



СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

**СПбГУ
2013г.**

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

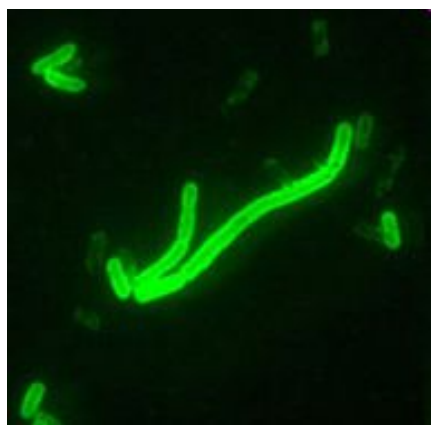
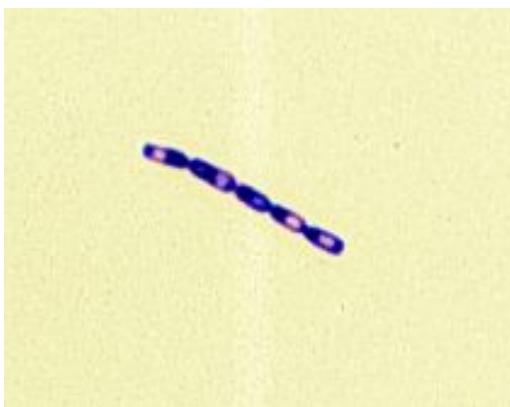
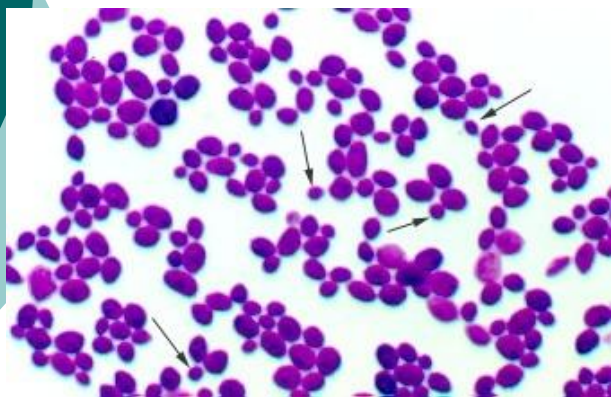
Выделенный микроорганизм **является** возбудителем, если:

- 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

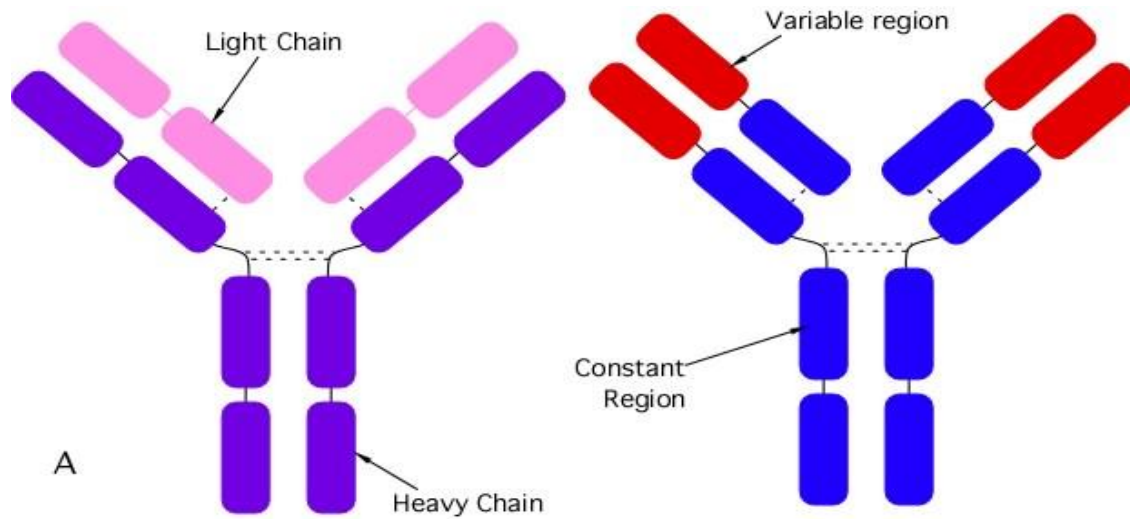




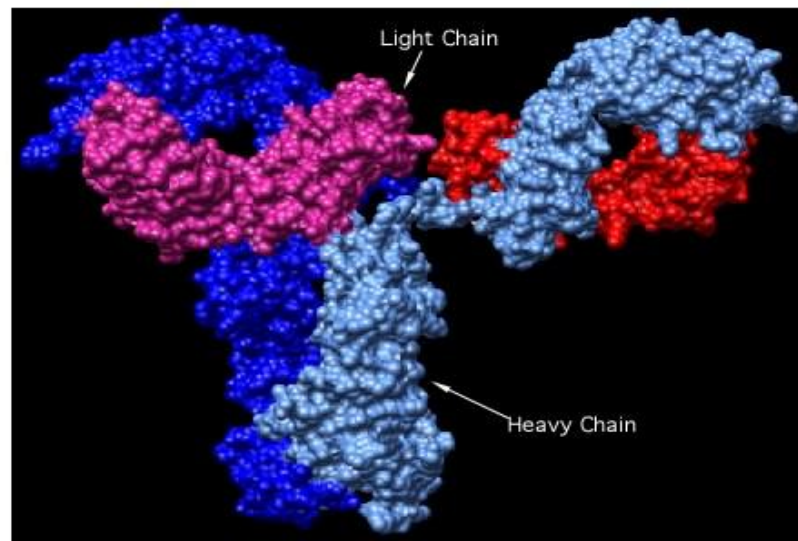
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ, СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (лат. serum сыворотка + logos учение) –

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

Строение антител (Ig)



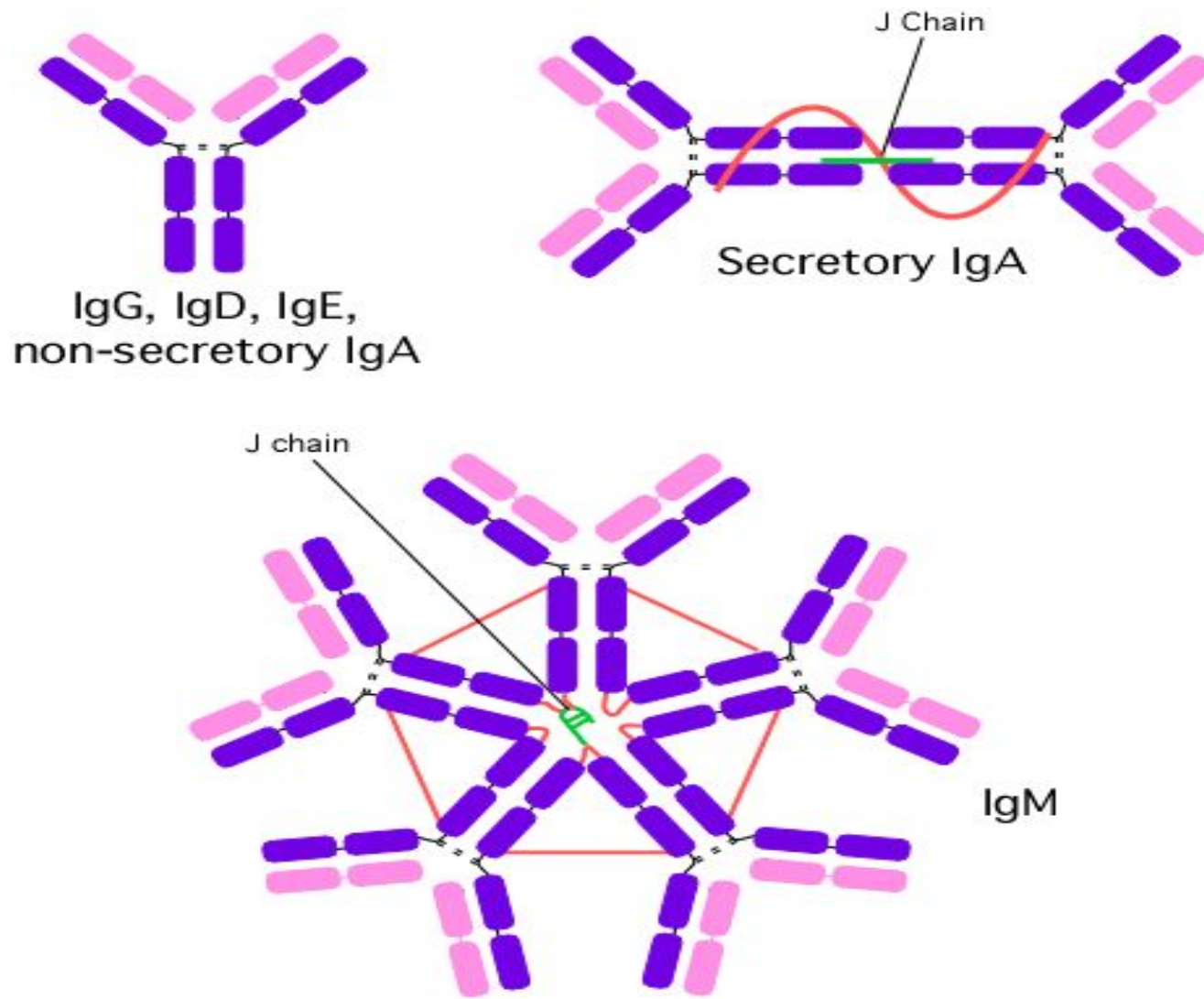
A



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 маркёр.



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).

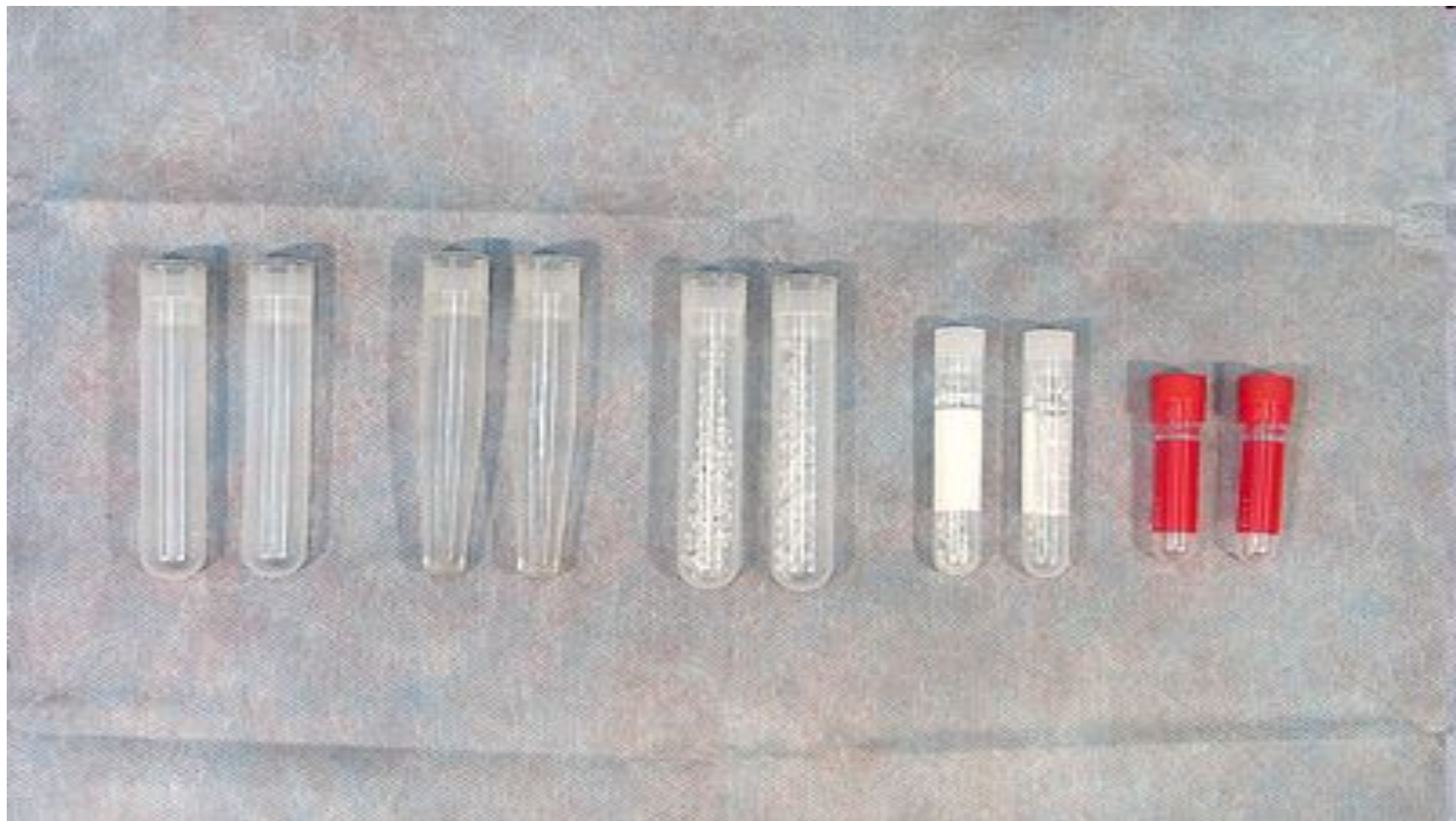
ЗАВИСИМОСТЬ ППЗ И ОПЗ ОТ РАСПРОСТРАНЁННОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Распространён- ность заболевания	Чувствительность и и специфичность 95 %		Чувствительность и и специфичность 98 %		Чувствительность и 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 комплемента)
- Реакции **с использованием меченых** антител или антигенов (иммуноферментный, радиоиммунный анализ, метод флуоресцирующих антител).

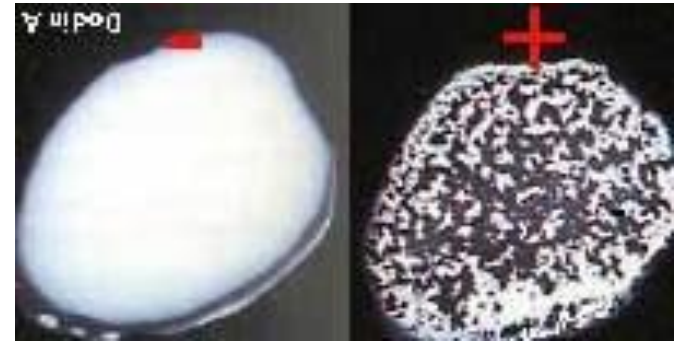
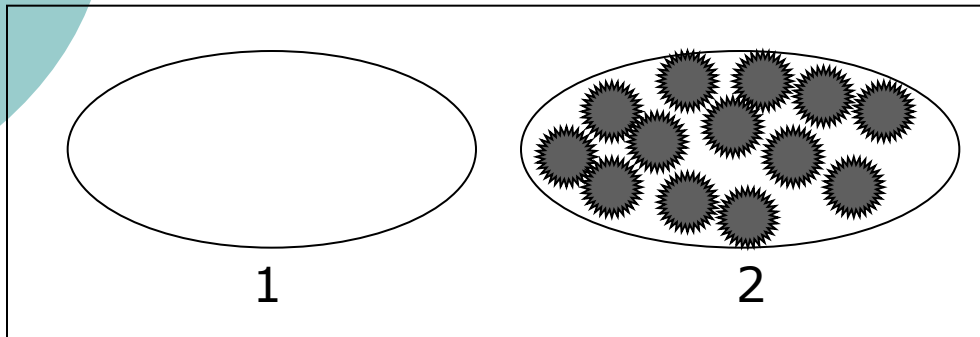


Реакция агглютинации, варианты:

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

Реакция агглютинации (ориентировочная, для идентификации микроорганизма)

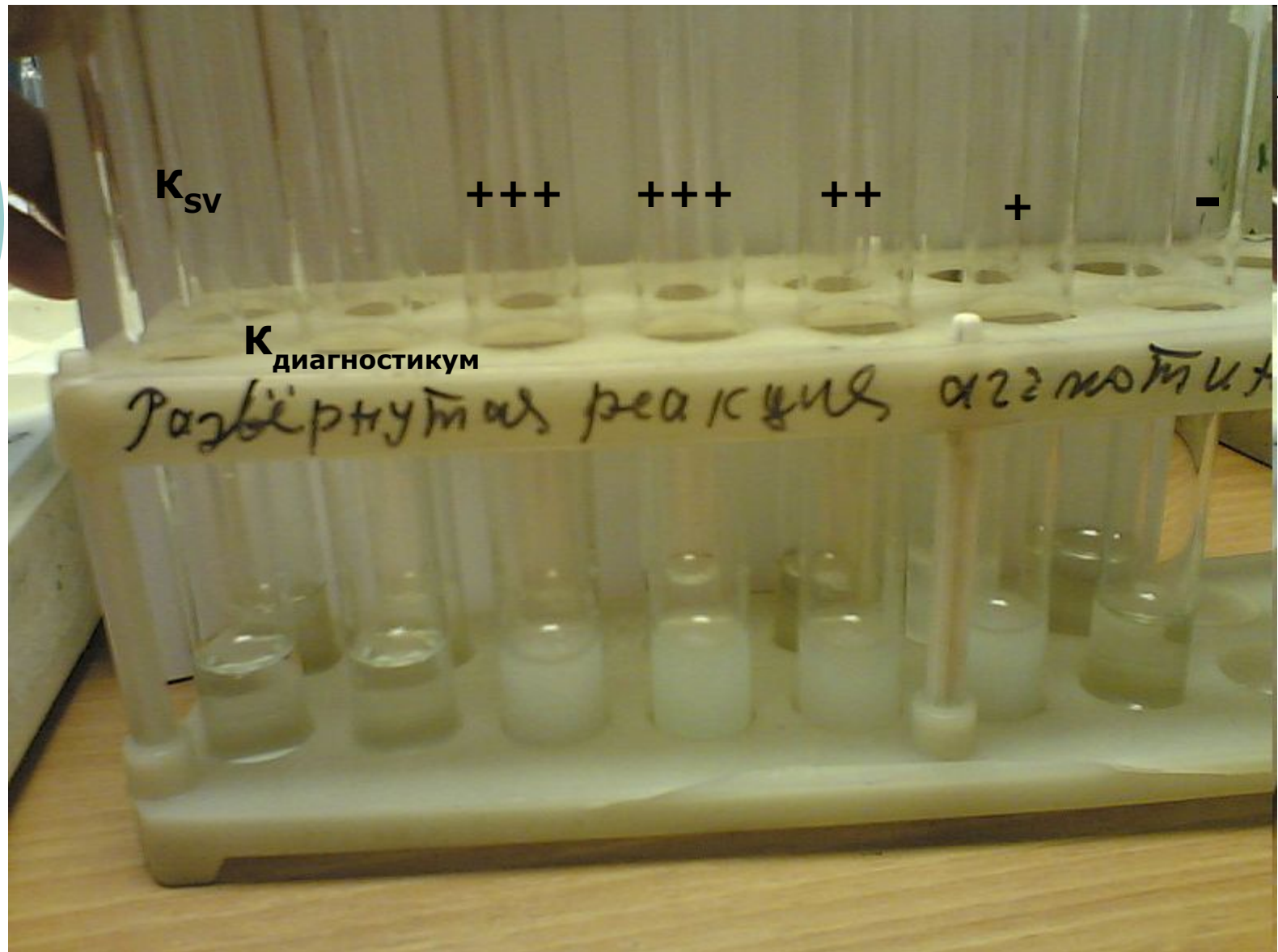
1. Физ. р-р + культура микроорганизмов
2. Сыворотка (1:100) + культура микроорганизмов



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 → нагруженные эритроциты

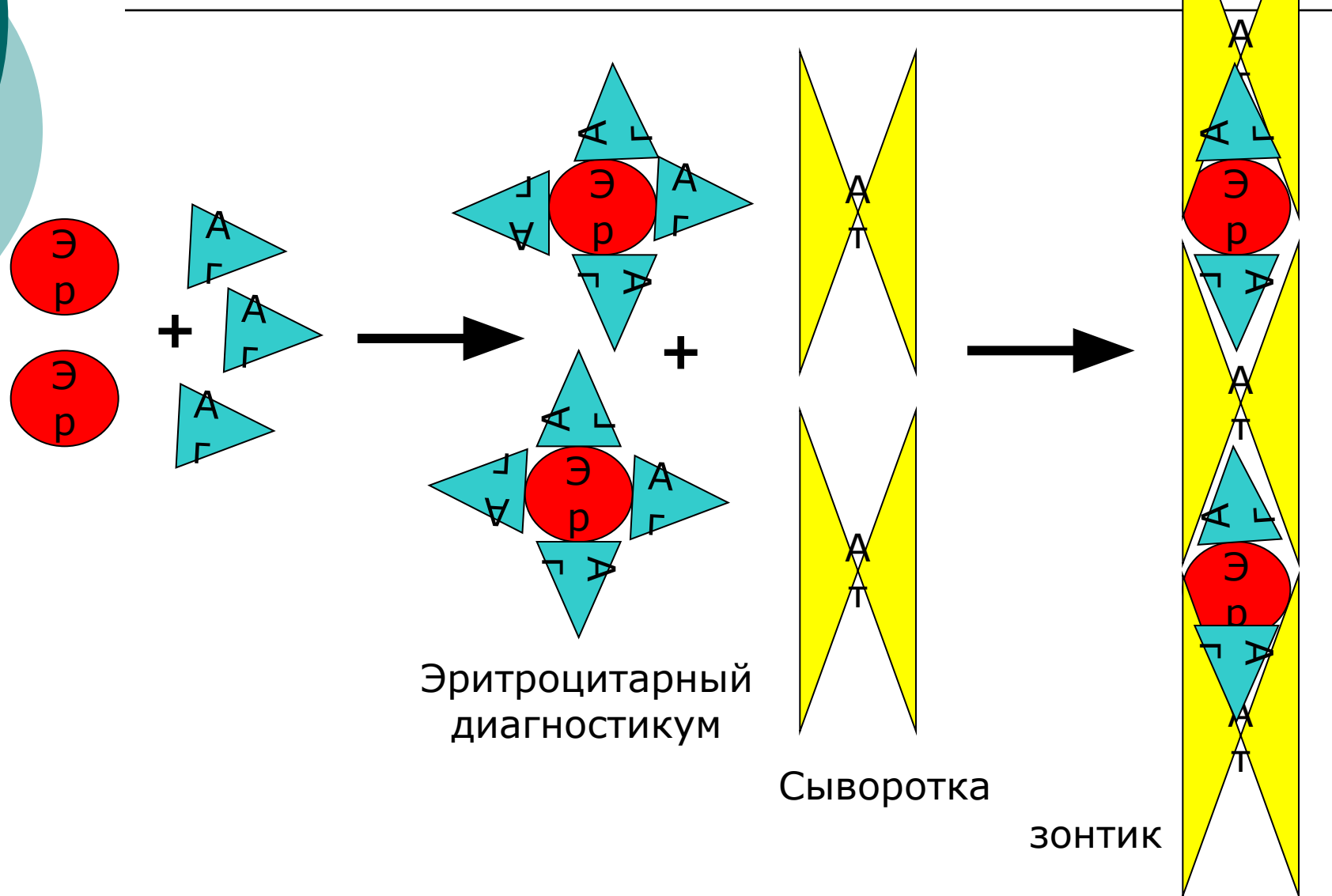
2. Нагруженные эритроциты + иммунная сыворотка или АГ



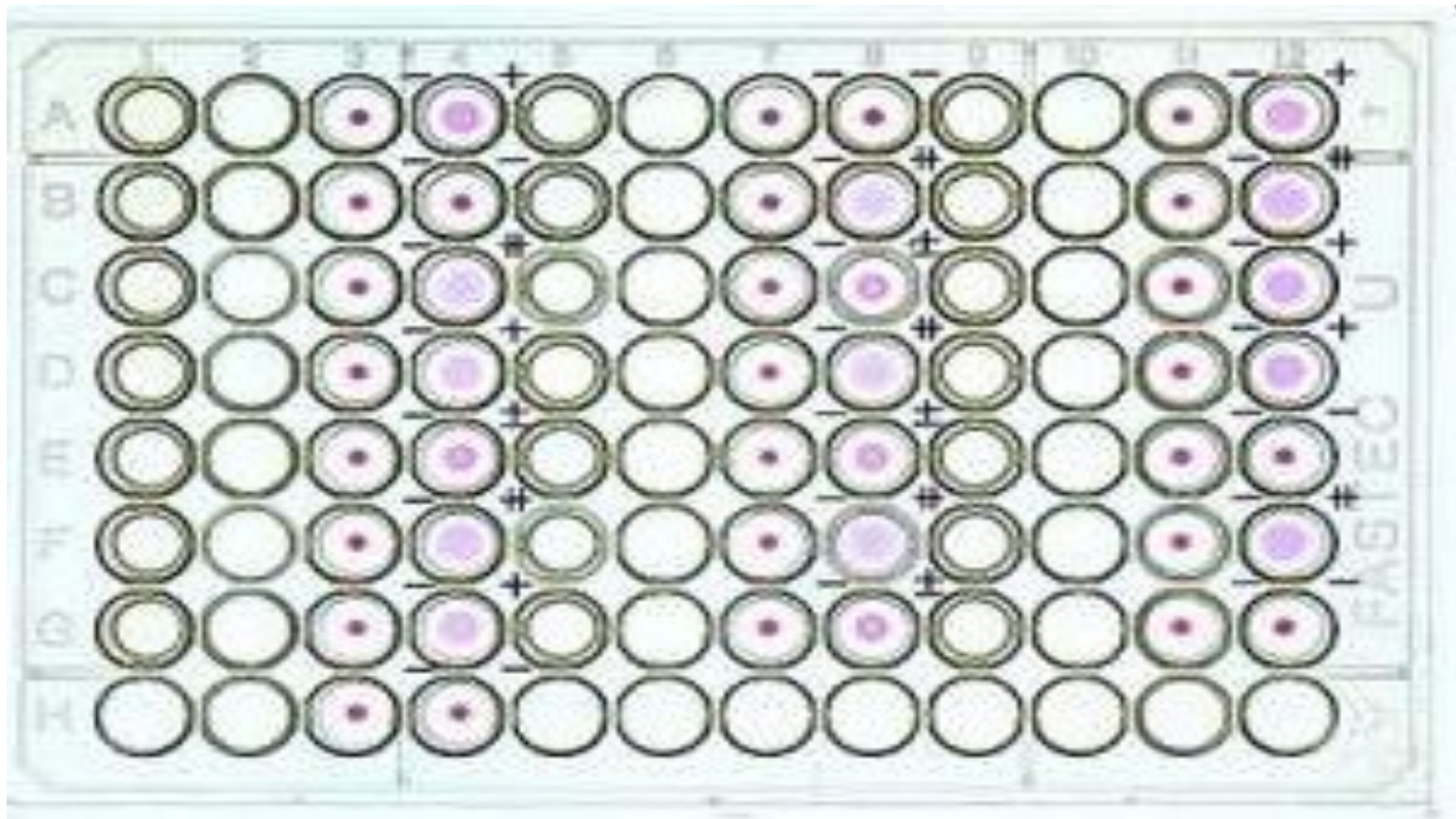
Положительная
Реакция (зонтик)

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
Диагностikum 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

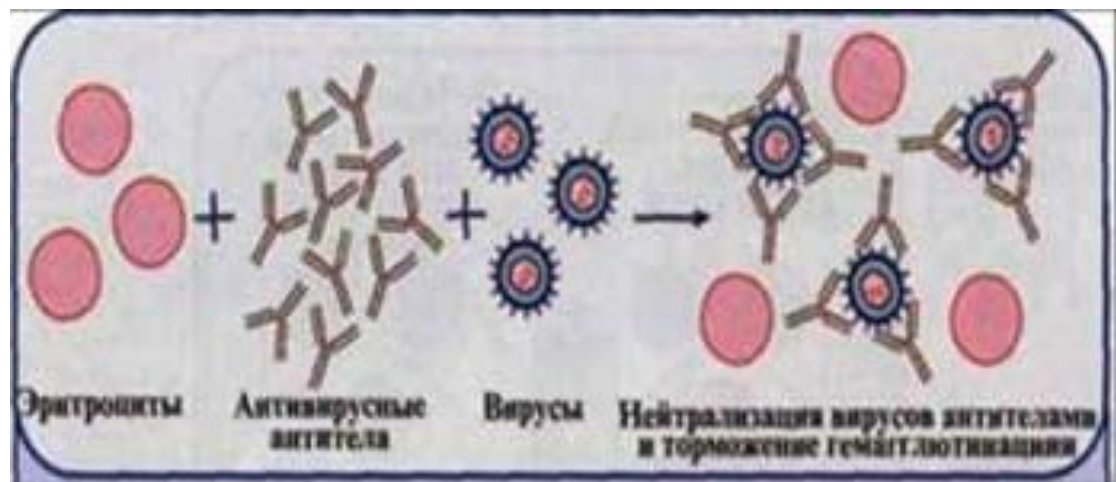
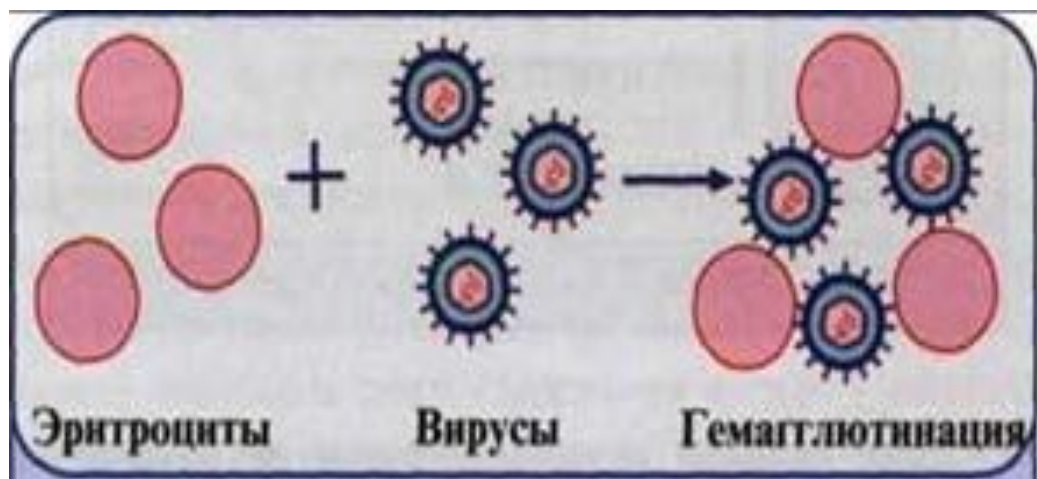
Эритроцитарный
диагностикум

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) - 

вирус- 

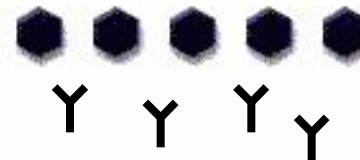
дается время для протекания
реакции в растворе

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

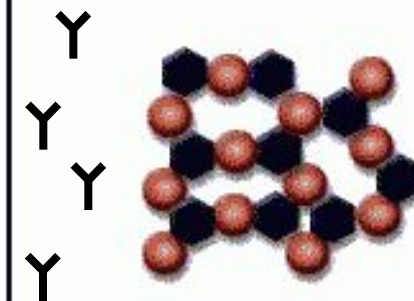
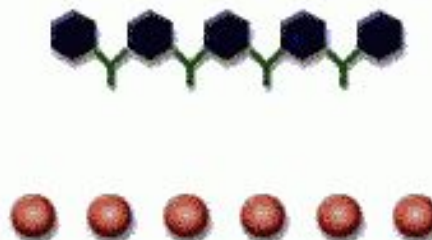


гликопротеины оболочки
вируса связываются с RBC



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
H1N1								
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

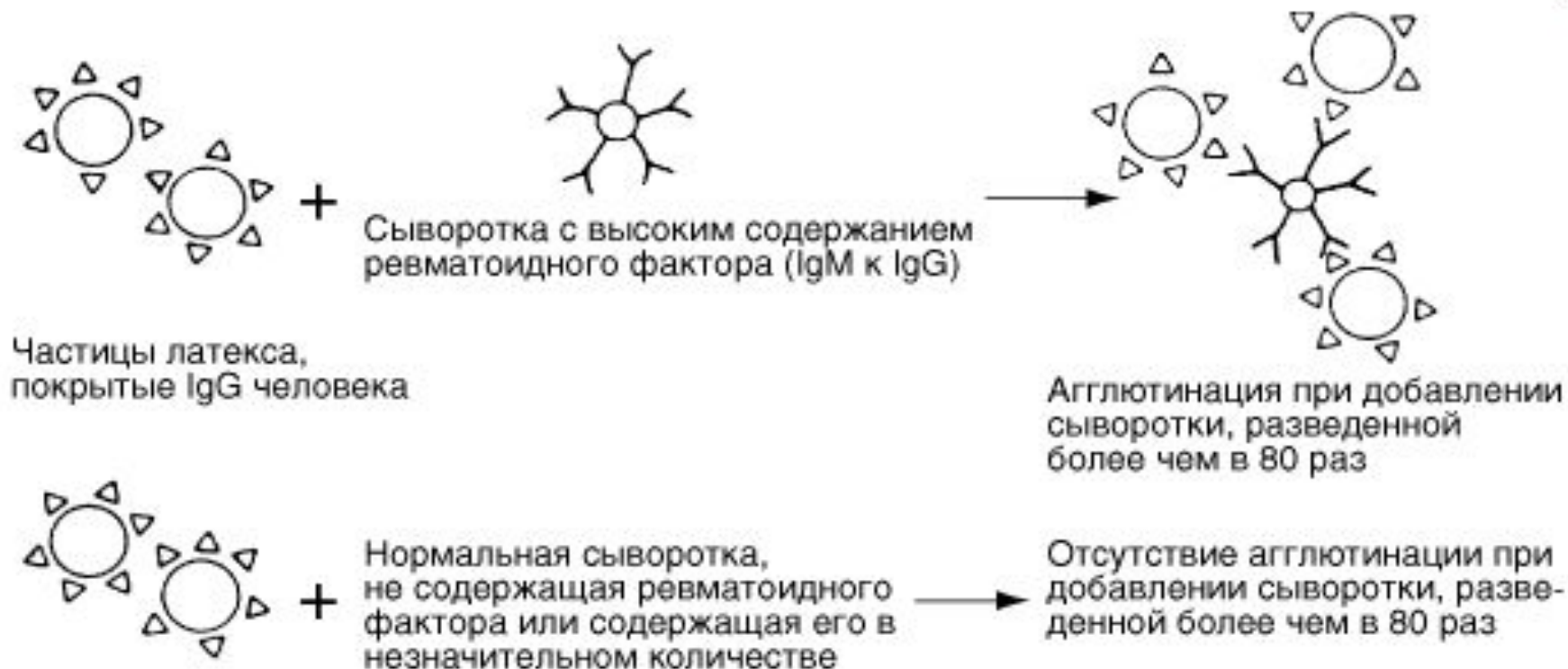
Титр антител определяют по последней лунке с положительной РТГА.

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.

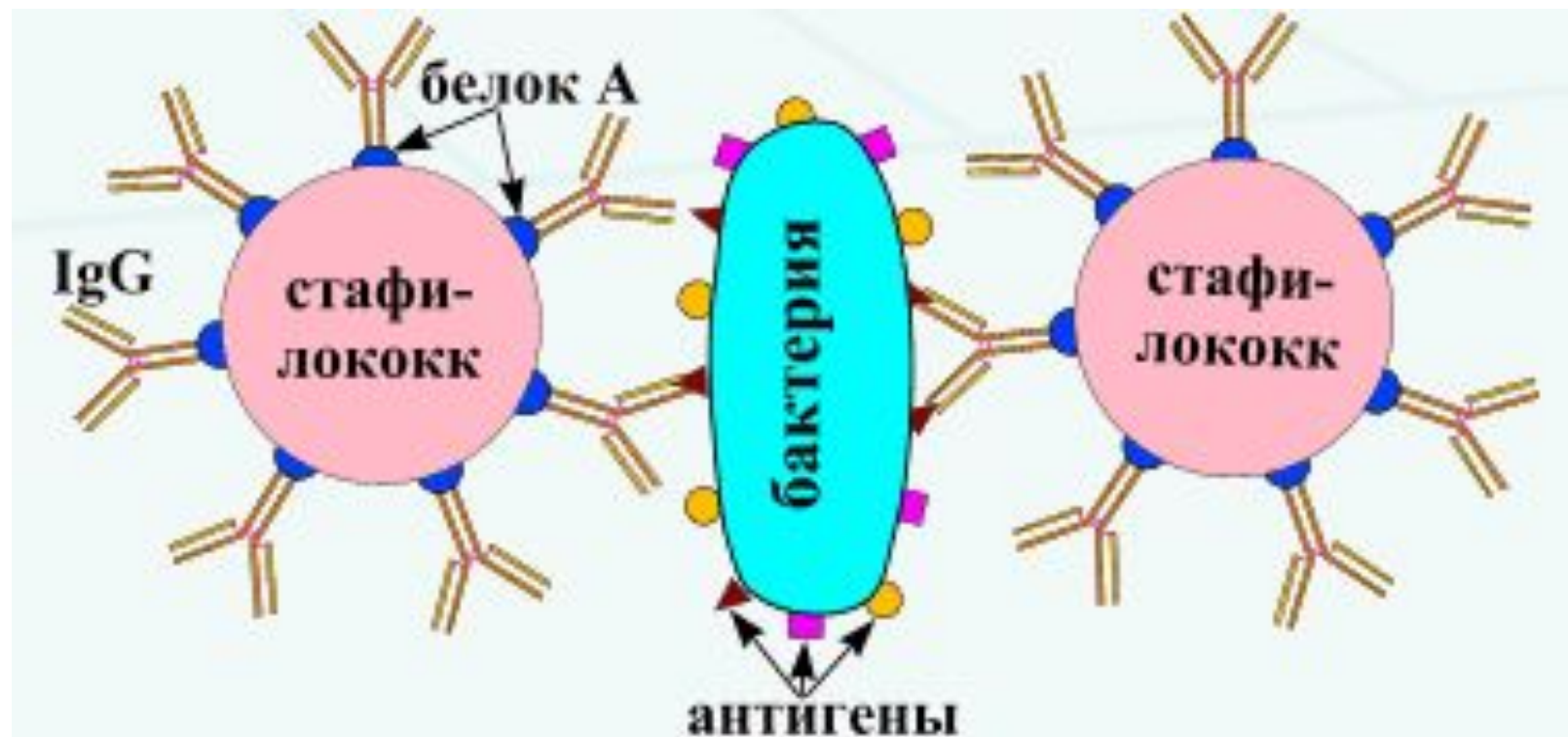
• **Ревматоидный фактор** - это аутоантитела анти-IgG (к Fc-фрагменту IgG), относящиеся к классу IgM. В сыворотке ревматоидный фактор обычно присутствует в виде комплекса с IgG. В высоком титре ревматоидный фактор выявляется в крови у 80% больных с тяжелым прогрессирующим ревматоидным артритом.

Реакция коаггутинации (РКА)

В качестве носителя используются:

- **Белок A *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)

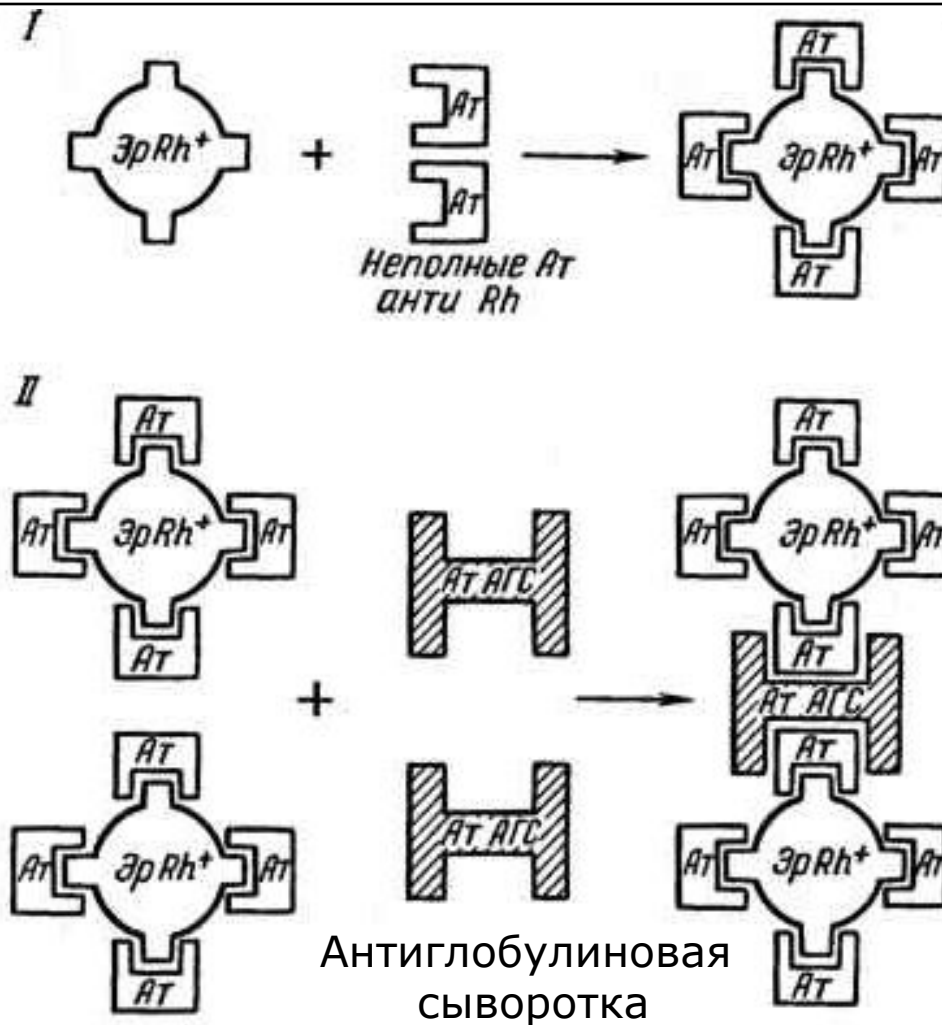


Рис. 54. Реакция Кумбса (схема).



Занятие №2



Реакция преципитации

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

Варианты:

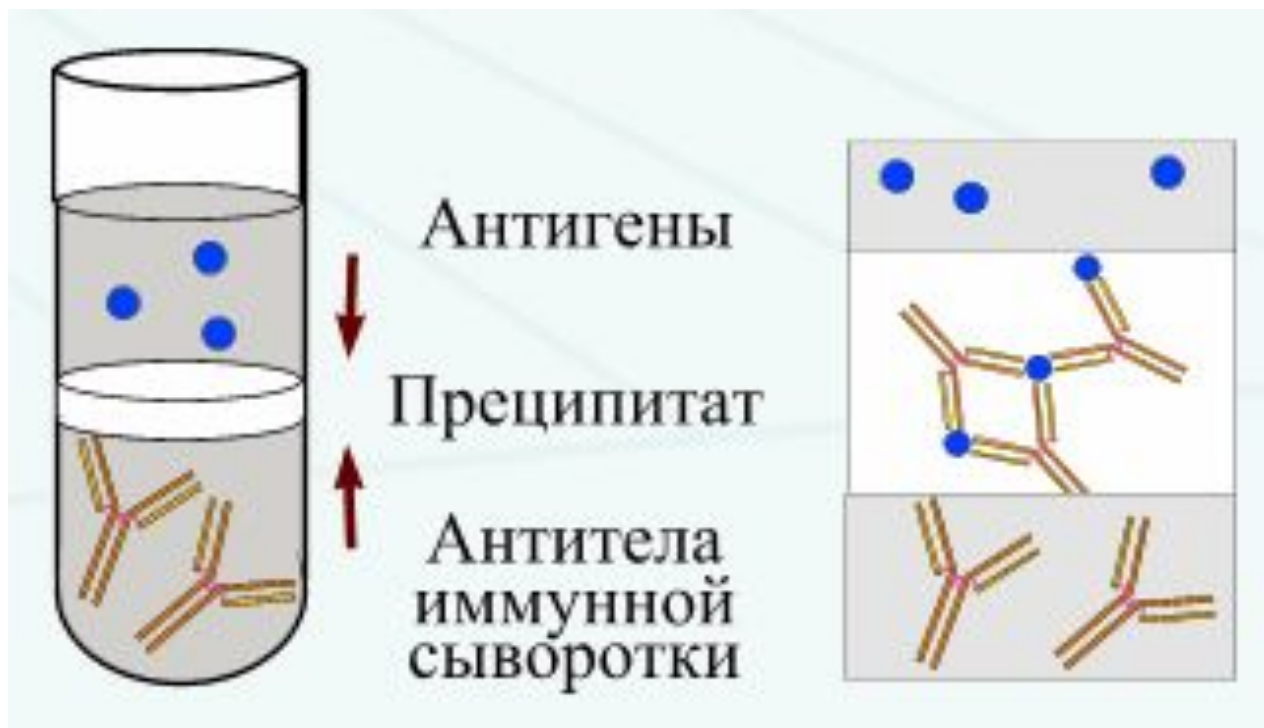
- в жидкой среде - по типу реакции флоккуляции, кольцепреципитации
- в плотной среде в агаре (геле).



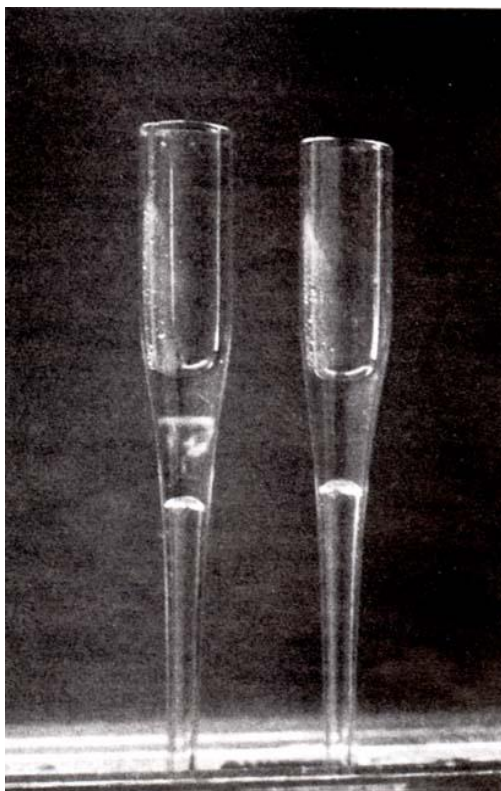
Реакции преципитации:

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

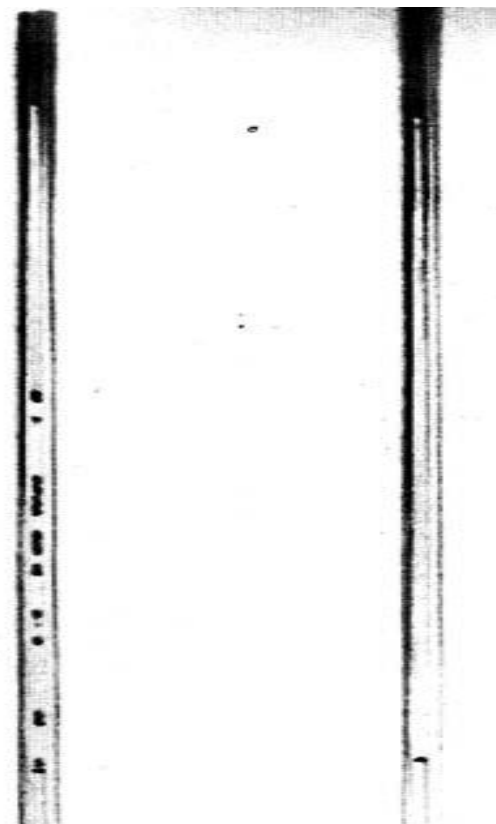
Реакция кольцепреципитации.



Реакция преципитации в растворе

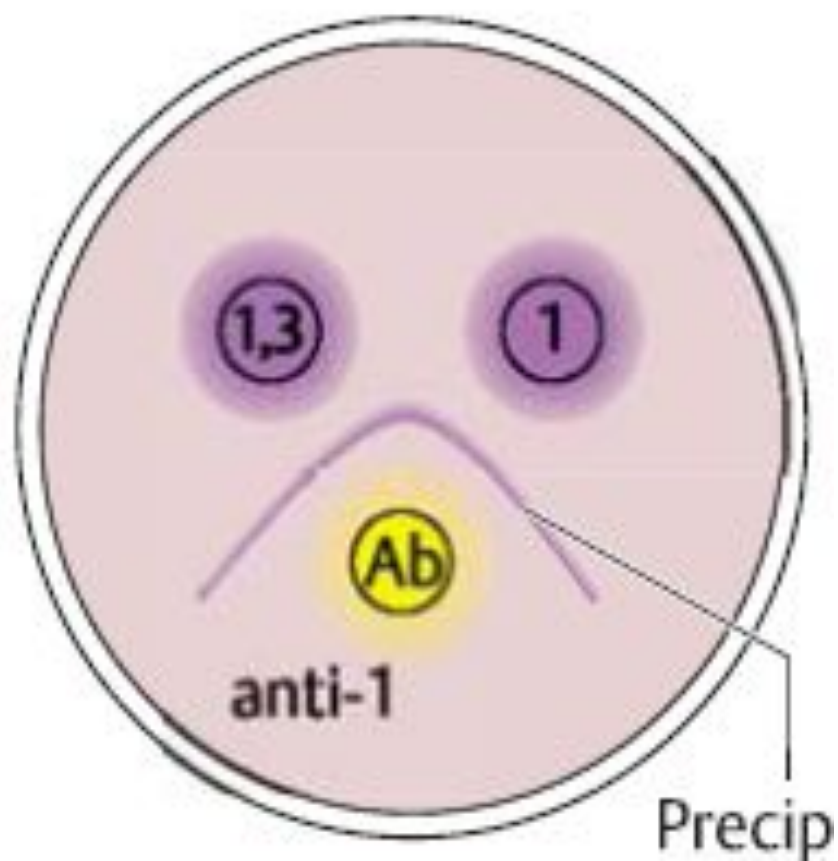


Реакция
кольцепреципитации



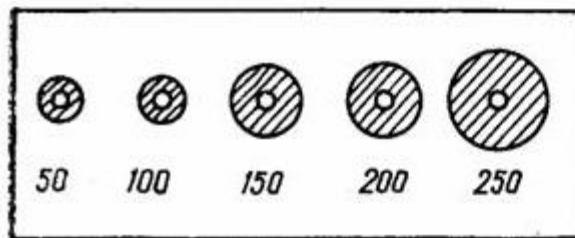
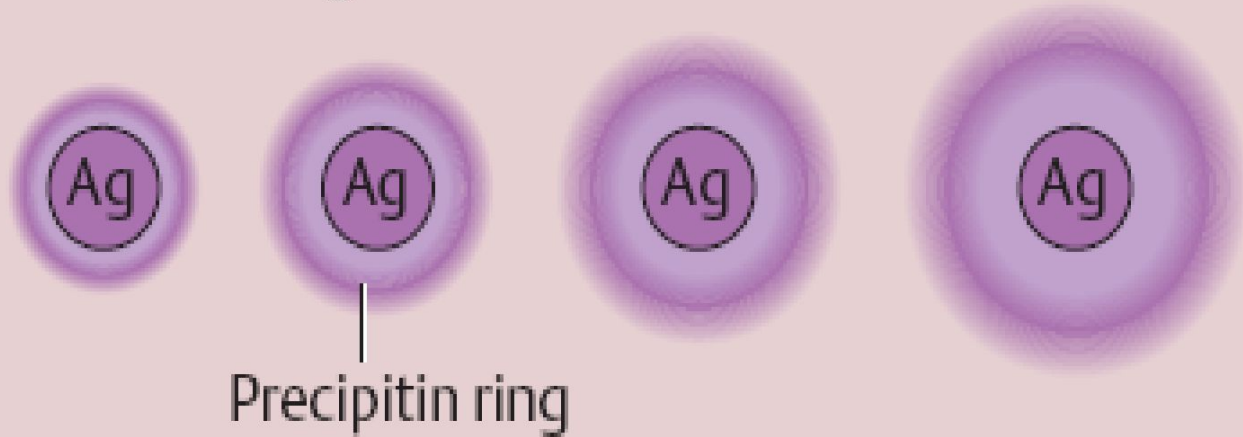
Реакция преципитации в
капиллярных пробирках
(флокуляция)

Реакция преципитации в геле по Оухтерлони

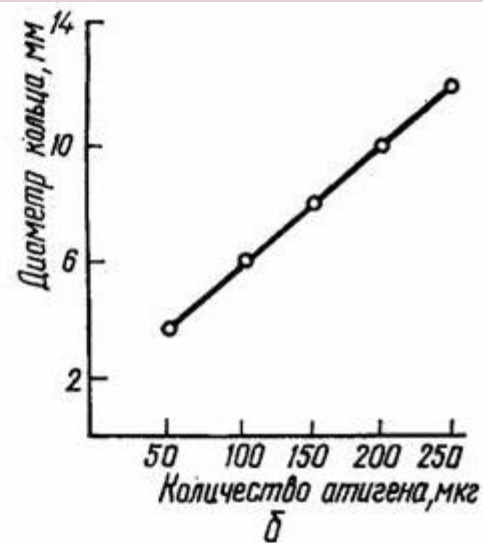


Реакция преципитации в геле по Манчини

Gel containing Ab



a



Реакция иммуноэлектрофореза .

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



Прибор
иммуноэлектрофоретический ПИЭФ-1

Реакция иммунного лизиса:

Реакция связывания комплемента (РСК)

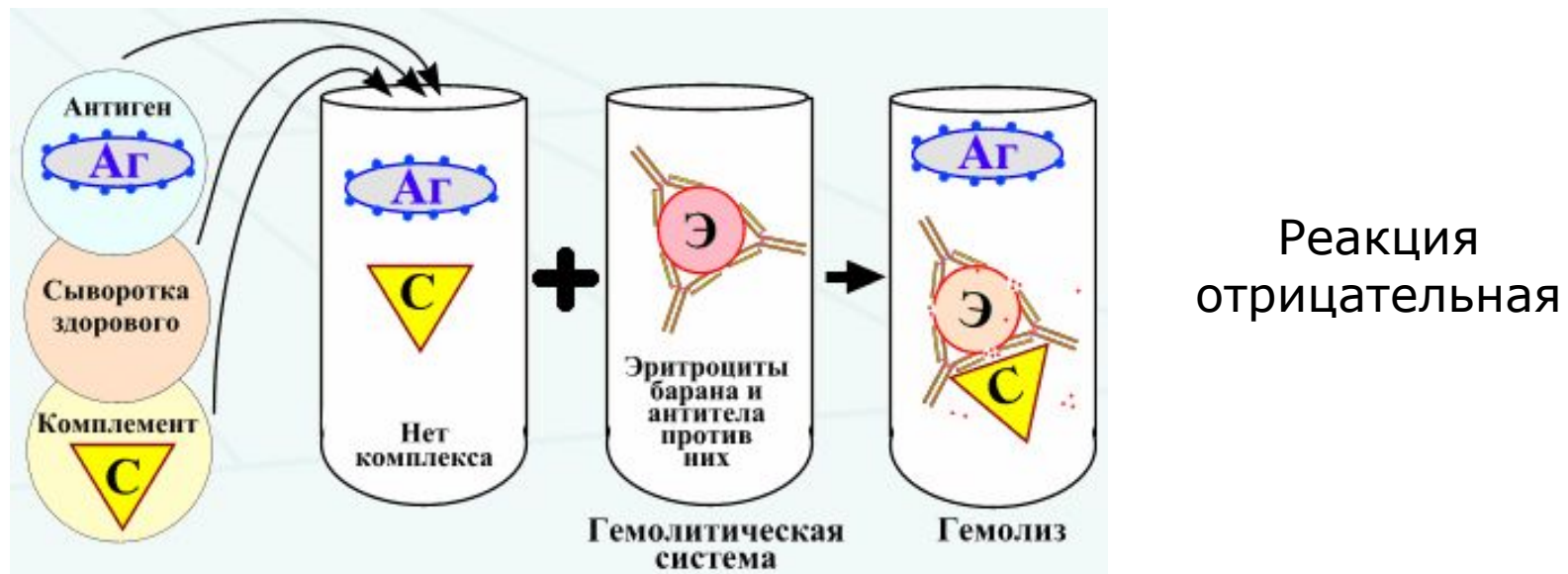
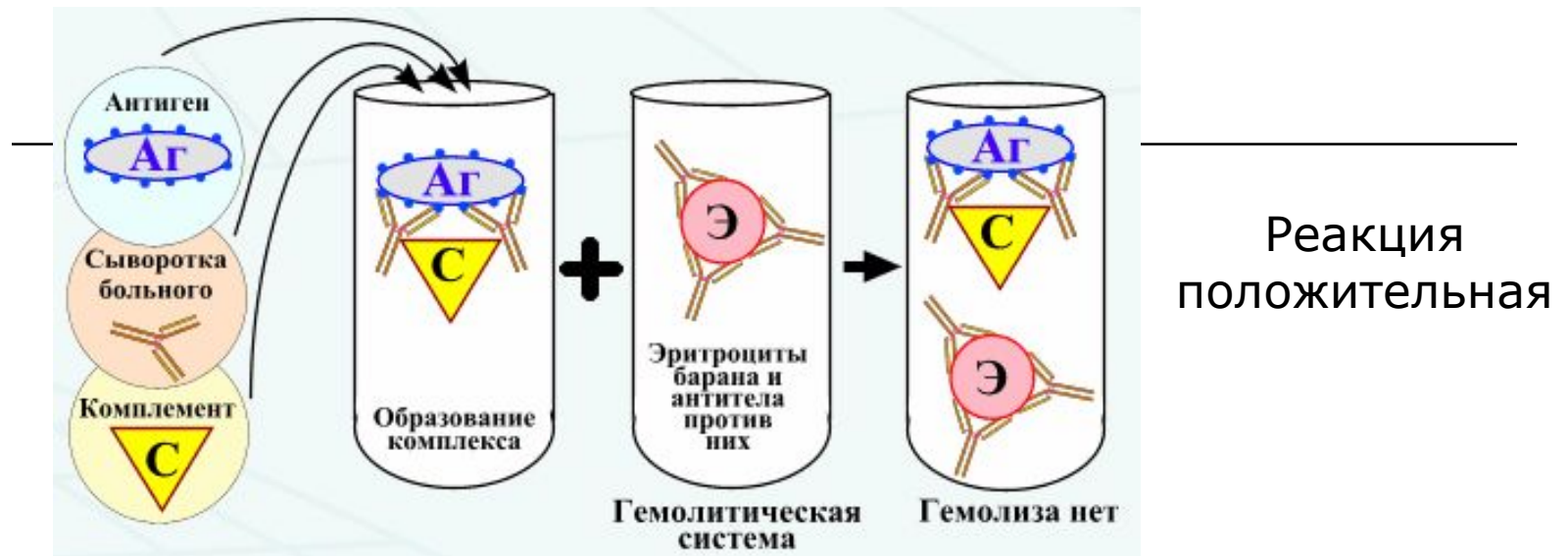
Реакция Борде— Жангу [по имени бактериологов Ж. Борде (J. Bordet) и О. Жангу (O. Gengou), 1901], высокоспецифичная и очень чувствительная серологическая реакция, основанная на свойстве комплекса антиген — антитело фиксировать свободный комплемент, применяемая при диагностике многих бактериальных и вирусных 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).

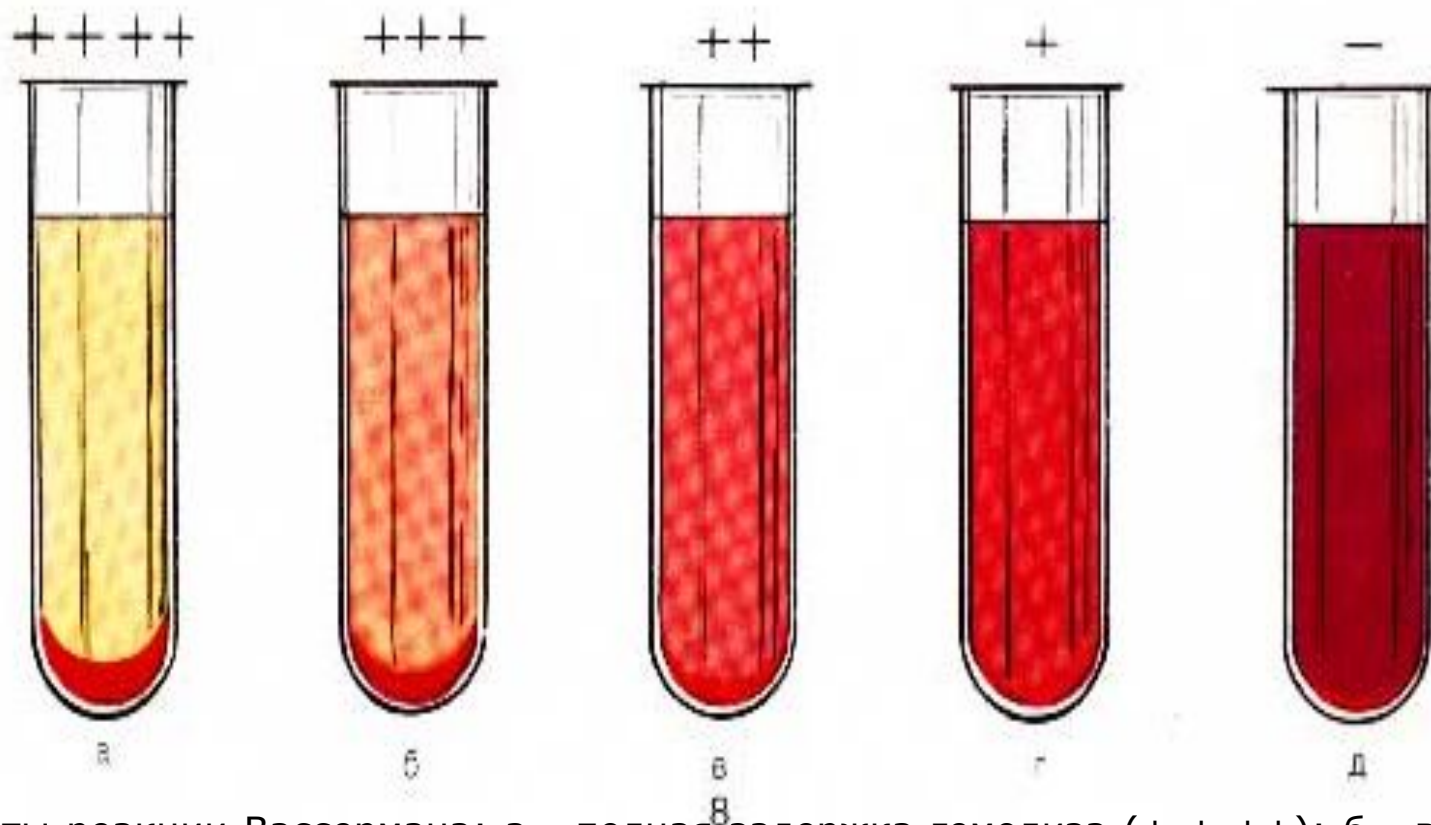
В РСК используют 2 системы: **специфич.** бактериол., состоящую из АТ (испытуемой сыворотки), АГ и комплемента, а также **неспецифич.** "индикаторную", содержащую гемолизин (гемолитич. сыворотка) и взвесь эритроцитов барана. АГ соединяется с АТ только в присутствии комплемента. Если испытуемая сыворотка 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

(А. Р. 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

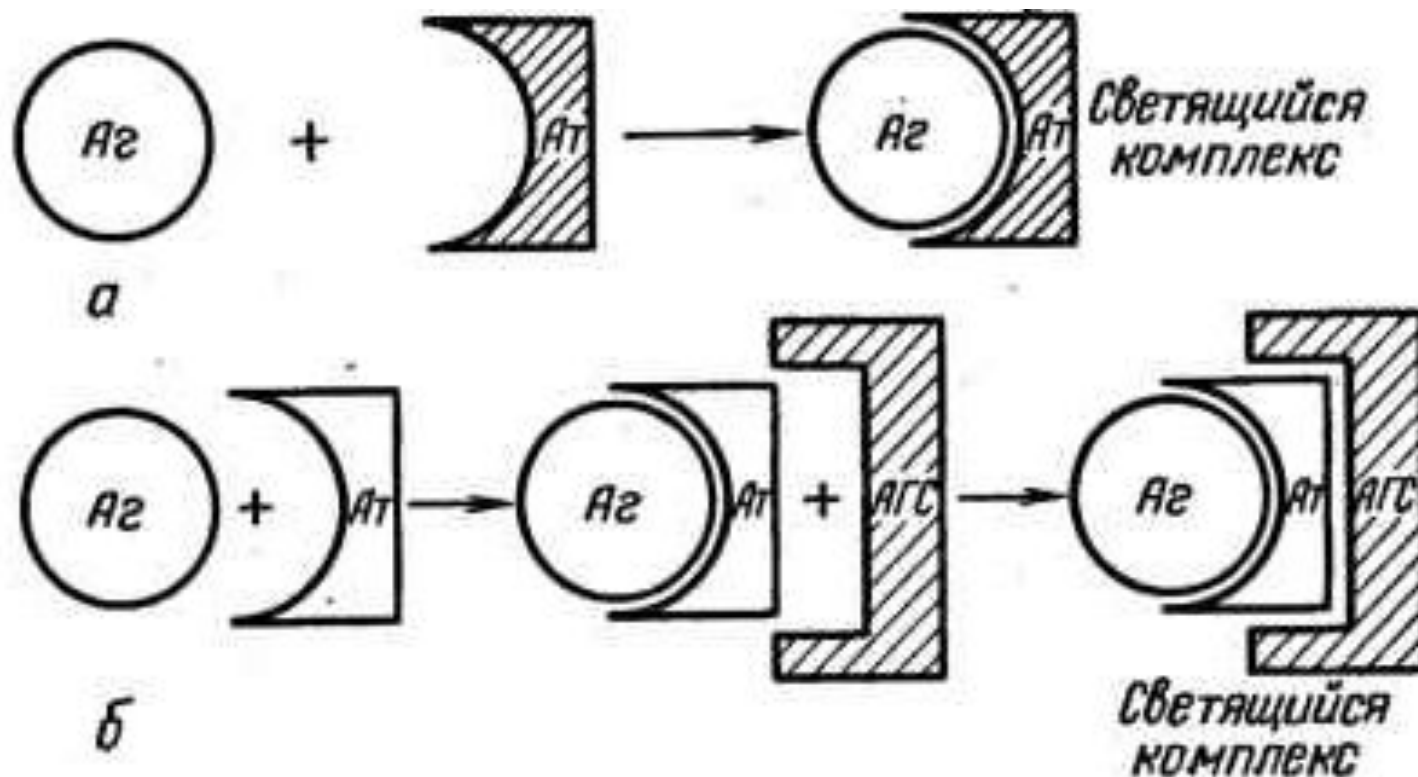


Рис. 55. Иммунофлюоресцентный метод Кунса (схема).

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

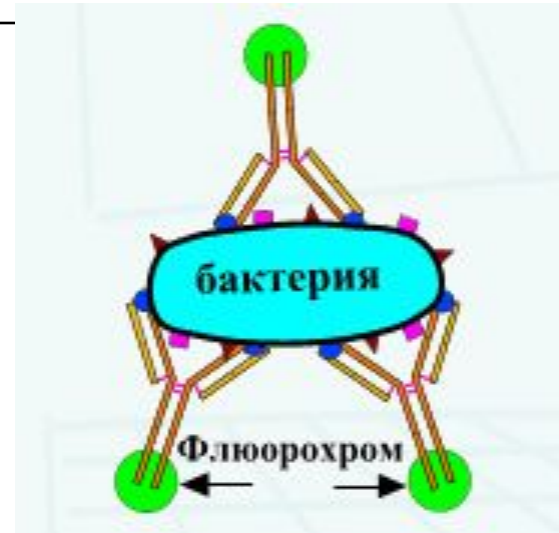
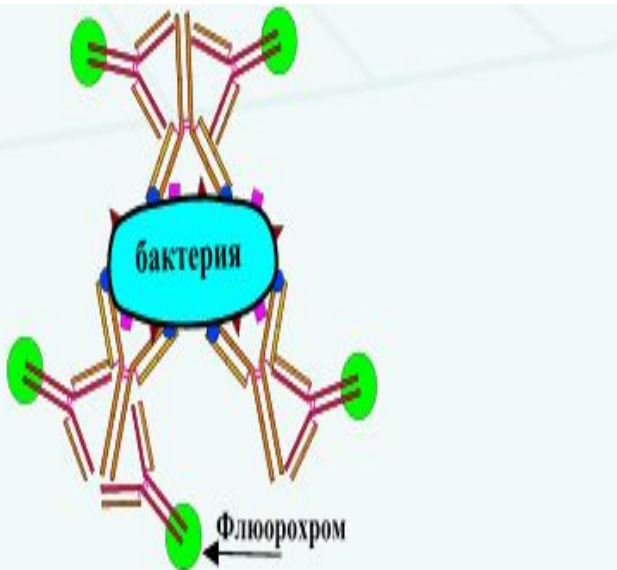
Кунса)-

или реакция иммунофлюорисценции(РИФ):

Прямой

флюорисцирующие АТ+
исследуемый АГ

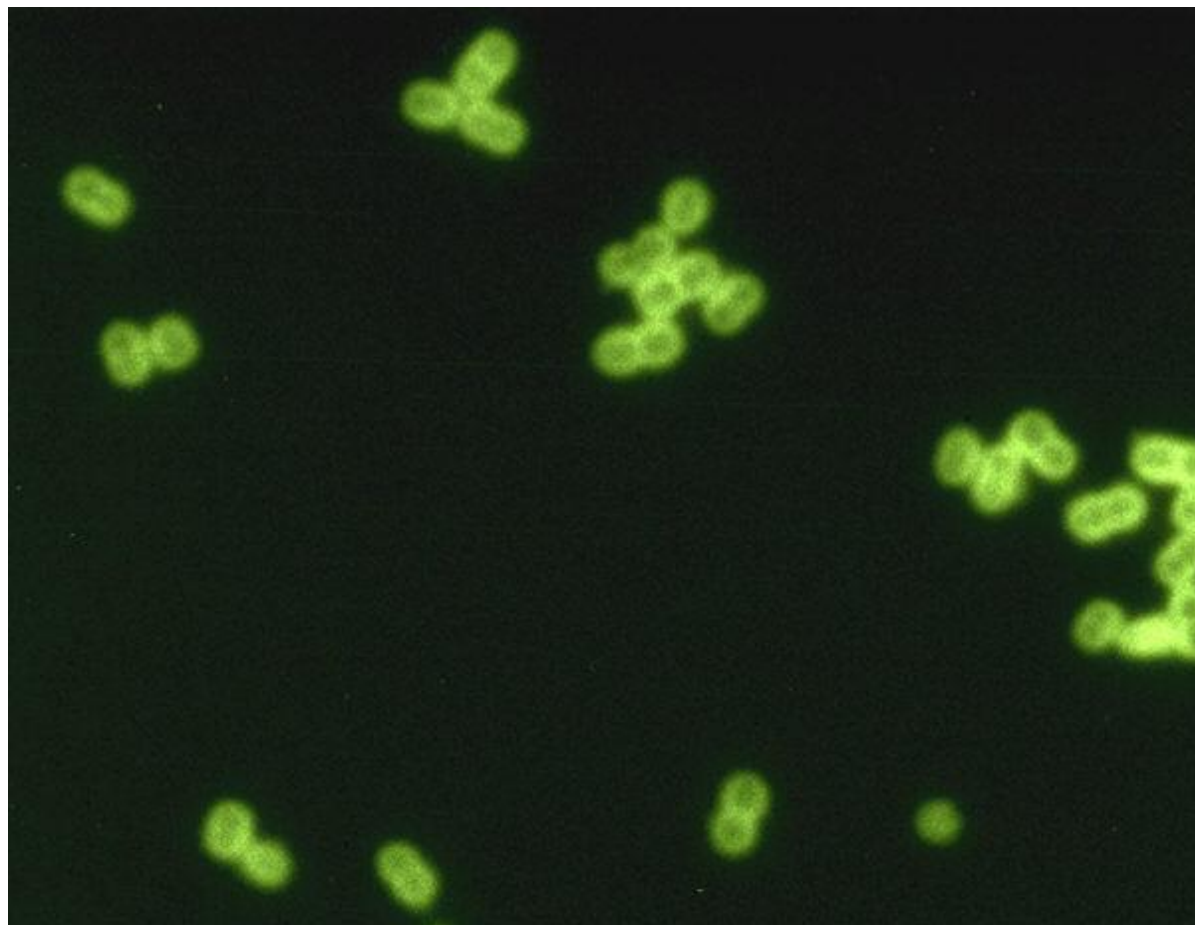
Светящийся комплекс

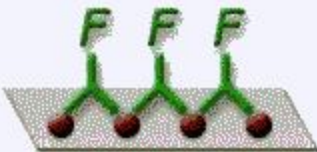
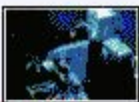
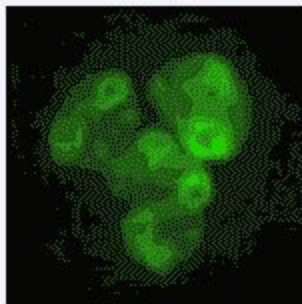
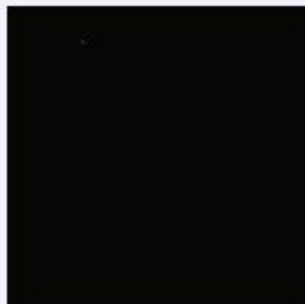


Светящийся комплекс

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

Иммунофлюоресцентный анализ



реагенты: неизвестный образец закрепляется на пленке (может содержать искомые антигены-  Ag	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ОБР_Ц Ag присутствует на пленке 	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ ОБР_Ц Ag отсутствует на пленке 
реагенты: меченные флуоресцеином антитела к искомому антигену (дается время для протекания реакции связывания)  F несвязавшиеся антитела смывают		
ПРОЦЕДУРА: наблюдение под флуоресцентным микроскопом  РЕЗУЛЬТАТ: ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ- зеленая флуоресценция ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ- отсутствие флуоресценции		

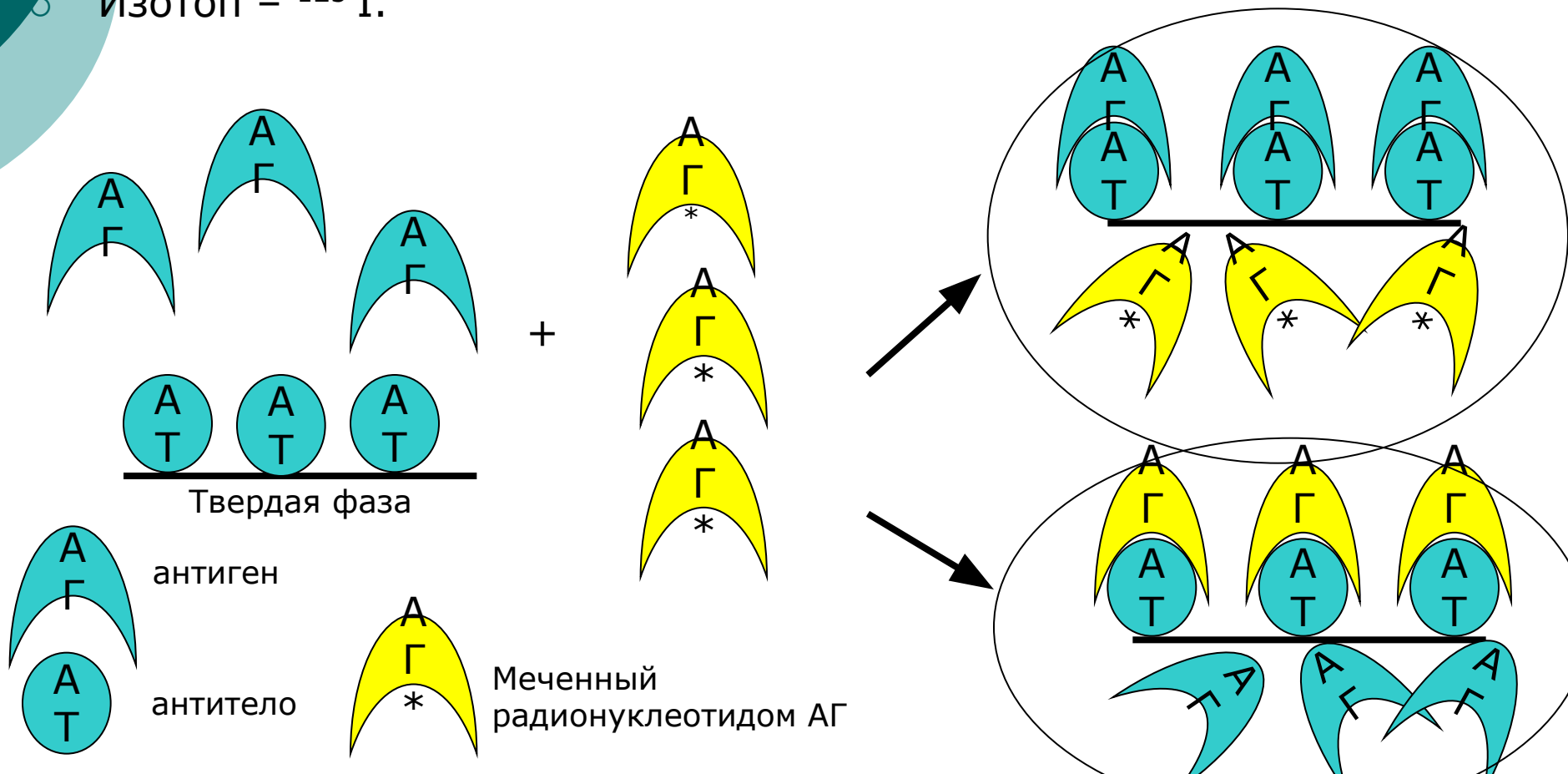
Immunofluorescence Assay (IFA) or Fluorescent Antibody (FA) Test

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

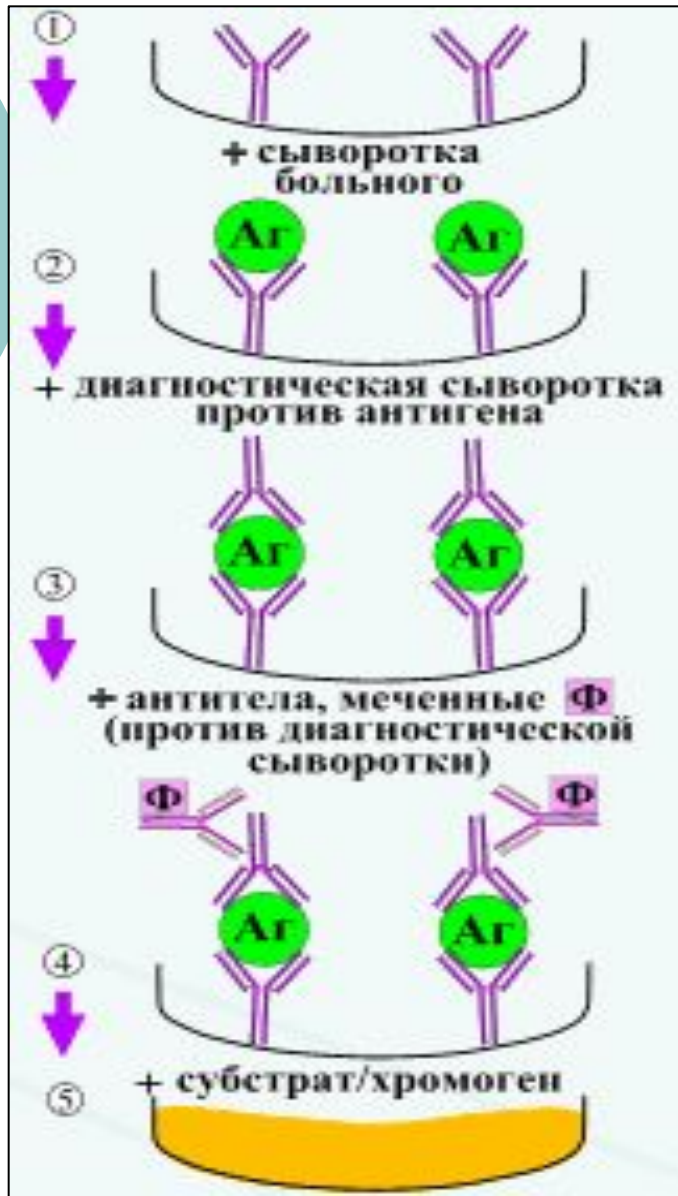
Субстрат

Схема иммуноферментного анализа твёрдофазный вариант



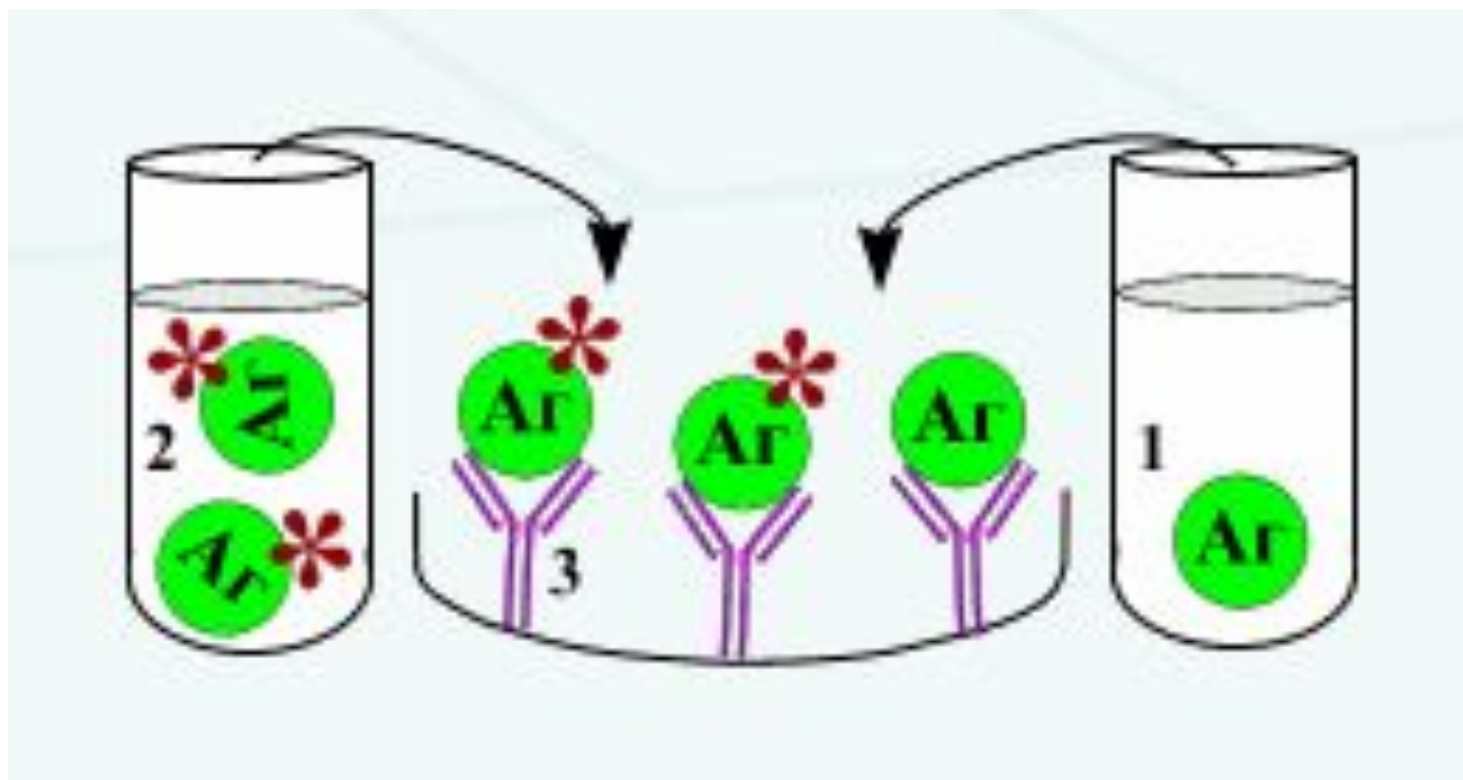
Определение
антител в
сыворотке
больного с
сорбированным
антигеном

Схема иммуноферментного анализа твёрдофазный вариант



Определение антигена
в сыворотке больного
с сорбированными
диагностическими
антителами

Конкурентный вариант ИФА для определения антигенов

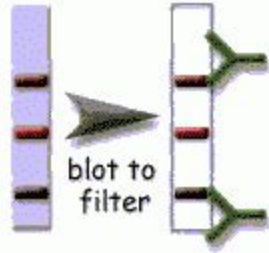
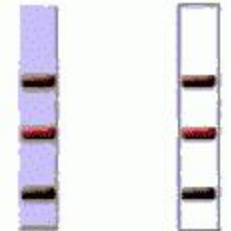
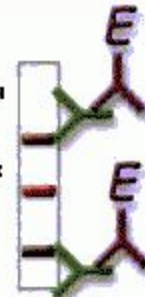
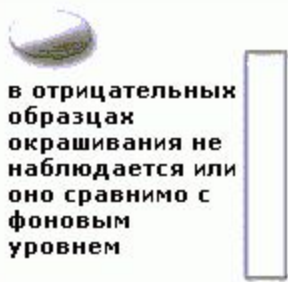


Иммунологические планшеты, используемые для постановки ИФА



Автоматический биохимический и иммуноферментный анализатор



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

ПРОЦЕДУРА "WESTERN BLOT"