

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Серологические реакции – это реакции между антигенами и антителами **in vitro** .

Цели применения:

- серодиагностика бактериальных и вирусных инфекционных заболеваний;
- сероидентификация выделенных культур различных микроорганизмов (определение родовой, видовой и типовой принадлежности микроорганизма или его антигенов с известными иммунными сыворотками);
- идентификация видовой принадлежности белков (выявление фальсификации мясных и рыбных изделий).

Классификация серологических реакций в зависимости от характера и физического состояния антигена

- **Прямые** серологические реакции, основанные на прямом взаимодействии антигена с антителом (агглютинация, преципитация).
- **Опосредованные** реакции – реакции со свидетелями (реакция непрямой гемагглютинации, реакция связывания комплемента).
- **Реакции с использованием меток** (ферментных, флюоресцирующих и т.д.) для антигена или антитела (иммуноферментный анализ, реакция иммунофлюоресценции, радиоиммунный анализ).

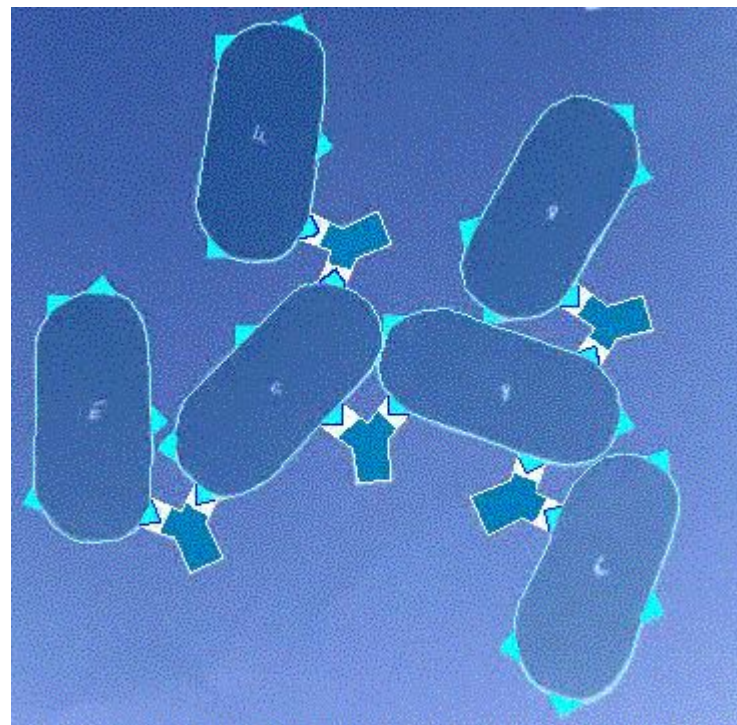
- **Титр сыворотки** – это наиболее высокое разведение сыворотки (наименьшее количество антител), при котором данная серологическая реакция будет положительной.
- **Специфичность** серологической реакции – способность **антигена** реагировать только с гомологичным **антителом**.
- **Чувствительность** серологической реакции - минимальное количество антигенов или антител, которое можно выявить с помощью данной реакции.

Серологические реакции

- 1. Реакция агглютинации**
- 2. Реакция преципитации**
- 3. Реакции нейтрализации**
- 4. Реакция связывания комплемента**
- 5. Реакция иммунофлюоресценции**
- 6. Радиоиммунологический анализ**
- 7. Иммуноферментный метод (ИФА)**

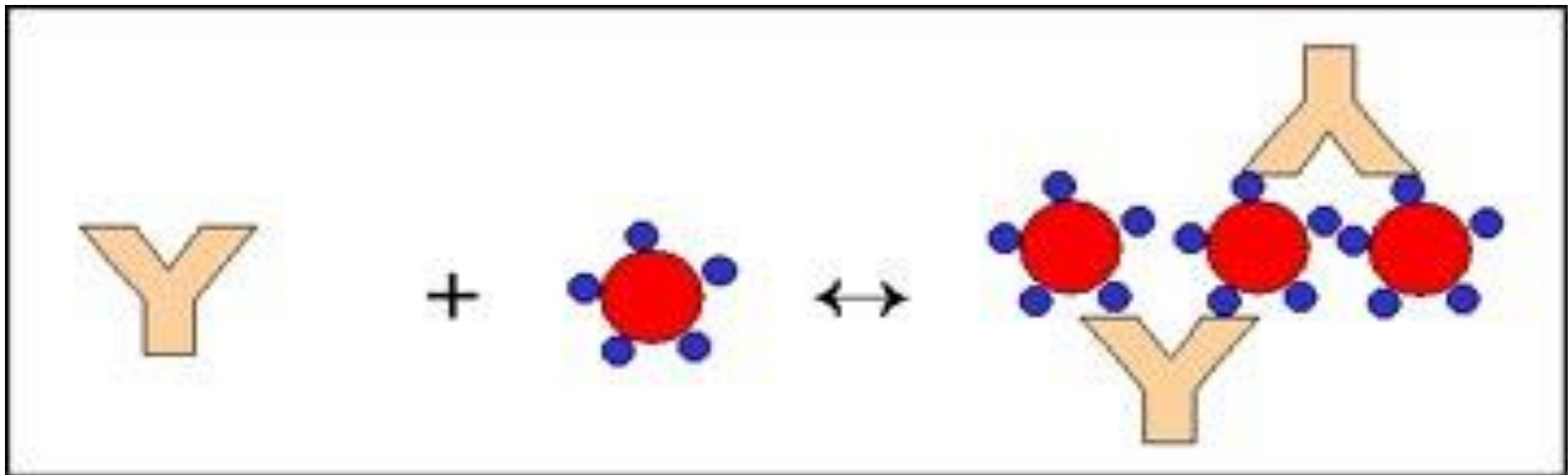
Реакция агглютинации

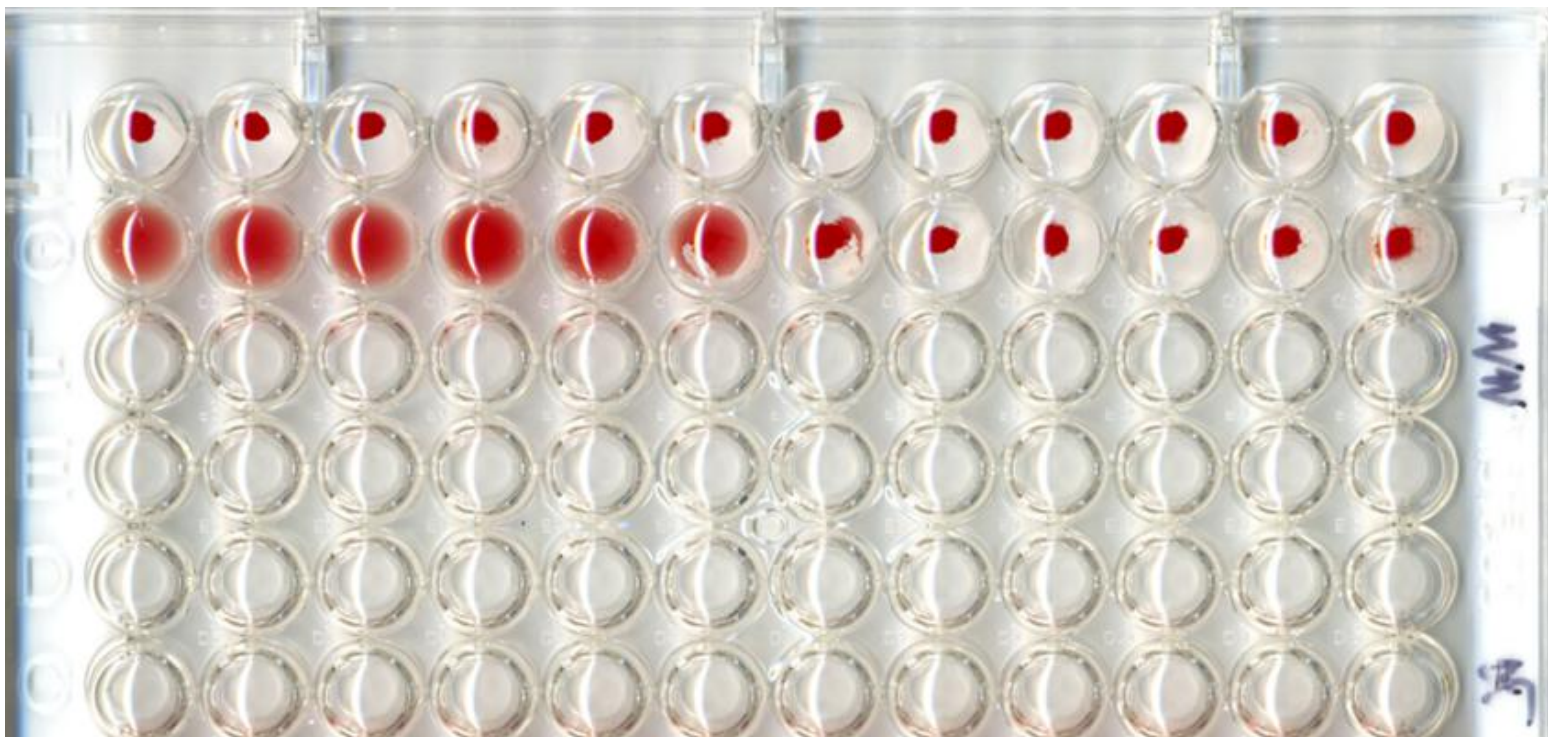
Реакция агглютинации (agglutinatio - склеивание) - **склеивание и выпадение в осадок** корпускулярных антигенов: бактерий, эритроцитов, а также латексных частиц с адсорбированными на них антигенами под влиянием антител в среде с электролитом.



Реакция непрямой геммагглютинации

РНГА применяют в двух вариантах: с известными антигеном для обнаружения **антител** или с известными антителами для выявления **антигена**. Для постановки РНГА используют **эритроцитарные диагностикумы**, приготовленные путем адсорбции на эритроцитах антигенов или антител в зависимости от цели исследования.





В положительных случаях в лунке осадок имеет вид тонкой пленки из склеивающихся эритроцитов (зонтик).

Реакция преципитации

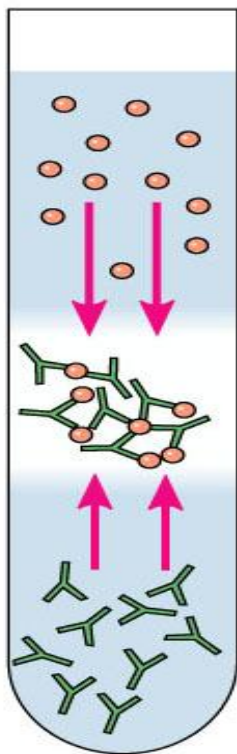
Принцип: При взаимодействии растворимого антигена с антителом в присутствии электролитов (NaCl) образуется **комплекс Аг-Ат в виде нерастворимого преципитата**.

- РП применяют в двух целях: **выявление антигенов** с помощью известной иммунной преципитирующей сыворотки или **антител** с использованием известных антигенов.
- Используется как **качественный**, так и **количественный** анализ (реакция Манчини).
- Очень чувствительная реакция для определения антигенов.
- С помощью РП определяют фальсификацию рыбных и мясных изделий.

Варианты реакции преципитации

- в жидкой среде - по типу реакции флоккуляции , **кольцепреципитации**.
- в плотной среде (в агаре, полиакриламидном геле) - реакция преципитации по **Оухтерлони** , радиальная иммунодиффузия по Манчини , реакция **иммуноэлектрофореза**.

Реакция кольцепреципитации



Реакцию проводят путем наслаивания на иммунную сыворотку антигена

Образование комплекса АГ-АТ

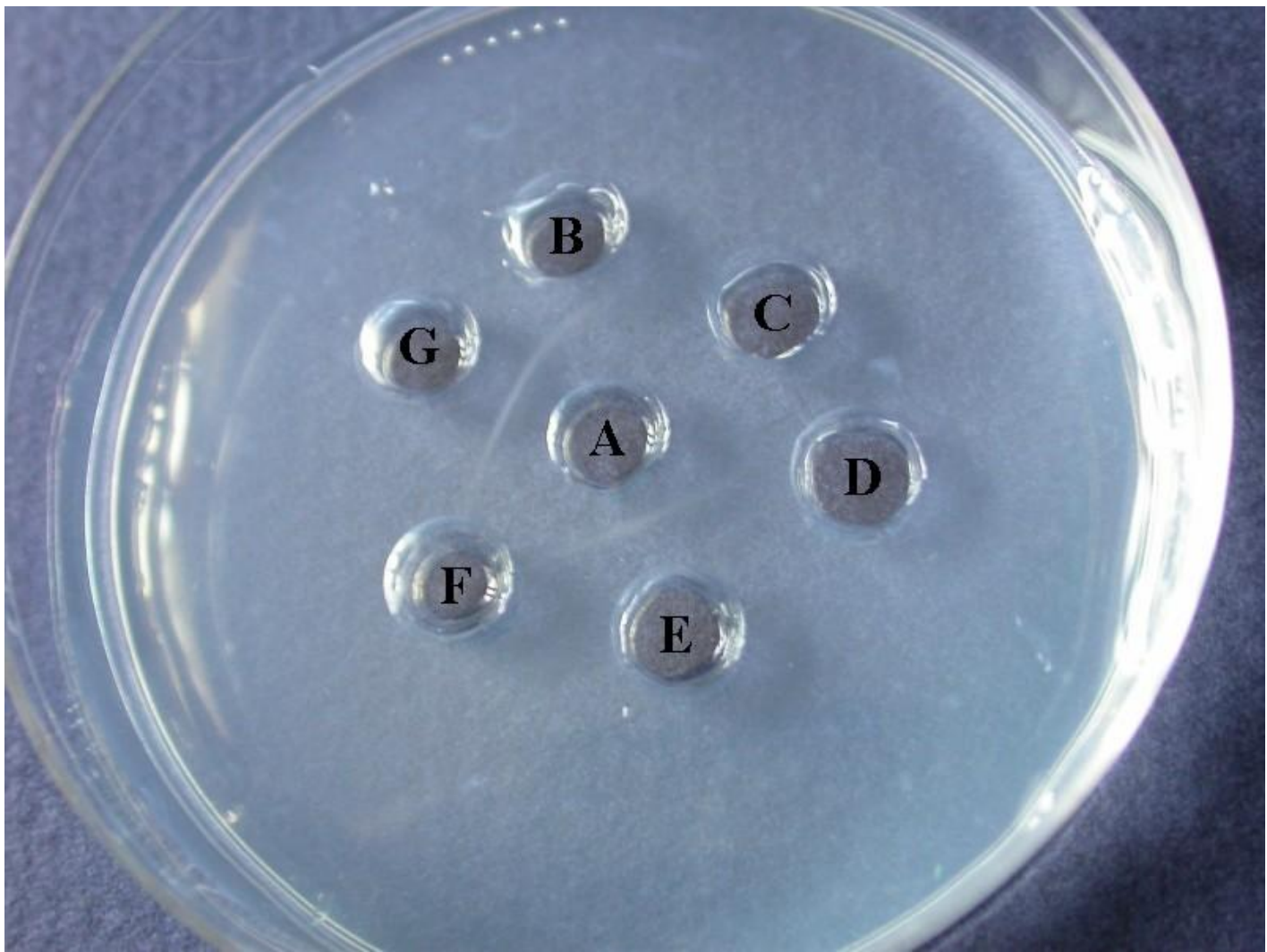


-

+

Реакция преципитации в геле по Оухтерлони

- Реакция проводится в агаре на стеклах или в чашках Петри .
- В разные лунки в агаре вносится взвесь, содержащая антиген и иммунная сыворотка.
- Из лунок антиген и антитела диффундируют в питательную среду, вступают в иммунную реакцию и образуют полосы преципитации.



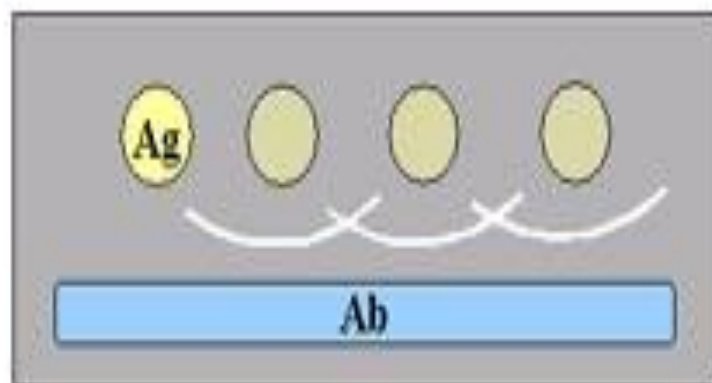
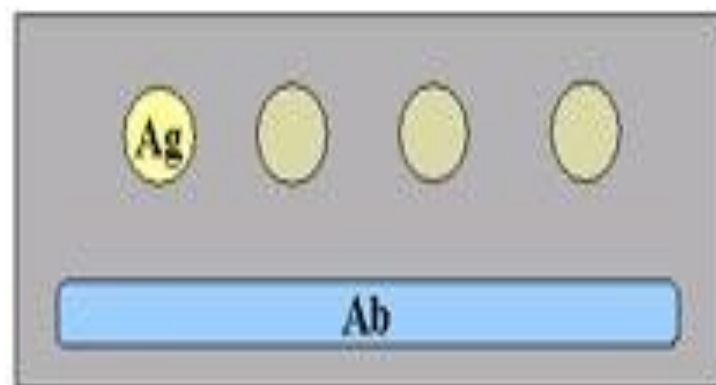
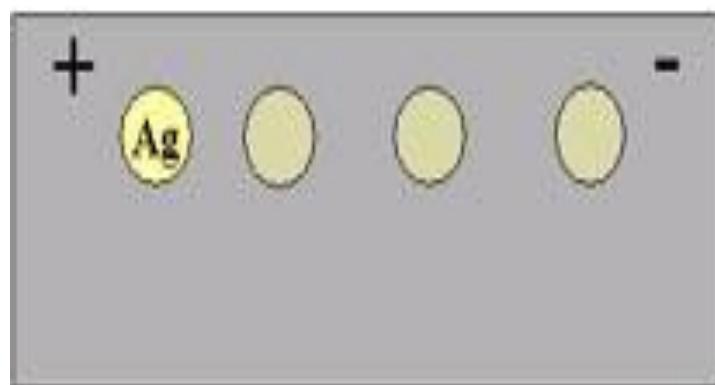
Полосы преципитации между антигенами в лунках G, E и иммунной сывороткой (антителами) в лунке A.

Иммуноэлектрофорез

ИЭФ чаще всего используется для исследования **антигенной структуры микроорганизмов.**

Принцип и последовательность проведения реакции

1. Антигенный комплекс помещают в лунку, которая находится в центре геля, залитого на стеклянную пластинку.
2. Через гель пропускают электрический ток, в результате происходит перемещение антигенов на неодинаковые расстояния соответственно своей электрофоретической подвижности.
3. В канавку вносят специфическую иммунную сыворотку.
4. Антигены и антитела диффундируют в геле навстречу друг другу. В месте их соприкосновения образуются



Иммуноэлектрофоре

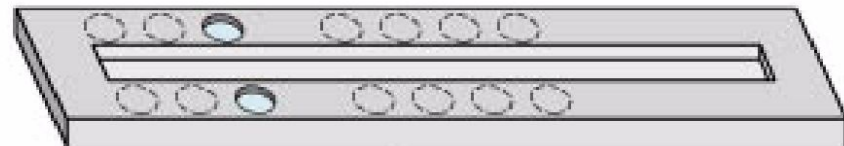
3

**Лунки,
содержащие смесь
антигенов**

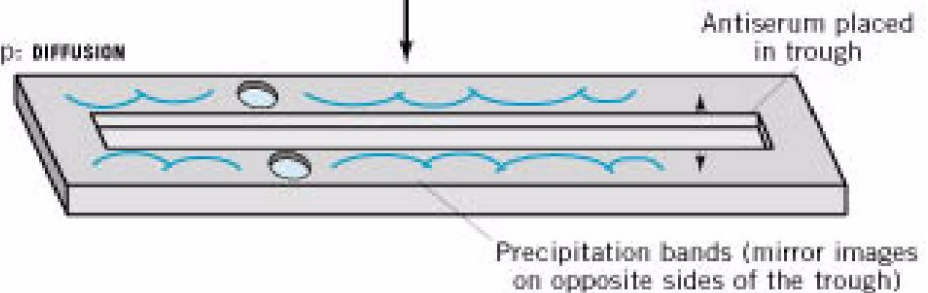
**Перемещение
антигенов**

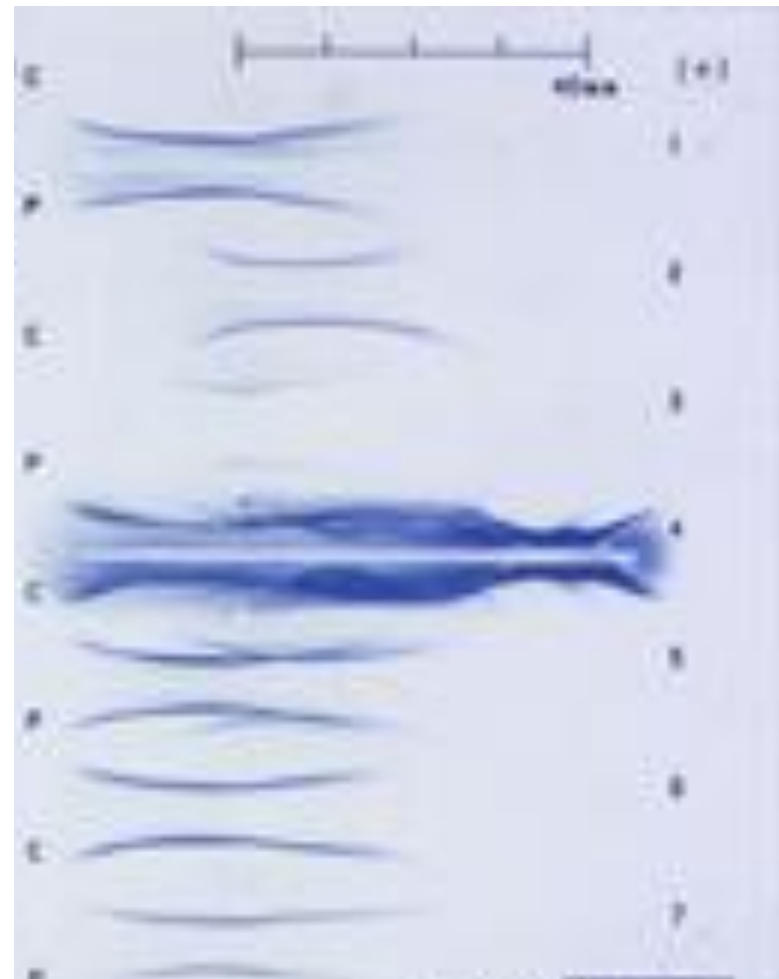
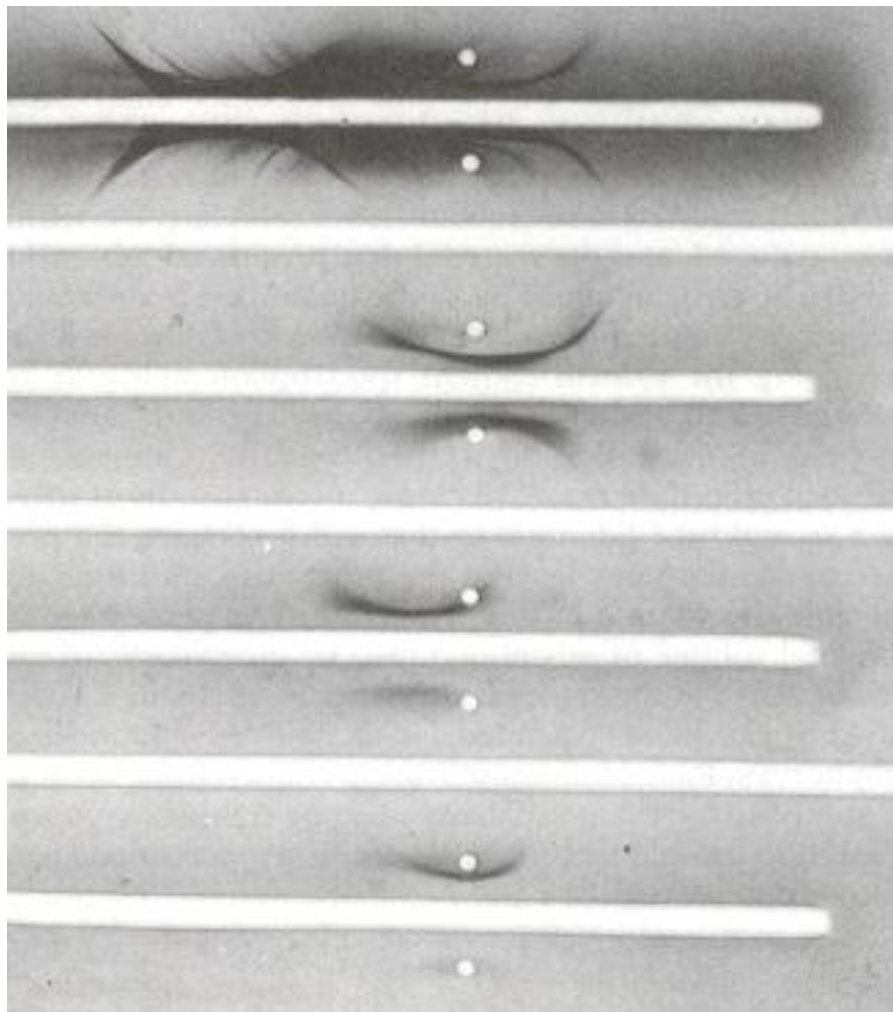
**Диффузия антител
из канавки и
образование полос
преципитации**

First step: ELECTROPHORESIS

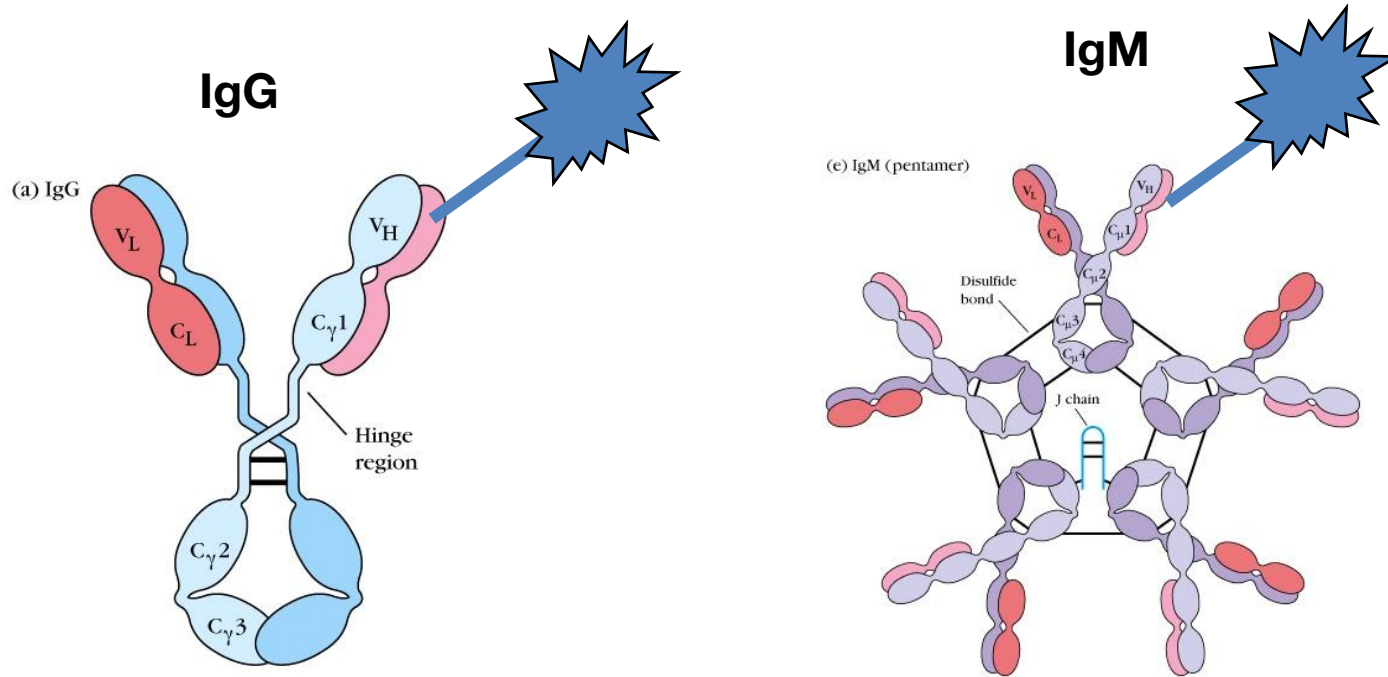


Second step: DIFFUSION

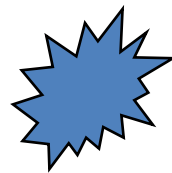




Серологические реакции, основанные на использовании меток



МЕТКИ



- Ферментные
- Флюоресцирующие
- радиоизотопные

Иммуноферментный анализ (ИФА или ELISA)

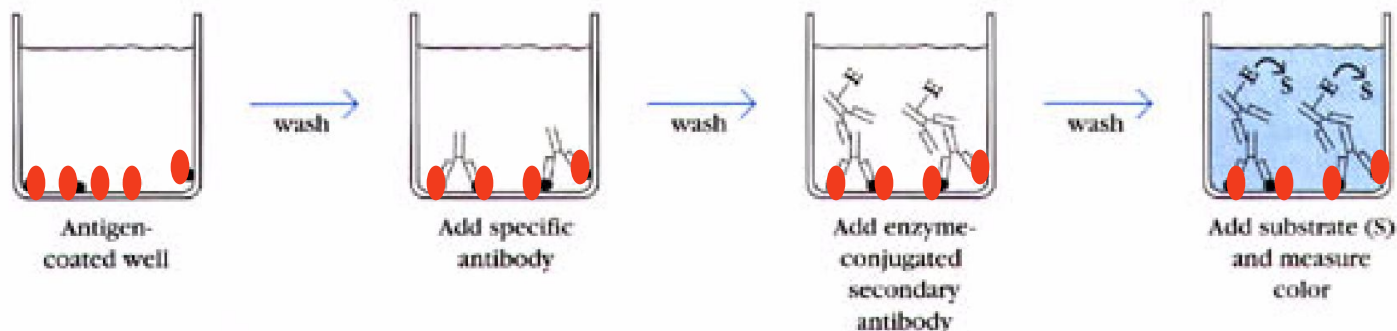
Метод ИФА или ELISA – это серологическая реакция , в которой для визуализации образовавшегося комплекса **антиген-антитело** используются **ферменты-метки** (пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза). Эти маркерные (индикаторные) ферменты способны расщеплять субстрат и вызывать **изменение цвета среды**.

ИФА



Обнаружение антител

(a) Indirect ELISA



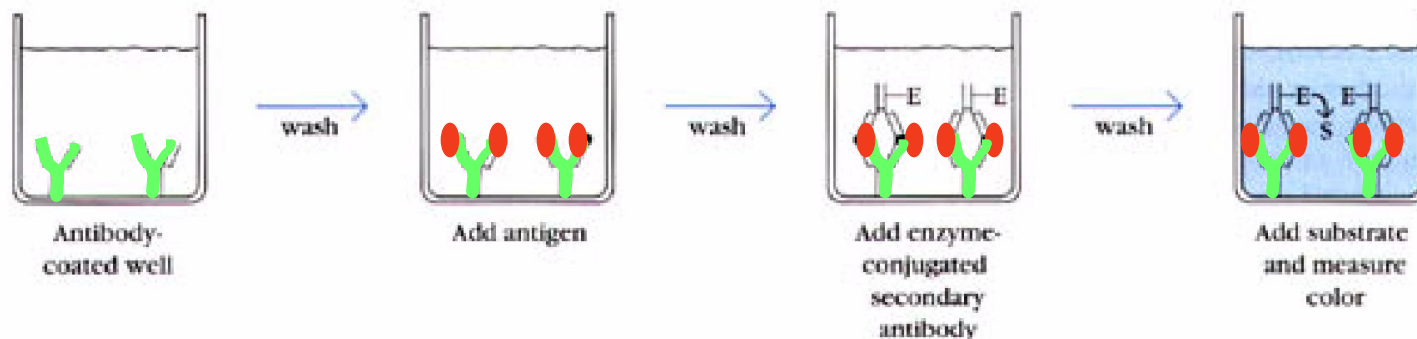
сэндвич-метод

(b) Sandwich ELISA

ИФА

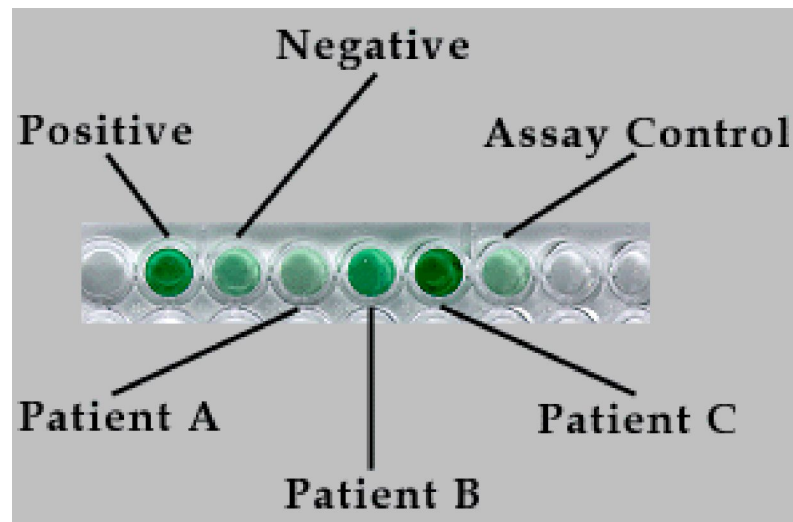
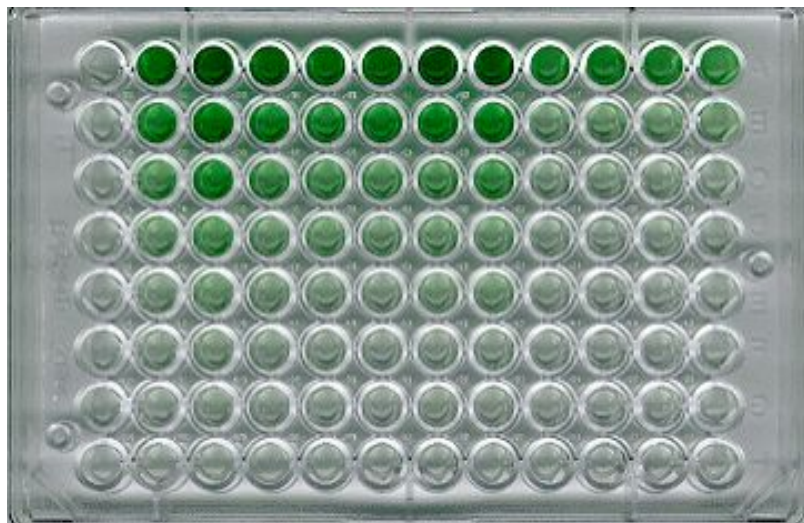


Обнаружение антигена



ИФА

Пример: обнаружение антител к ВИЧ

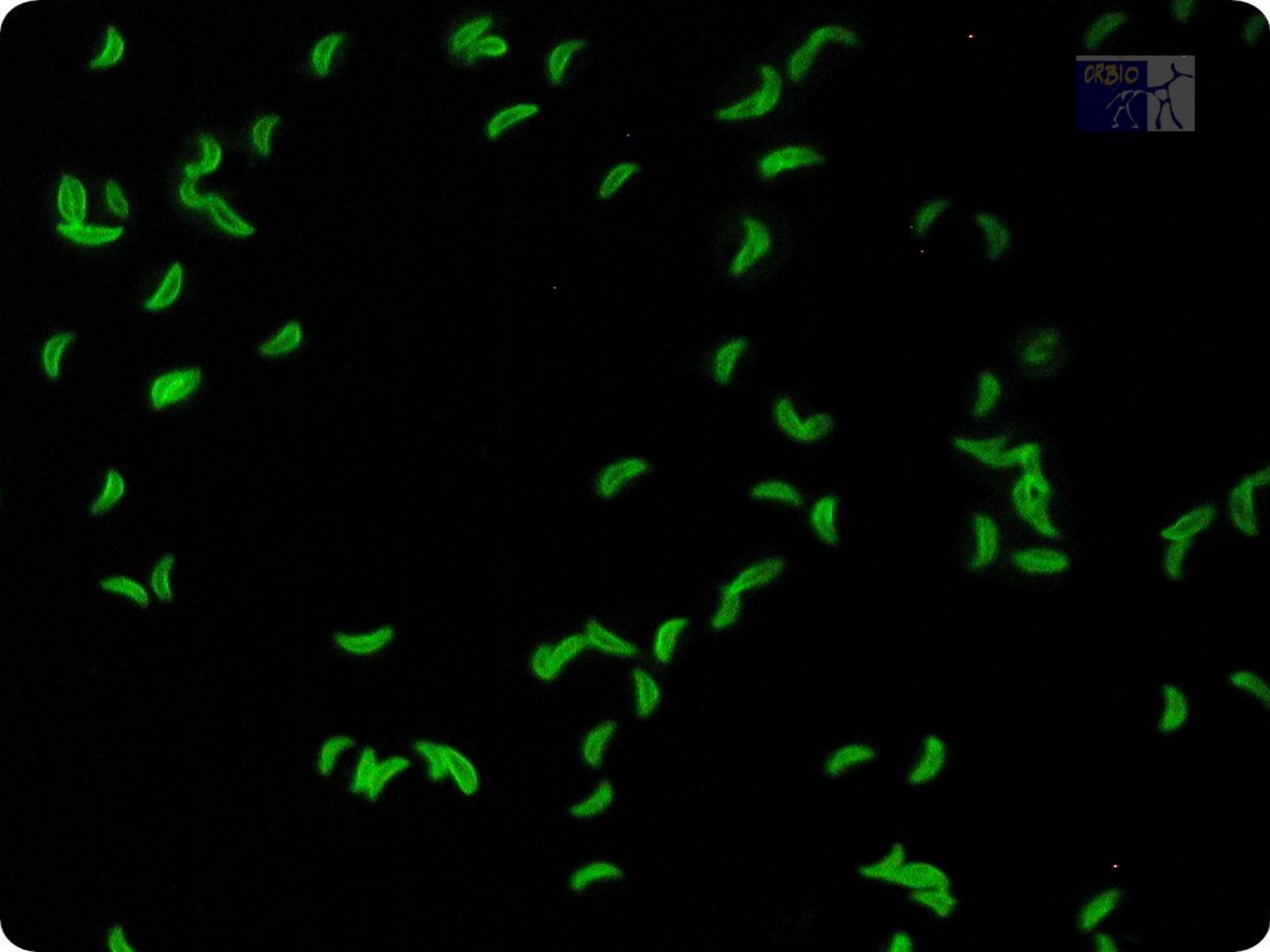


Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)

РИФ основана на соединении антигенов бактерий и вирусов со специфическими антителами, меченными флюоресцирующими красителями. Образовавшиеся комплексы АГ-АТ становятся хорошо видимыми под люминесцентным микроскопом.

Преимущества РИФ:

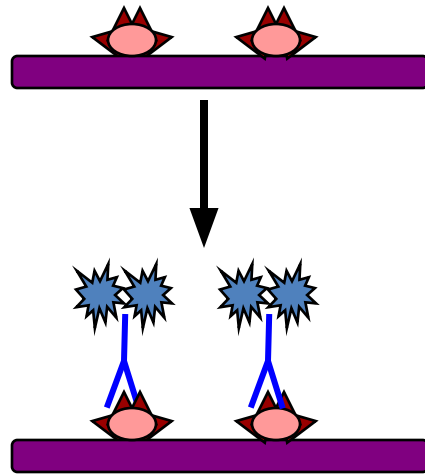
- простота,
- высокая чувствительность,



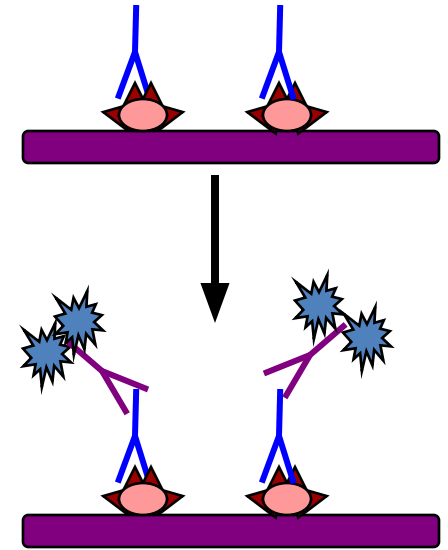
Прямой метод РИФ - непосредственное соединение антигена с меченым **флуоресцентным красителем** антителом.

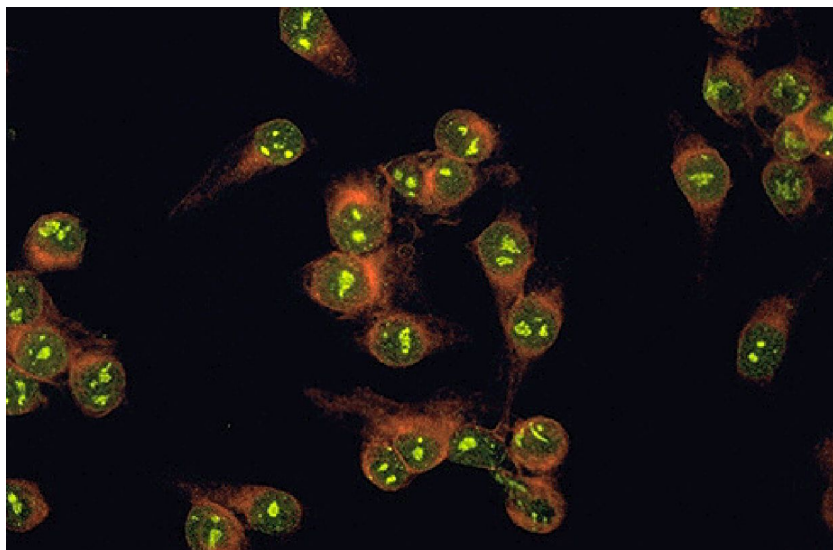
Непрямой метод (РНИФ) – 1) образование комплекса антиген-антитело, 2) выявлении этого комплекса путем обработки его меченым **флуоресцентным красителем** антигаммаглобулином (АТ к АТ).

Прямой
метод

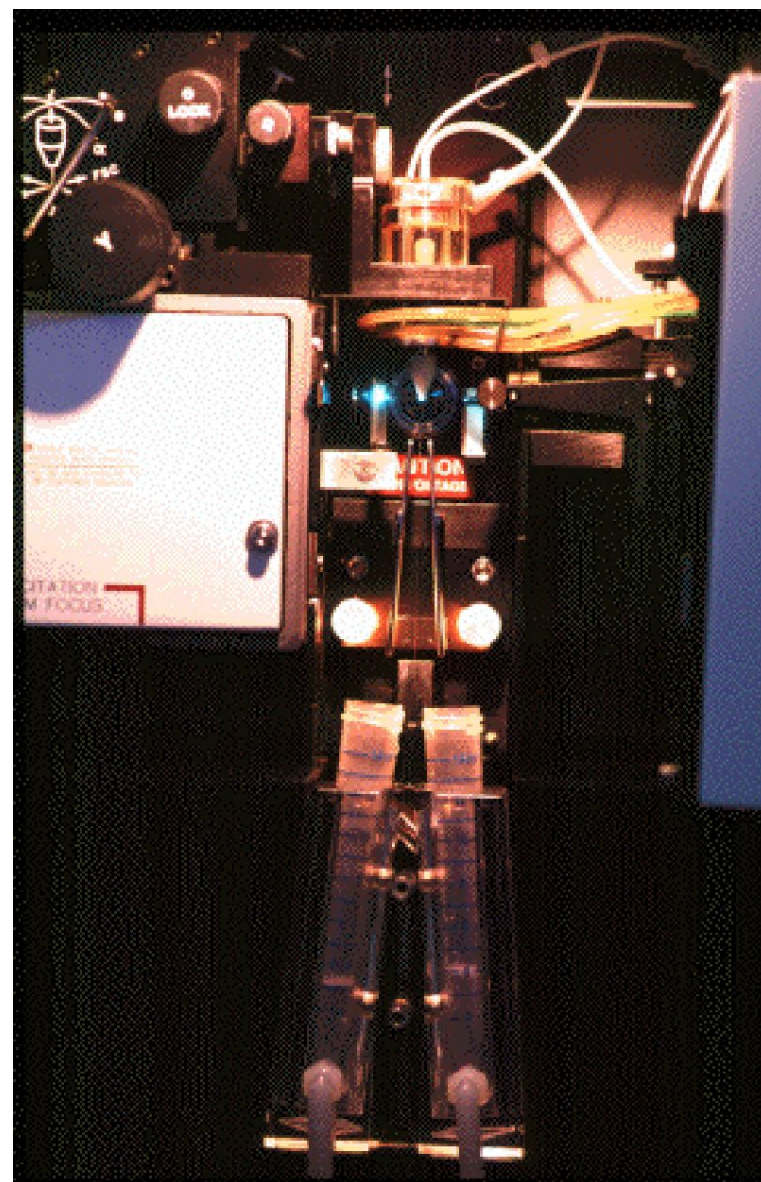


Непрямой
метод





Люминесцентный микроскоп



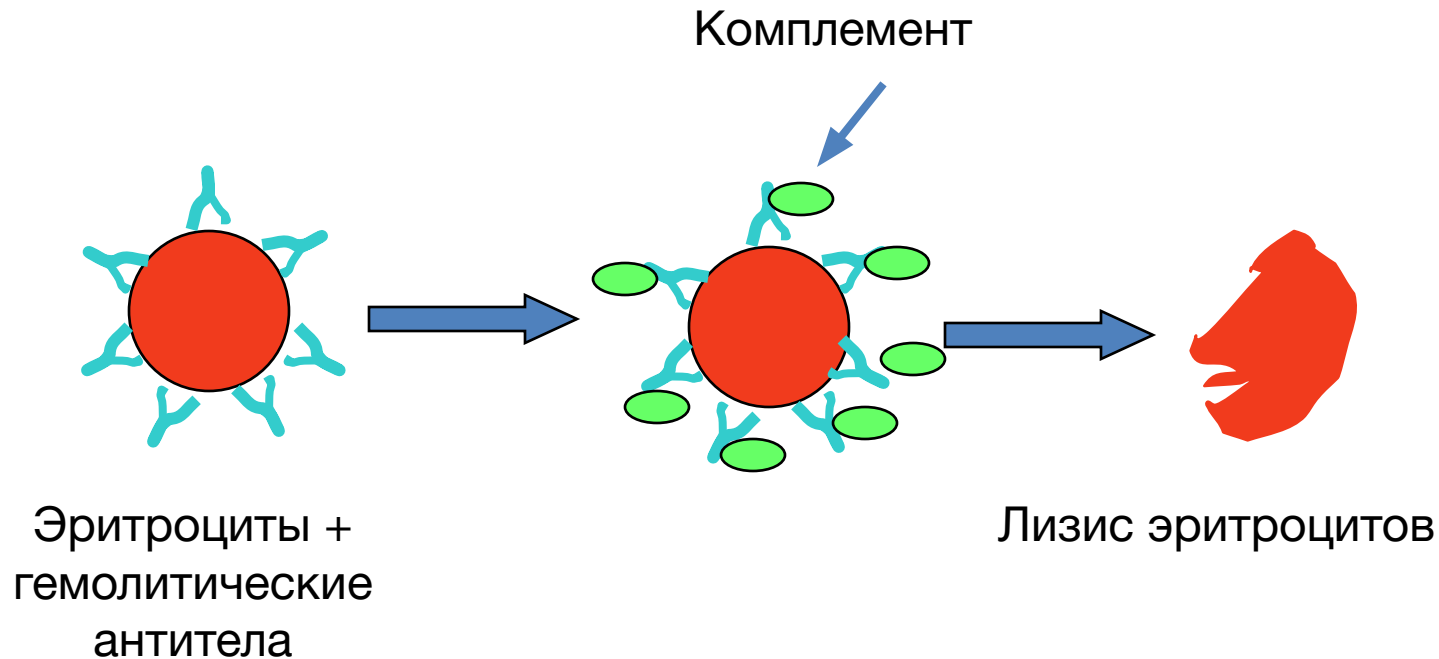
Реакция связывания комплемента

РСК основывается на **способности комплемента связываться с комплексом АГ + АТ**. Реакция протекает в две фазы. **Первая фаза - взаимодействие антигена и антитела**. К исследуемой сыворотке, содержащей антитела, добавляют известный антиген и стандартный комплемент, инкубируют при 37 ° С в течение одного часа.

Вторая фаза - выявление результатов реакции при помощи индикаторной гемолитической системы (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка кролика, содержащая гемолитические антитела к эритроцитам барана). К смеси антиген + антитело + комплемент добавляют индикаторную систему и вновь инкубируют при 37° С в течение 30 - 60 мин. Если комплемент адсорбировался ранее на комплексе АГ + АТ (в исследуемой сыворотке специфические антитела присутствовали), то гемолиза эритроцитов не происходит.

При отсутствии же в исследуемой сыворотке специфических антител, комплекс АГ + АТ не образуется и комплемент остается несвязанным. При добавлении гемолитической системы комплемент присоединяется к ней и происходит гемолиз эритроцитов.

Свойства комплемента



Реакция гемолиза. В присутствии комплемента под действием гемолитических антител взвесь эритроцитов превращается в «лаковую кровь» вследствие выхода гемоглобина. Реакция гемолиза используется в РСК как индикаторная: для тестирования присутствия или отсутствия

РСК

