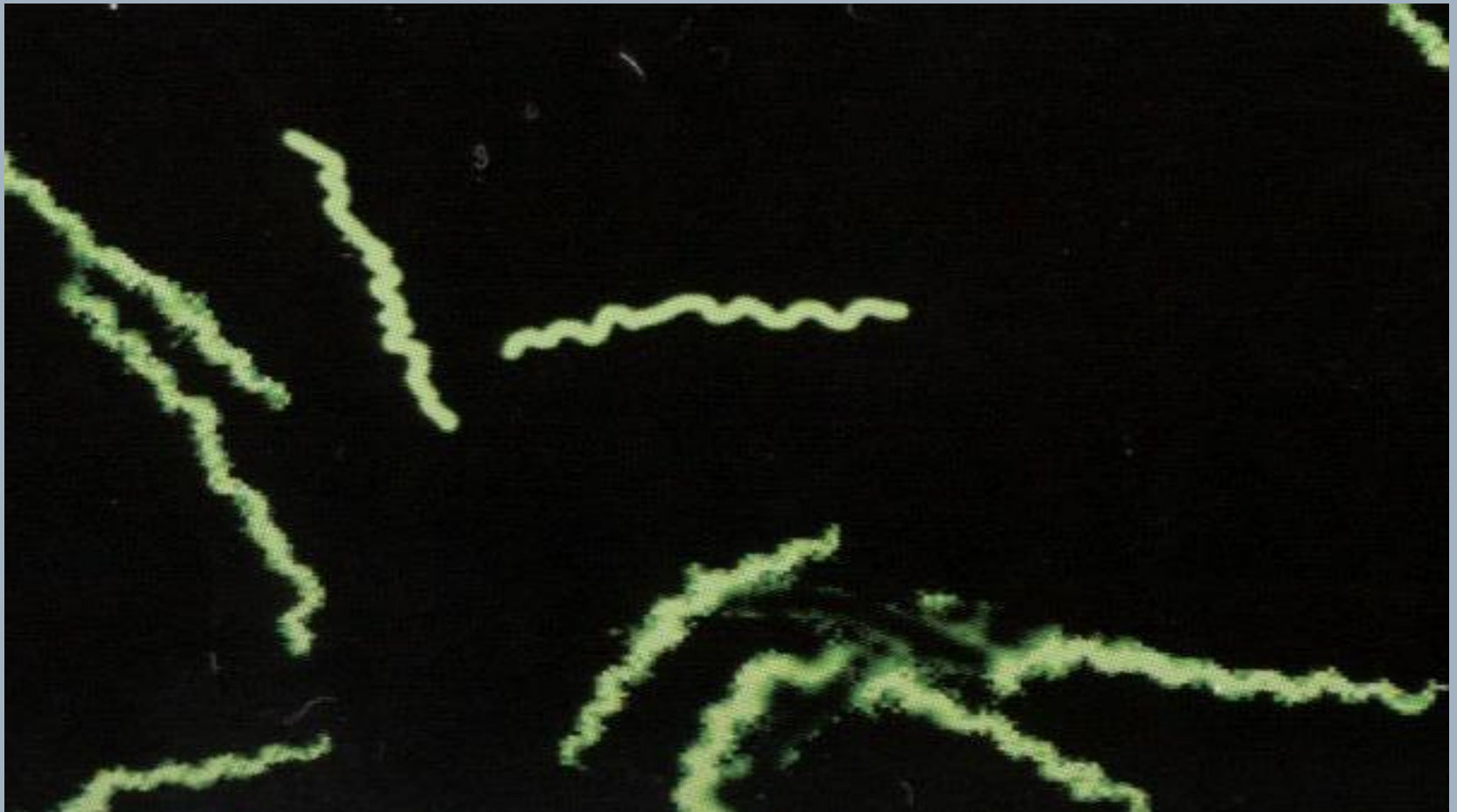
Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

Препарат риккетсий



Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

T.pallidum



Иммуноферментный анализ (ИФА)

Принцип: выявление АГ с помощью АТ+фермент-метка (пероксидаза хрена, бета-галактозидаза или щелочная фосфатаза).

АГ-АТ-фермент + Хромоген -> изменение цвета продукта реакции

Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

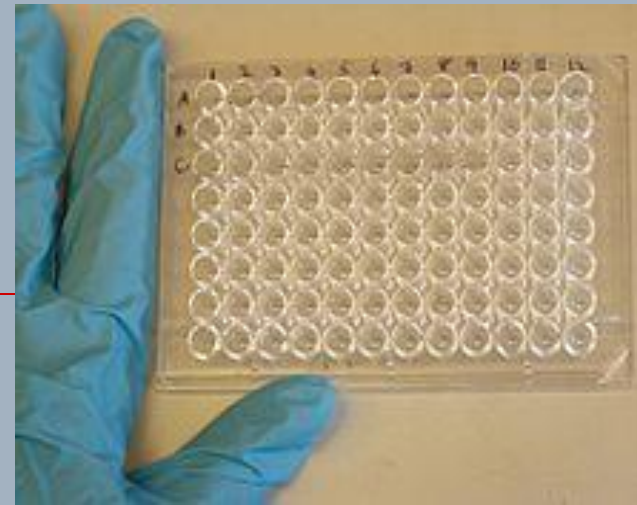


Применение:

- диагностика вирусных, бактериальных и паразитарных болезней (ВИЧ-инфекций, гепатита В и др.),
 - определени гормонов, ферментов, лекарственных препаратов, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях.
-

Твердофазный ИФА

Принцип: один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитела) сорбирован на твердом носителе (в лунках планшеток из полистирола).



Постановка: в лунки планшеток с сорбированным антигеном
+
сыворотка больного
+
антиглобулиновая сыворотка (меченная ферментом)
+
хромоген.

После добавления очередного компонента - тщательная промывка (удаление несвязавшихся реагентов)

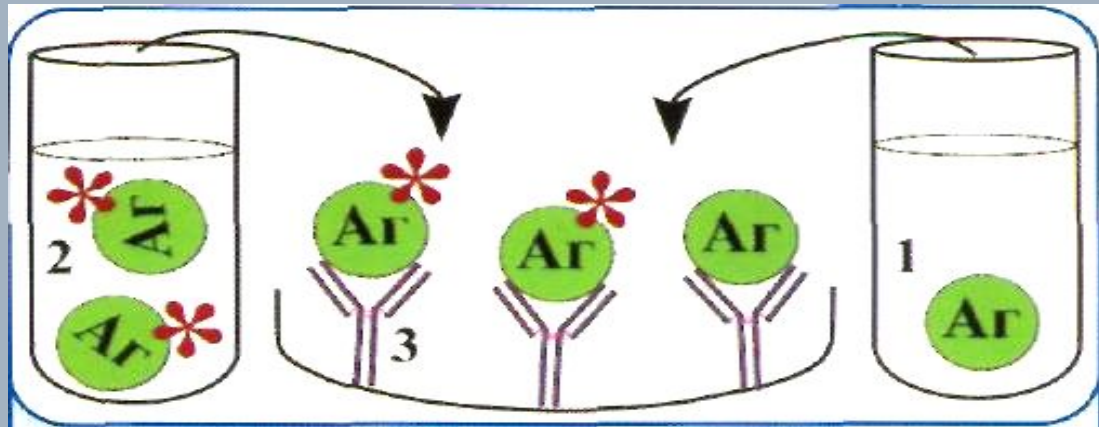
Результат: изменение цвета раствора хромогена.

Конкурентный вариант ИФА

Принцип:

- искомый АГ и меченный ферментом АГ конкурируют друг с другом за связывание ограниченного количества антител иммунной сыворотки,
- искомые АТ и меченые АТ конкурируют друг с другом за антигены.

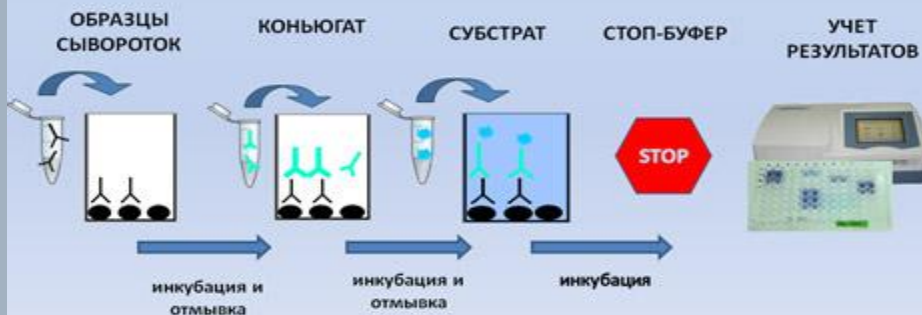
Интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.



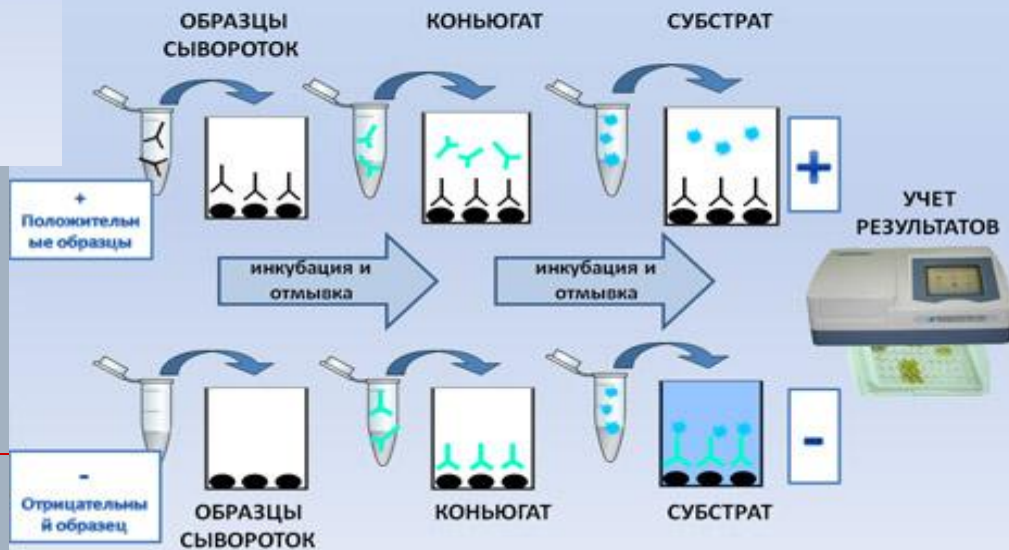
Твердофазный ИФА

(конкурентный и неконкурентный)

Непрямой вариант ИФА



Коммерческие наборы ИФА (INGENASA)



Радиоиммунологический анализ (РИА)

Принцип: применение антигенов или антител, меченных радионуклидом. Образуется радиоактивный ИК. Его радиоактивность определяют в соответствующем счетчике (бета- или гамма-излучение).

Интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул АГ и АТ.

Модификации:

твердофазный РИА

конкурентный РИА.

Метод представляет определенную экологическую опасность.

Иммуноблоттинг (от англ. blot, пятно)

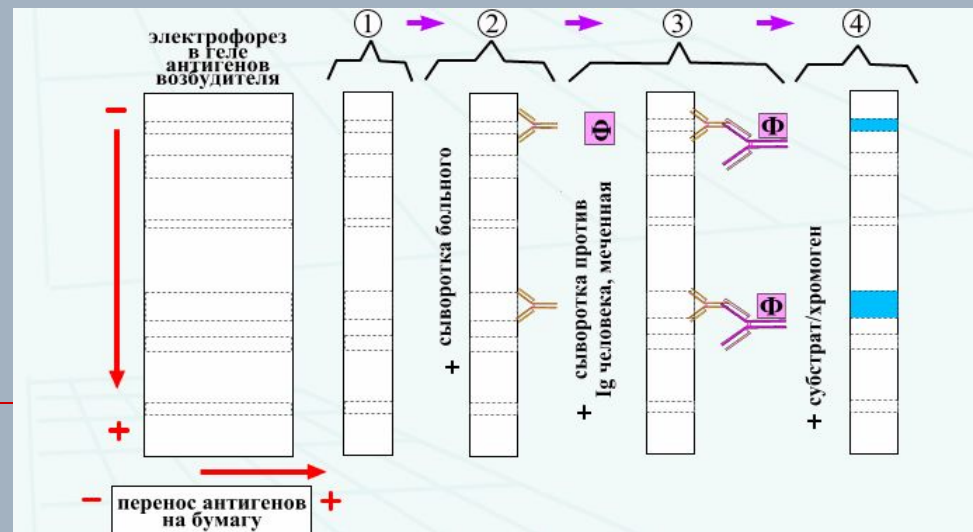
- сочетание электрофореза и ИФА или РИА.
Высококчувствительный метод

Принцип. Антиген выделяют с помощью электрофореза и переносят его на активированную бумагу или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ИФА.

Постановка: полоски с «блотами» антигенов
+
сыворотка больного
+
антииммуноглобулиновая сыворотка (фермент)
+
хромоген

Результат: изменение окраски хромогена под действием фермента

Используется как диагностический метод при ВИЧ-инфекции и др.



СПАСИБО за ВНИМАНИЕ!

