

# **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:

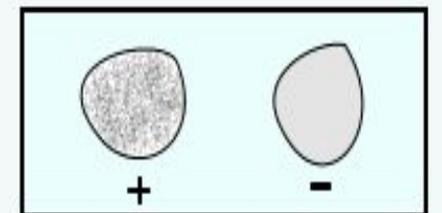
**капля диагностической агглютинирующей сыворотки**  
(антитела) в разведении 1:10 или 1:20

+

**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***

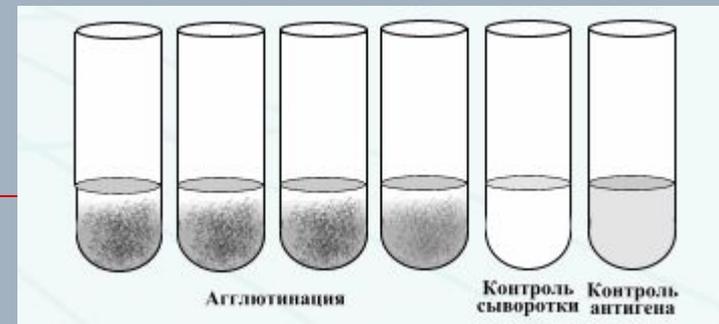
**+**

***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**

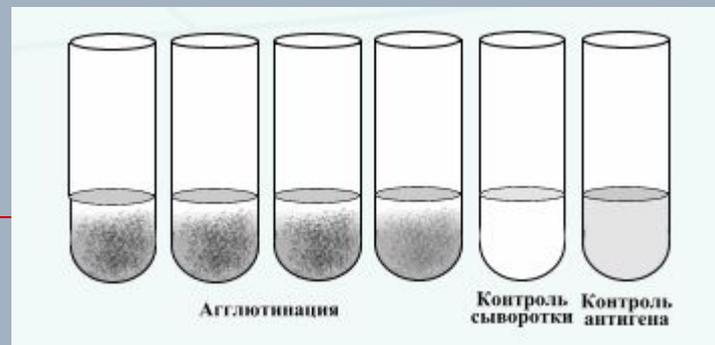
(бактерии, убитые нагреванием, => *O*-антиген)

- 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.
-

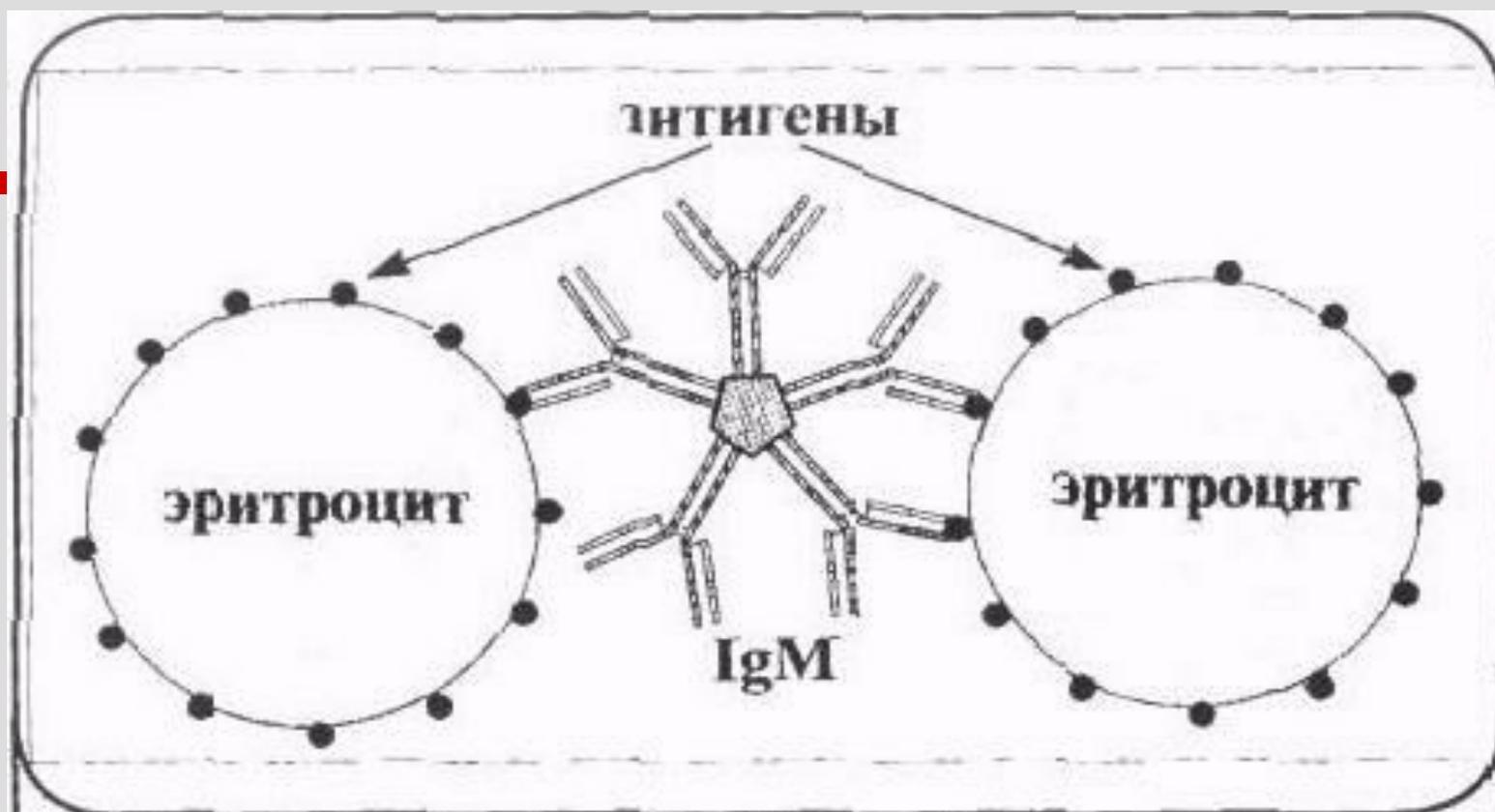


Рис. 13.2. Схема реакции не прямой (пассивной) гемагглютинации.

## 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.

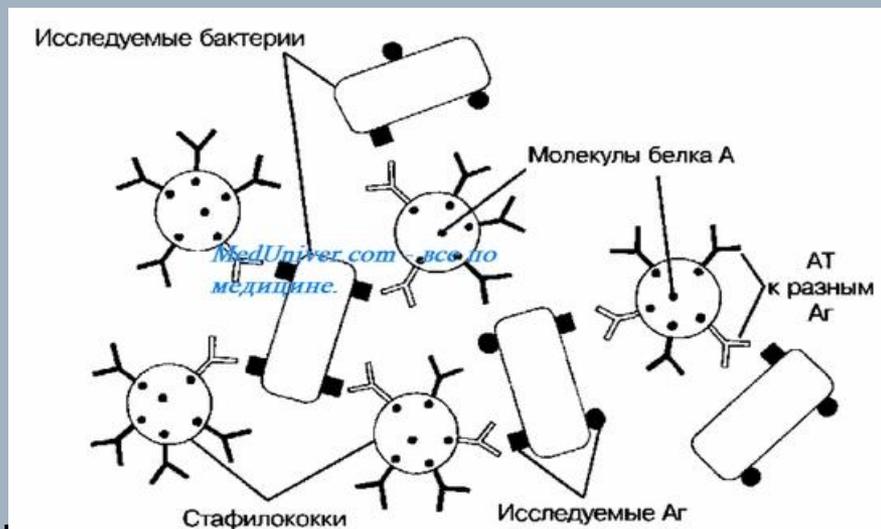
**Стафилококки**

+

**Иммунная диагностическая сыворотка** (предварительно)

+

**Микробы, выделенные от больных** (антигены)



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

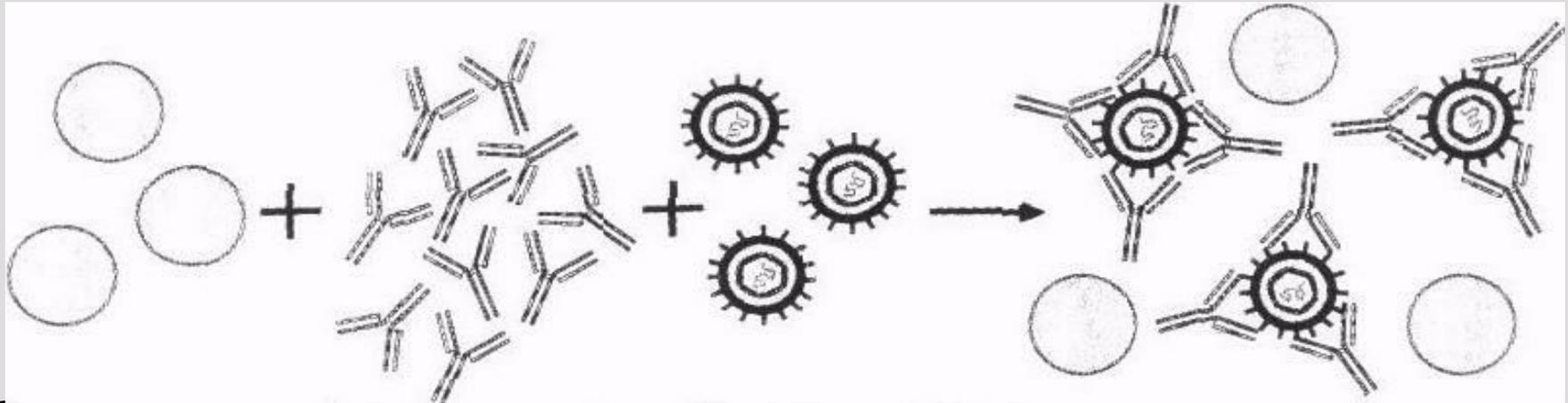
# **Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)**

**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**

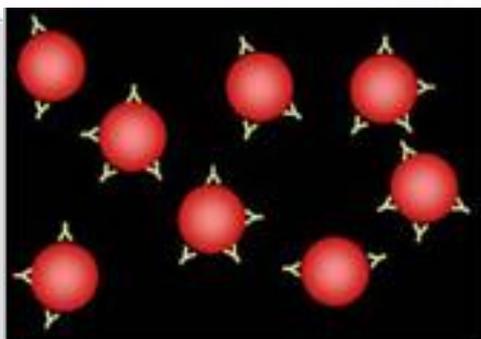
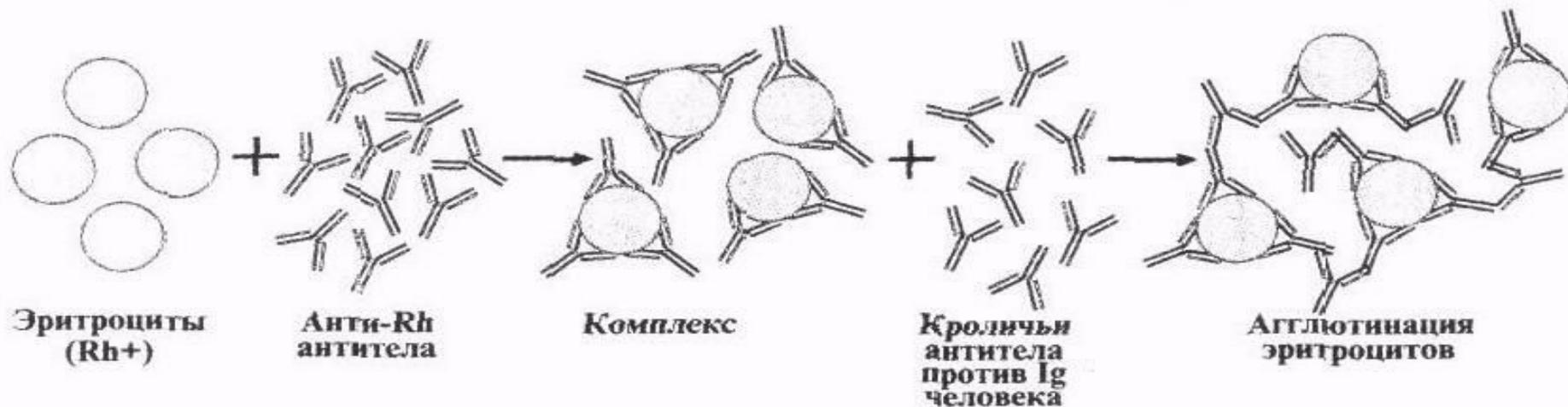
(антитела против иммуноглобулинов человека)

**Результат:** агглютинация эритроцитов.

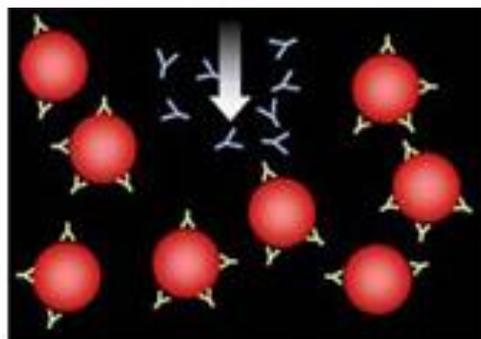
**Применение:** диагностика патологических состояний, связанных с внутрисосудистым лизисом эритроцитов (ГБН: эритроциты резус-положительного плода соединяются с циркулирующими в крови неполными антителами к резус-фактору, которые перешли через плаценту от резус-отрицательной матери).

---

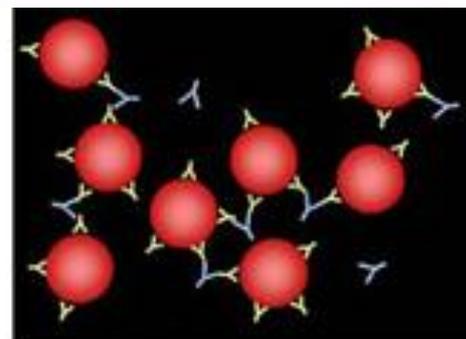
# Схема реакции Кумбса



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:

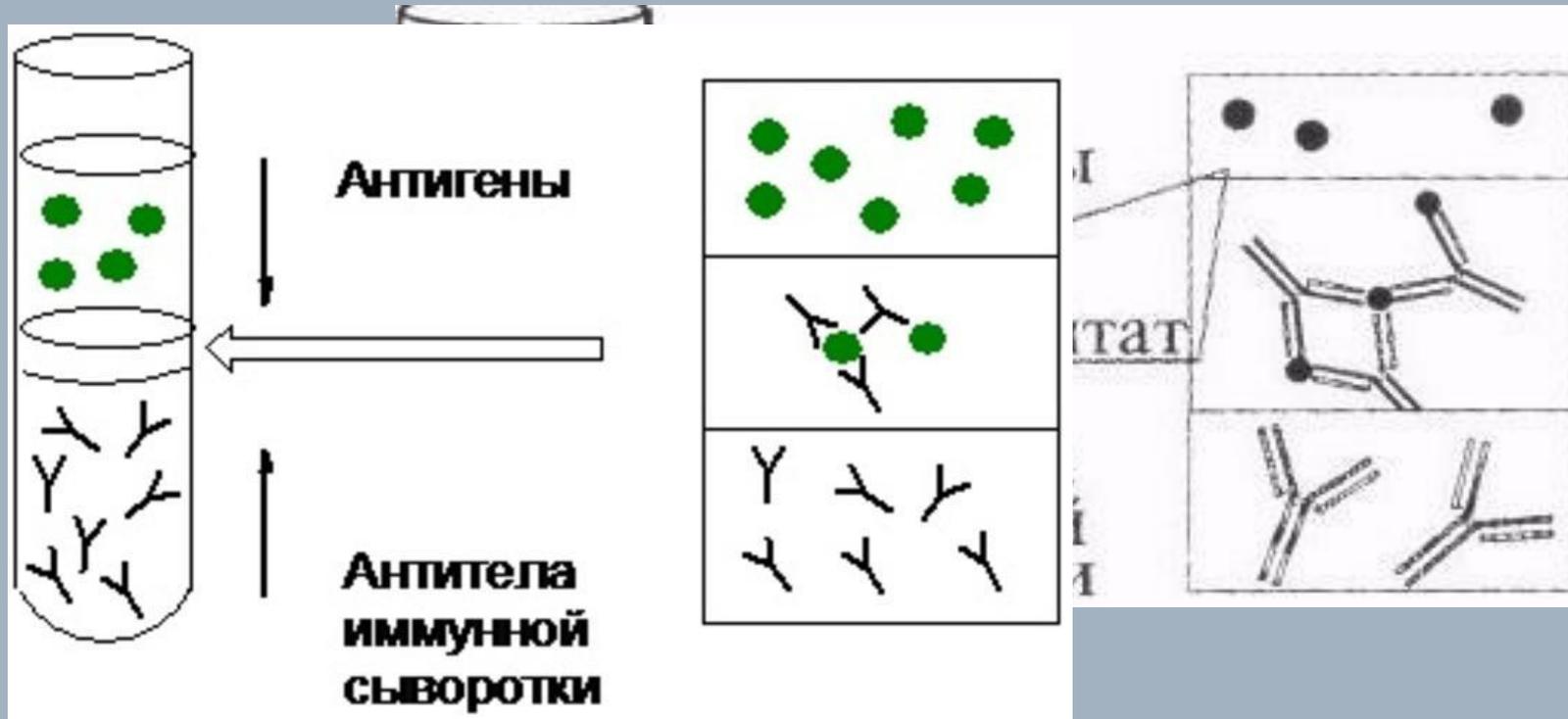
на иммунную сыворотку наслаивают растворимый антиген.

**Результат:** образуется непрозрачное кольцо преципитата

---

## **Реакция Асколи** (при сибирской язве)

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



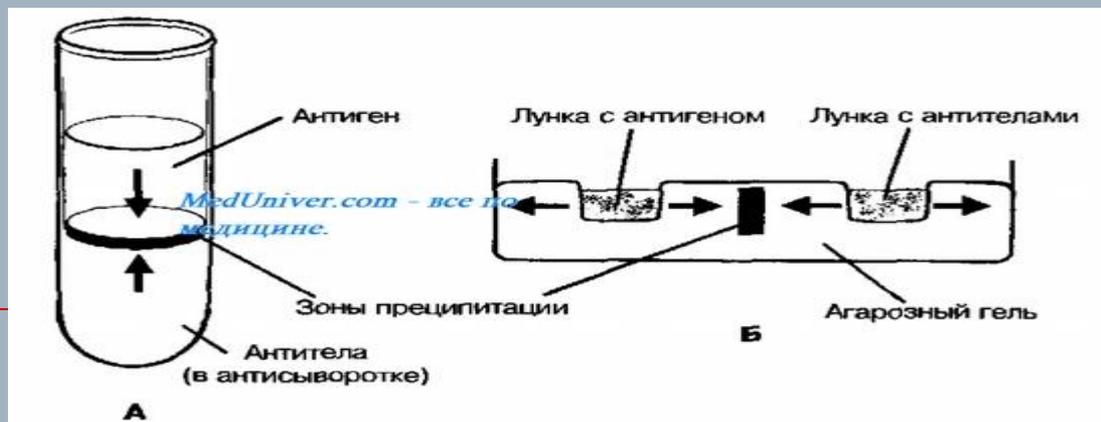
# Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони.

## 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.

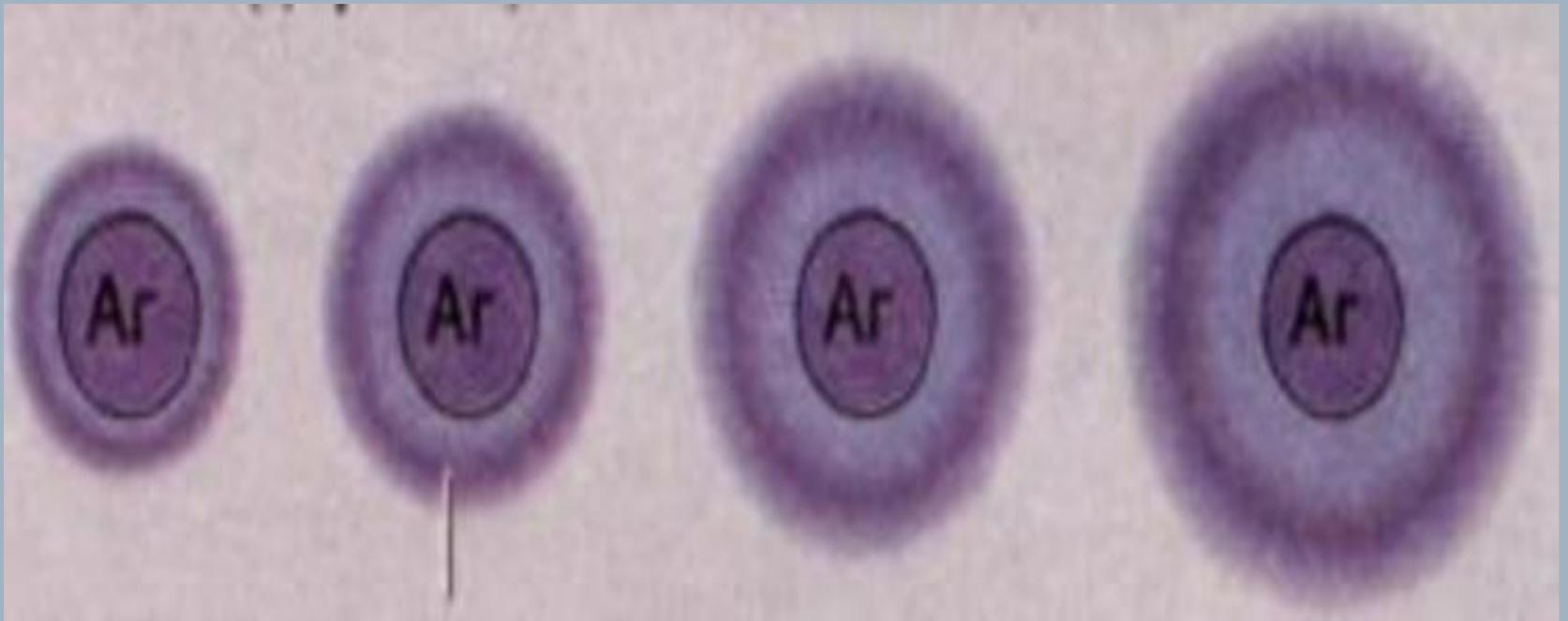
---

# 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

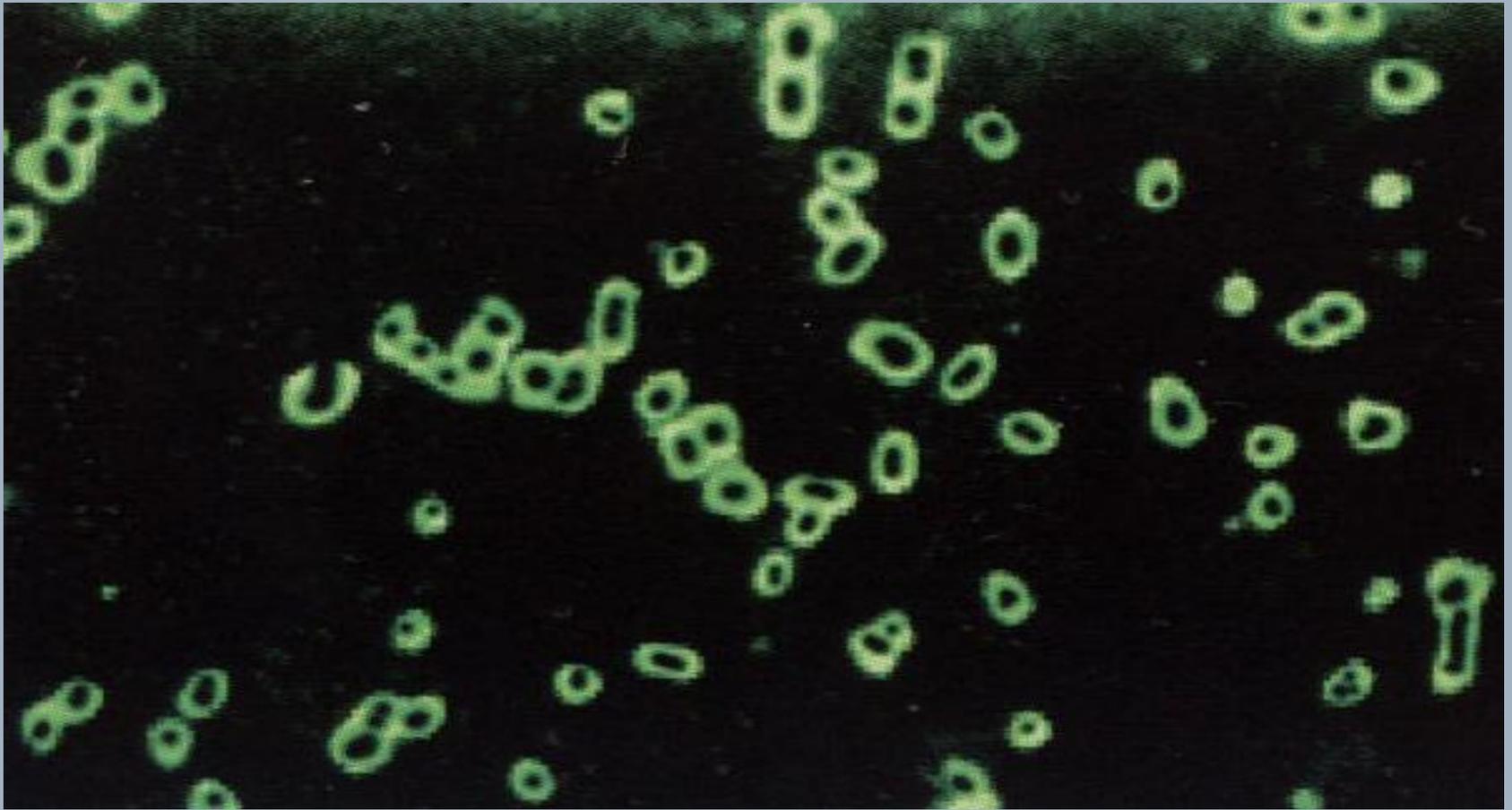


Рис. 13.10, а,б. Схема реакции прямой (а) и непрямой (б) иммунофлюоресценции.

# ***Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)***

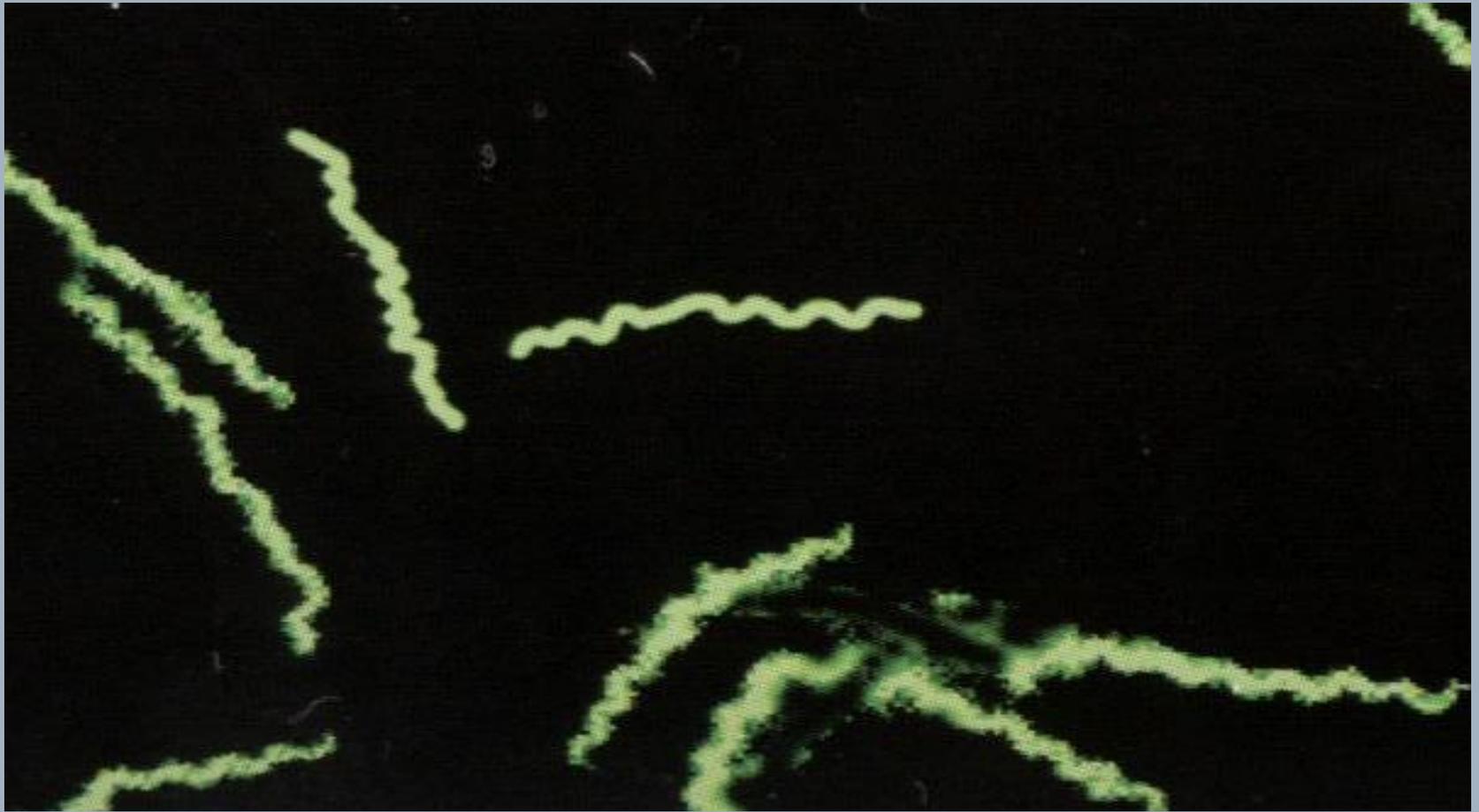
Препарат риккетсий

---



# ***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)

---

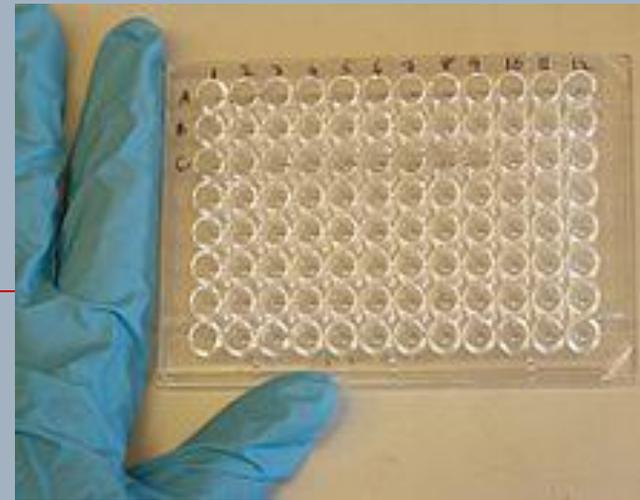


## Применение:

- 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.

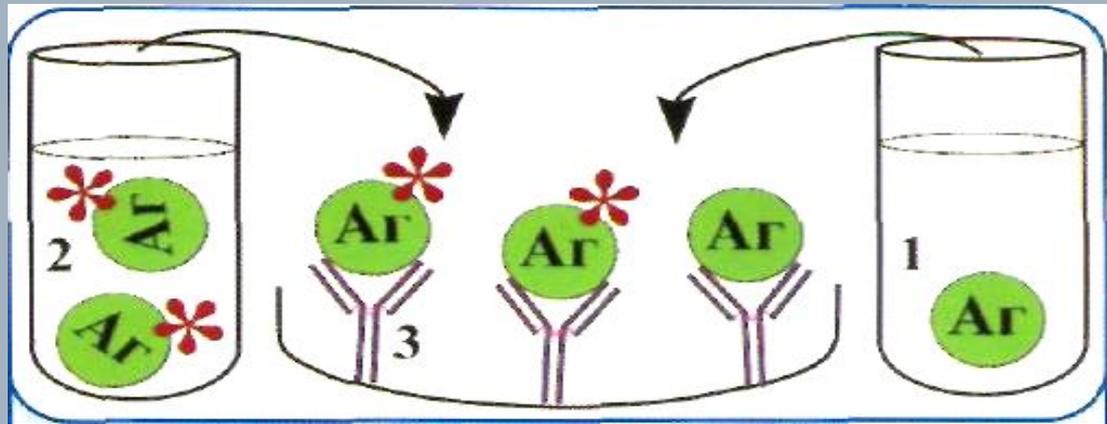
---

# 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.

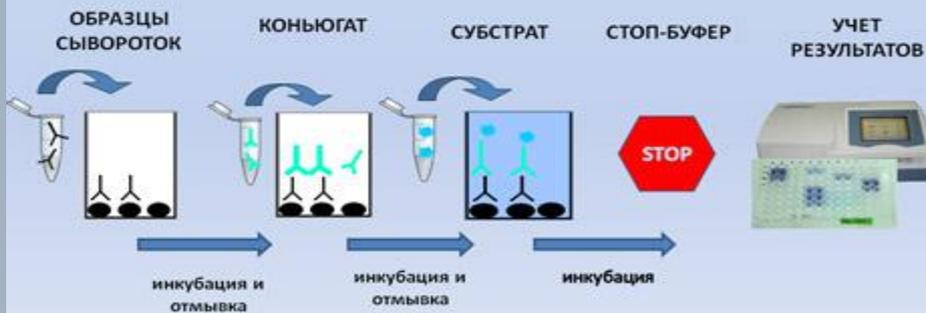
Интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.



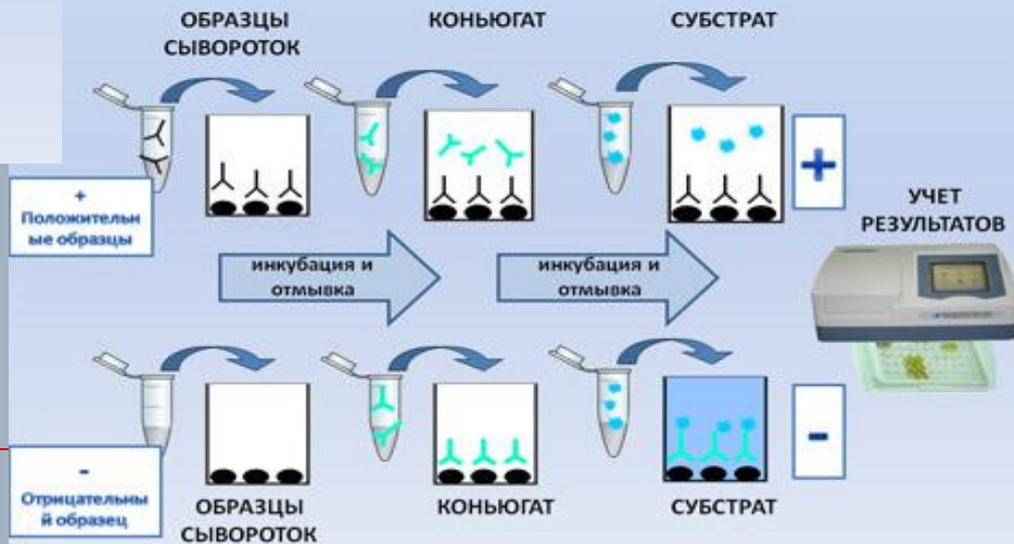
# Твердофазный ИФА

(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)

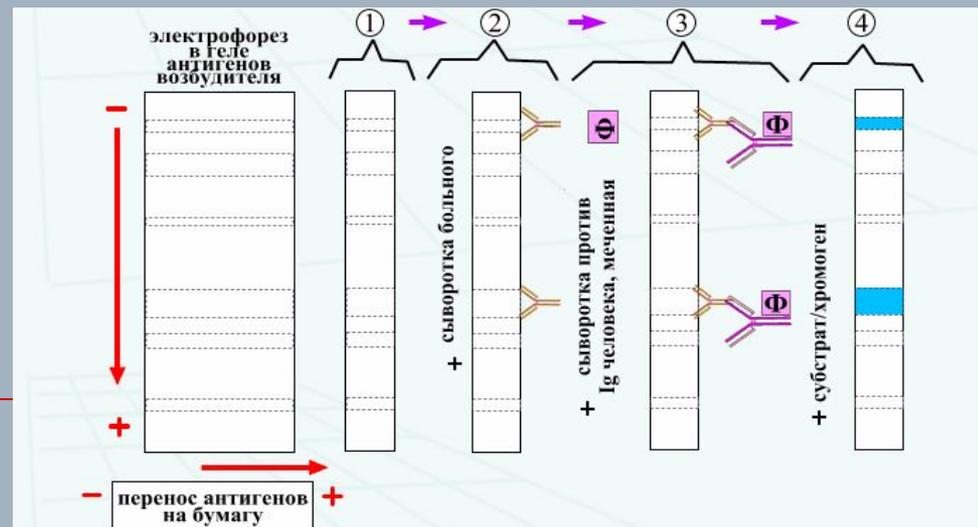
- сочетание электрофореза и ИФА или РИА.  
Высококчувствительный метод

**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!***

