

- В основе иммунодиагностики инфекционных заболеваний лежит применение серологических реакций.
- **Серологическая реакция** - это реакция между **антигеном** и **антителом** in vitro, с помощью которой можно найти или неизвестный антиген (используя известное антитело), или неизвестное антитело (используя известный антиген).
- **Свойства серологических реакций:**
 - специфичность
 - чувствительность

Антигены

Антигены – все органические вещества, которые несут признаки генетически чужеродной информации и при введении в организм вызывают развитие специфических иммунологических реакций (образование антител, иммунологическую толерантность, иммунологическую память, формирование гиперчувствительности замедленного типа)

Свойства антигенов:

1. **Иммуногенность** – способность антигена вызывать иммунологические реакции.
2. **Антигенность** – способность антигена специфически реагировать с антителами и сенсibilизированными лимфоцитами
3. **Специфичность** – определяется индивидуальностью поверхностных химических структур антигена (детерминантами)

Детерминанты антигенов – это поверхностные химические структуры антигена, с помощью которых он взаимодействует с рецепторами лимфоцитов и активными центрами иммуноглобулинов (антител)

Классификация антигенов

1. **ПОЛНЫЕ** – обладающие одновременно иммуногенными и антигенными свойствами (белки, липополисахариды, липопротеины и др.)
2. **НЕПОЛНЫЕ (ГАПТЕНЫ)** – вещества (липиды, углеводы и др.) или фрагменты полных и комплексных антигенов, обладающих только антигенностью.
3. **КОМПЛЕКСНЫЕ** – содержащие в своем составе несколько самостоятельных полных и неполных антигенов (клетки органов и тканей, микроорганизмы и др.)

Бактериальные антигены (АГ)

- По специфичности:

1) группоспецифические

(встречаются у разных видов одного рода или семейства);

2) видоспецифические

(встречаются у представителей одного вида);

3) типоспецифические

(определяют серологические варианты – **серовары** – внутри одного вида).

Бактериальные антигены (АГ)

- По локализации в бактериальной клетке:

1) **O – АГ** (соматический)

ЛПС (у грам-) или полисахарид (у грам+) клеточной стенки; термостабилен (выдерживает кипячение в течение 1–2 ч);

2) **H – АГ** (жгутиковый) – белок флагеллин; термолабилен;

3) **K – АГ** (капсульный) – полисахарид (реже полипептид) капсулы;

по чувствительности к температуре K - АГ подразделяются на A-, B- и L-антигены.

Разновидности K - АГ: **Vi – АГ, поверхностно-оболочечные АГ.**

4) **токсины и ферменты**

Антитела (иммуноглобулины)

Глобулины, продуцируемые плазмочитами при попадании в организм антигена, способные специфически взаимодействовать с данным антигеном.

Классификация иммуноглобулинов:

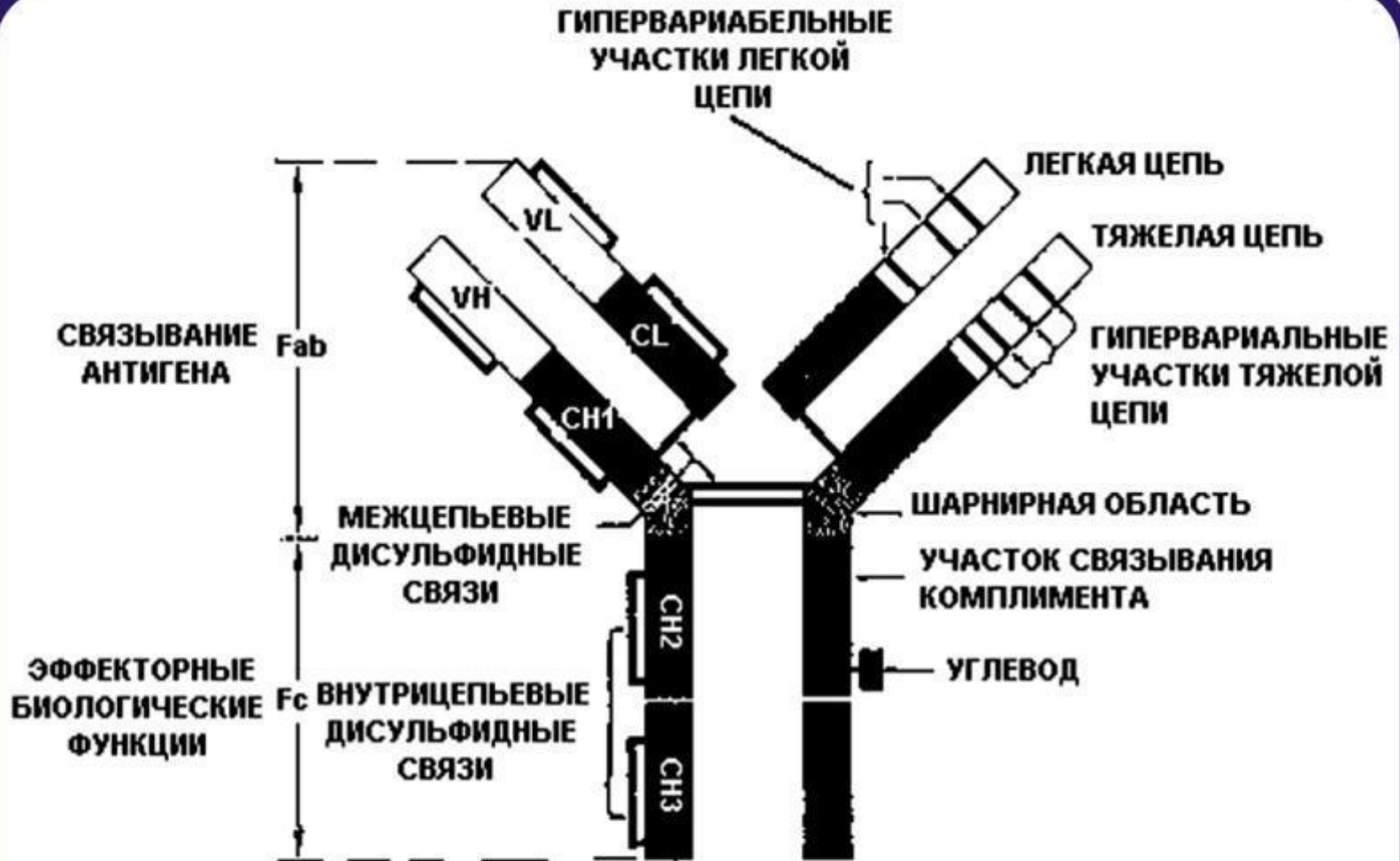
1. ПОВЕРХНОСТНЫЕ – связаны с наружной мембраной В-лимфоцитов
2. СЫВОРОТОЧНЫЕ – содержатся в сыворотке крови и лимфе
3. СЕКРЕТОРНЫЕ – содержатся в секреторных жидкостях

Классы и подклассы иммуноглобулинов:

IgD, IgM, IgG (G1, G2, G3, G4), IgA (A1, A2), IgE



Структура молекулы иммуноглобулина



VL и VH: ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ОБЛАСТИ
CL и CH: КОНСТАНТНЫЕ ОБЛАСТИ

- Реакция АГ-АТ в системе *in vitro* может сопровождаться возникновением нескольких **феноменов**: агглютинации, преципитации, лизиса.
- Для визуализации результата реакции также применяют различные **метки**, которые прикрепляют к АГ или АТ, а затем проводят детекцию меченного реагента:
 - флюорохромная метка для РИФ
 - ферментная метка для ИФА
 - радиоизотопная метка для РИА

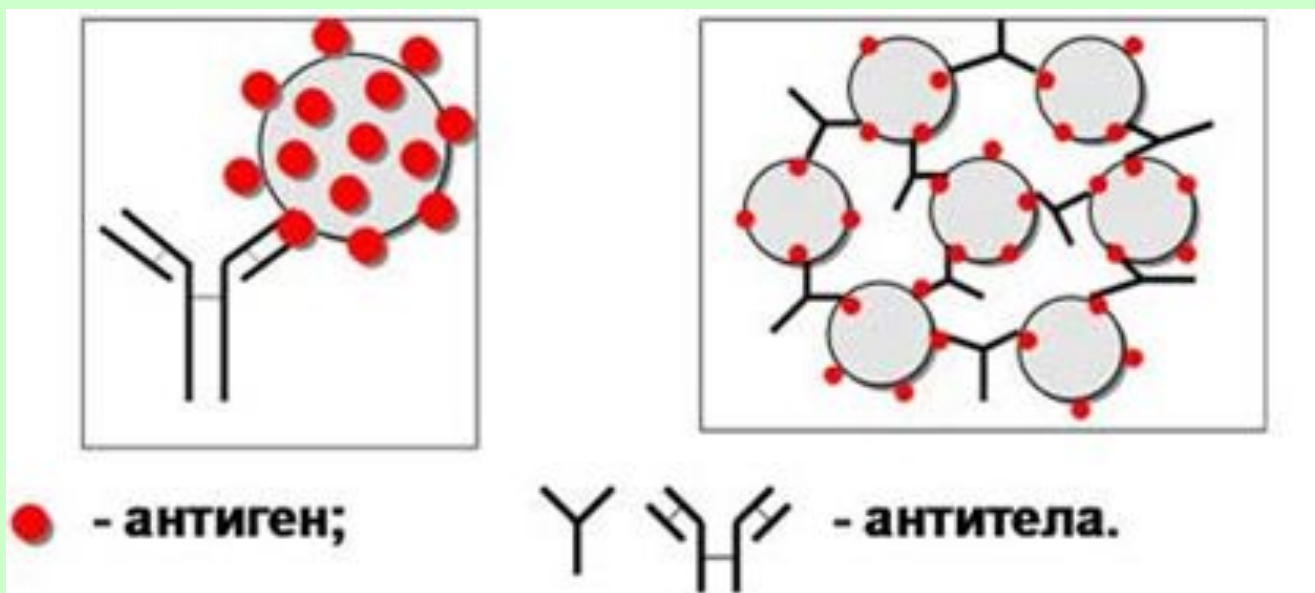
- Реакция агглютинации (РА) (от лат. *agglutinatio* - склеивание) – это склеивание **корпускулярных** антигенов (бактерий, эритроцитов, частиц с адсорбированными на них антигенами) антителами в присутствии электролитов.
- Проявляется в виде **хлопьев** или **осадка**, состоящих из корпускул (например, бактерий), «склеенных» антителами.
- Варианты РА:
 - прямая
 - пассивная (непрямая)

- Реакция преципитации (РП) (от лат. *praecipito* - осаждать) - это формирование и осаждение комплекса **растворимого** молекулярного антигена с антителами в виде **помутнения**, называемого преципитатом.
- Варианты РП:
 - 1) реакция кольцепреципитации
 - 2) реакция преципитации в геле

- Возникновение видимых невооруженным глазом агрегатов происходит в соответствии с **теорией решётки**:

к образовавшемуся комплексу АГ-АТ последовательно присоединяются другие молекулы АТ и АГ, формируются сетевые структуры, которые превращаются в агрегаты, выпадающие в осадок.

- Необходимое условие образования решетки - наличие несколько антигенных детерминант на каждую молекулу АГ и по два активных центра на каждую молекулу АТ (полные АТ).



Направления использования серологических реакций

1. Сероиндикация

это обнаружение АГ возбудителя в исследуемом материале с помощью известных АТ (диагностических сывороток);

реакции:

- РПГА
- РП
- ИФА
- РИФ

2. Сероидентификация

это определение АГ выделенной чистой культуры с помощью известных АТ (диагностических сывороток) (III этап бактериологического метода);

реакции:

3. Серодиагностика

это обнаружение АТ к возбудителю в **сыворотке крови** с помощью известных **АГ (диагностикумов)**;

реакции:

- РПГА
- РА
- РСК
- нРИФ
- ИФА

Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (**РПГА** или **РНГА**) для сероиндикации

- Ставится на стекле (**пластинчатая РПГА**)
- Компоненты:
 - **исследуемый материал** (в нём ищут АГ)
 - диагностическая сыворотка – **суспензионные АТ** (антитела к искомому АГ, адсорбированные на эритроцитах I группы крови человека)
- Учет визуальный:
при “+” реакции - красные хлопья, при “-” реакции – хлопьев нет

РПГА

**Положительная
(красные хлопья)**



**Отрицательная
(нет хлопьев)**



Реакция **кольцепреципитации** (**РП**) для сероиндикации

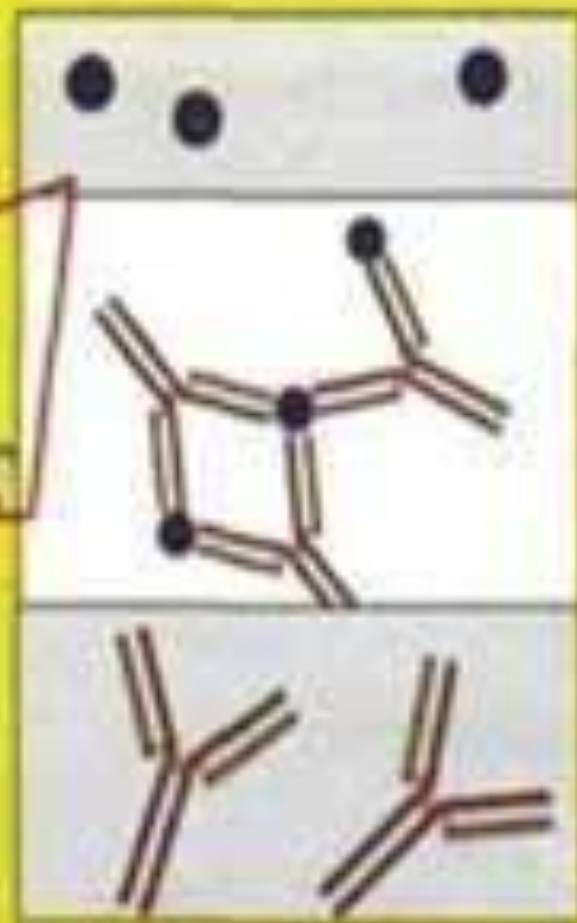
- Реакцию ставят в узких преципитационных пробирках
- Компоненты:
 - **исследуемый материал** (в нём ищут растворимый АГ)
 - **преципитирующая сыворотка**
- Учет визуальный:
при “+” реакции на границе двух растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата; при “-” реакции кольца нет



Антигены

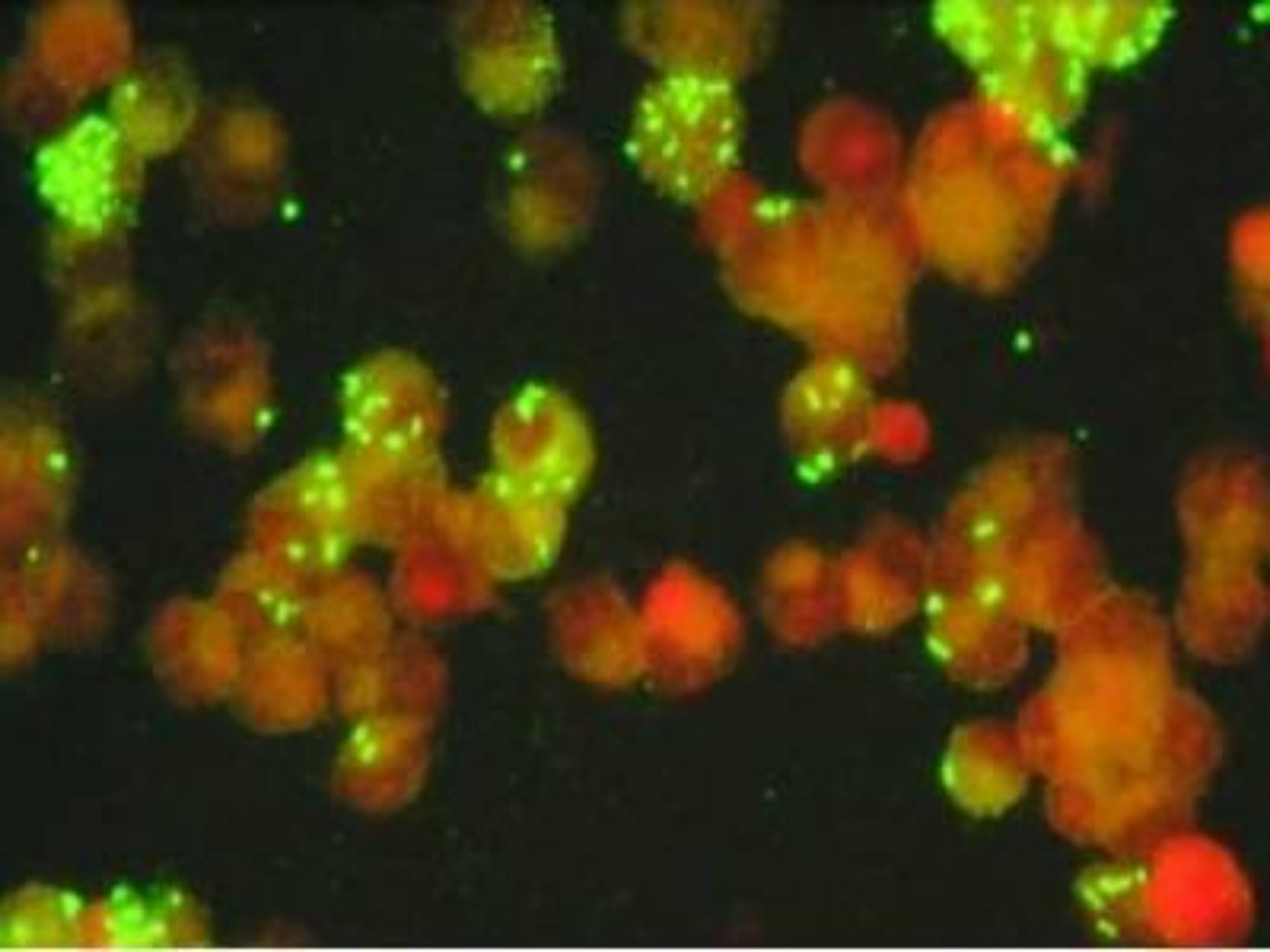
Преципитат

Антитела
иммунной
сыворотки



Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) для сероиндикации

- Ставится на стекле
- Компоненты:
 - **исследуемый материал** (в нём ищут АГ)
 - **люминесцирующая сыворотка** (- антитела к искомому АГ, меченные ФИТЦ)
- Инкубация и отмывка несвязавшихся компонентов
- Учет с помощью **люминесцентного микроскопа**:
при “+” реакции наблюдается специфическое (чаще – зелёное) свечение



ИФА для сероиндикации (“сэндвич” – вариант)

- Ставят в лунках планшета
- Компоненты:
 - **1-ые АТ**
 - **исследуемый материал** (в нём ищут АГ)
 - **2-ые АТ, меченные ферментом** (пероксидаза).
 - Инкубация, отмывка от несвязавшихся компонентов
 - Для учета в конце добавляют **субстрат** для фермента (H_2O_2) и **хромоген** (ТМБ)
- Учет:
 - или визуальный (изменение цвета раствора в лунке)
 - или с помощью спектрофотометра (измеряется оптическая плотность раствора в лунке)



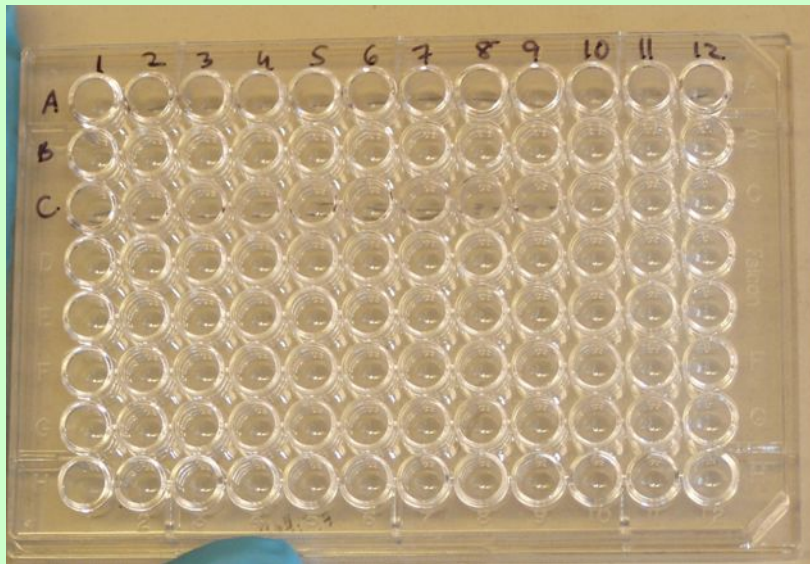
**Антитела к Ag,
меченные ферментом**

Ag

AT

Выявление антигена

Планшет для ИФА



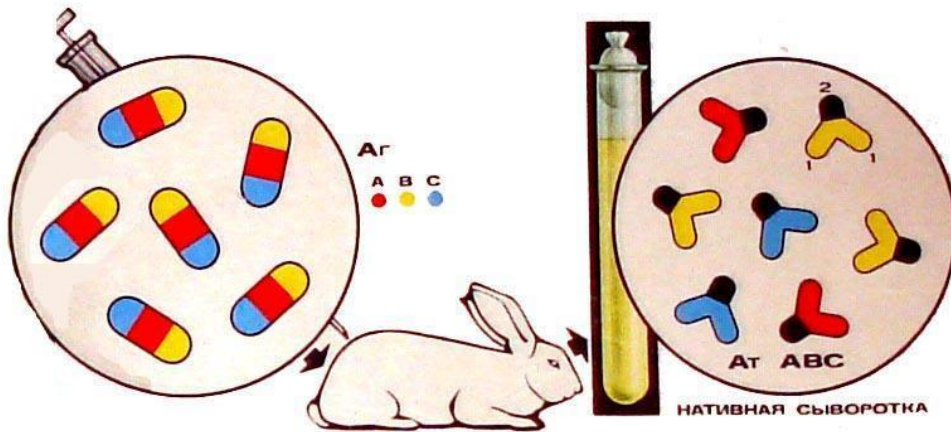
Спектрофотометр (ридер)



Реакция агглютинации (**РА**) для сероидентификации

- Ставится на стекле (**пластинчатая РА**)
- Компоненты:
 - **неидентифицированная чистая культура**
 - **диагностическая сыыворотка** **агглютинирующая**
- Учет визуальный:
 - при “+” реакции – белые хлопья
 - при “-” реакции – равномерная мутность

ПОЛУЧЕНИЕ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК



МЕТОД АДСОРБЦИИ АГГЛЮТИНИНОВ (ПО КАСТЕЛЛАНИ)

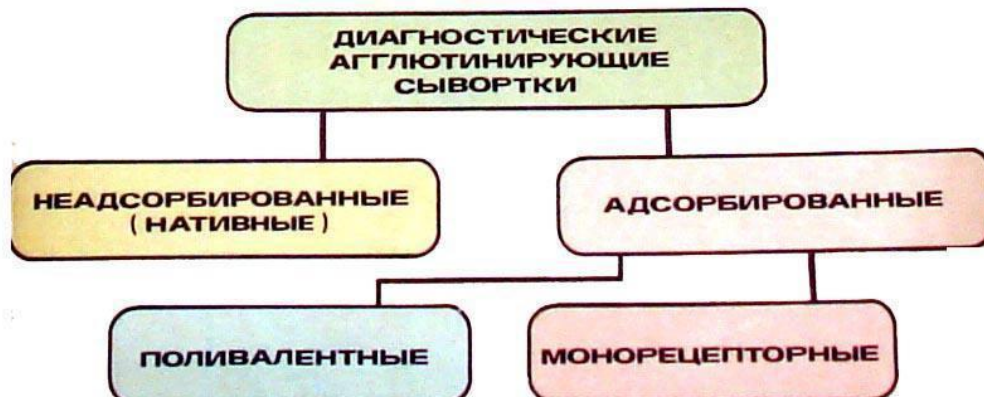
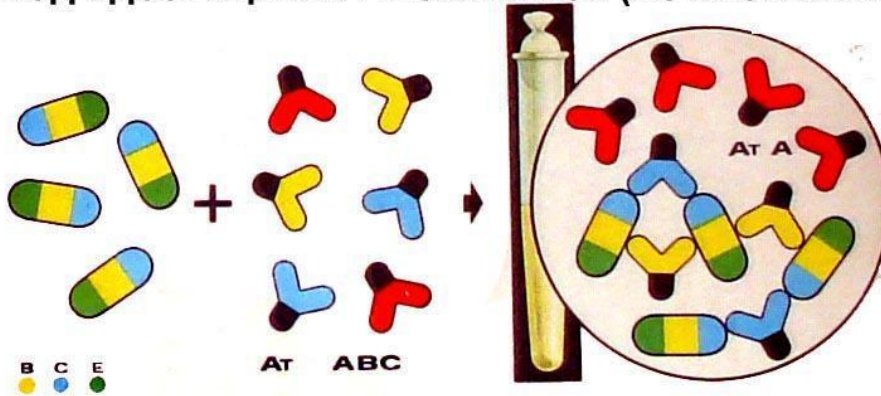
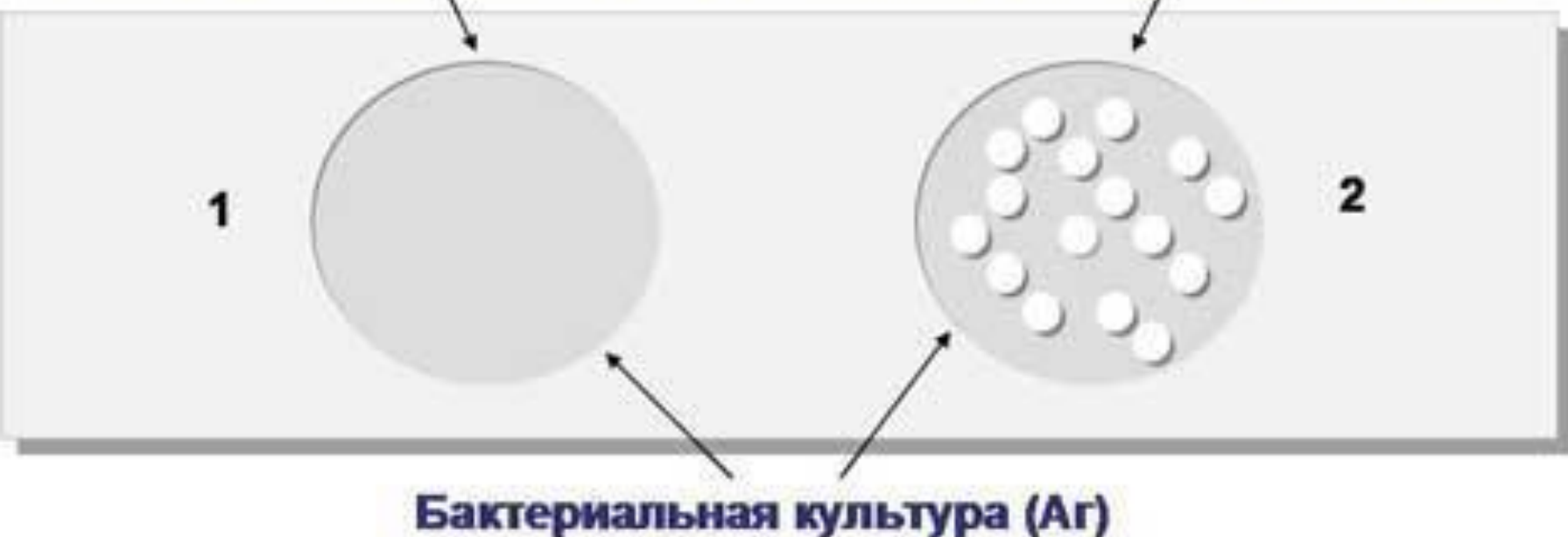


Схема реакции агглютинации на стекле

Изотонический раствор

Диагностическая сыворотка (АТ)



1 - контроль; 2 – агглютинат (хлопья) положительная реакция.

Реакция **преципитации в геле** (**РП**) для сероидентификации

- Ставится в чашках Петри с питательным агаром (выполняет роль геля)
- Компоненты:
 - **идентифицированная чистая культура**
 - **диагностическая** **антитоксическая**
сыворотка
- Учет визуальный:
при “+” реакции видны белые “усы”
(полосы) преципитации



Принципы серодиагностики

1. Определение количества (**титра**) АТ в сыворотке крови пациента
 - Титр АТ соответствует максимальному разведению сыворотки пациента, в котором реакция ещё положительная.
2. Титр АТ пациента сравнить с **диагностическим титром**
3. Изучение изменений титра АТ **в динамике** (в парных сыворотках с интервалом 7 – 14 – 21 дней)
4. Определение титра АТ **разных классов:** IgM, IgG, IgA

Реакция агглютинации (**РА**) для серодиагностики

- Ставится в пробирках (**развернутая РА**)
- Компоненты:
 - раститрованная **сыворотка больного** (в ней ищут АТ к определенному АГ)
 - **бактериальный диагностикум**
- Учет визуальный:
 - при “+” реакции – **белые хлопья**
 - при “-” реакции – **отсутствие хлопьев**

Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (**РПГА** или **РНГА**) для серодиагностики

- Ставится в планшете (**развернутая РПГА**)
- Компоненты:
 - раститрованная **сыворотка больного** (в ней ищут АТ к определенному АГ)
 - **эритроцитарный** **диагностикум** (АГ бактерий, адсорбированные на эритроцитах I группы крови человека)
- Учет визуальный:
 - при “+” реакции – осадок в виде **“зонтика”**
 - при “-” реакции – осадок в виде **“пуговки”**

Результат РНГА (РПГА)



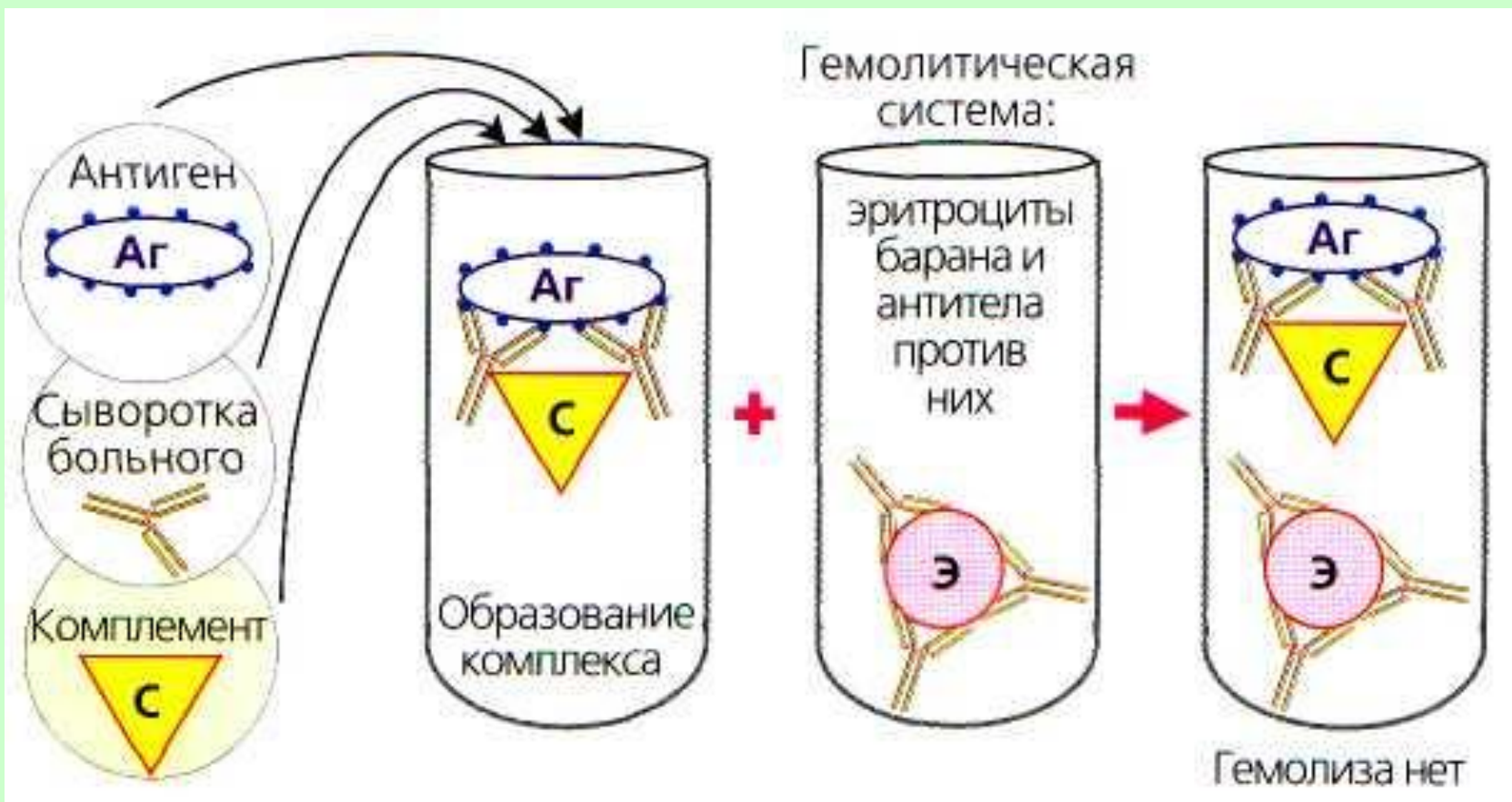
Положительный («зонтик»)

Отрицательный («пуговка»)

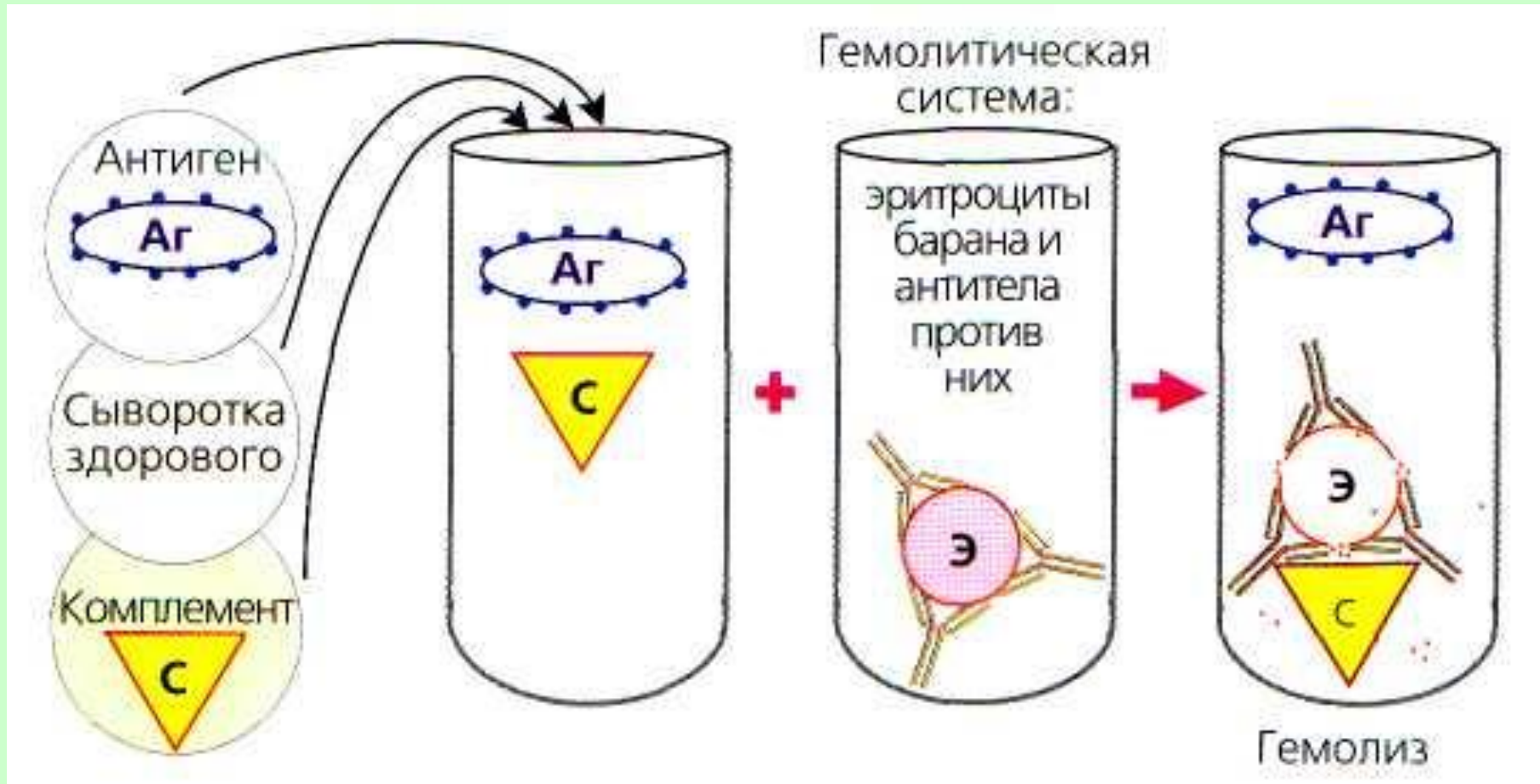
Реакция связывания комплемента (РСК) для серодиагностики

- Ставится в пробирках
- Компоненты:
 - сыворотка больного (в ней ищут АТ к определенному АГ)
 - диагностикум
 - комплемент
- Для учета реакции добавляют индикаторную систему, состоящую из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки.
- Учет – визуальный:
 - при “+” реакции – осадок из эритроцитов
 - при “-” реакции – гемолиз (“лаковая кровь”)

Положительная РСК



Отрицательная РСК



ИФА для серодиагностики

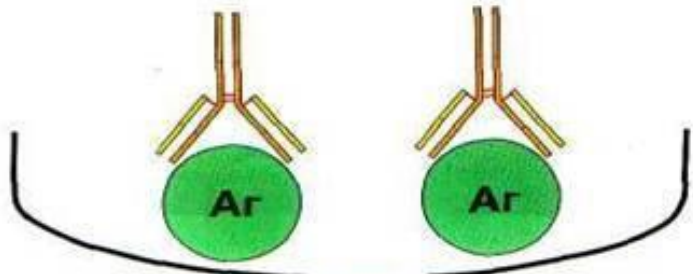
- Ставят в лунках планшета
- Компоненты:
 - АГ бактерий (диагностикум)
 - сыворотка пациента (в ней ищут АТ)
 - антиглобулиновая сыворотка (АГС) (антитела к антителам), меченная ферментом
 - Инкубация, отмывка несвязавшихся компонентов
 - Для учета в конце реакции добавляют **субстрат** для фермента (H_2O_2) и **хромоген** (ТМБ)
- Учет:
 - или визуальный (изменение цвета раствора в лунке)
 - или с помощью спектрофотометра (измеряется оптическая плотность раствора в лунке)

①



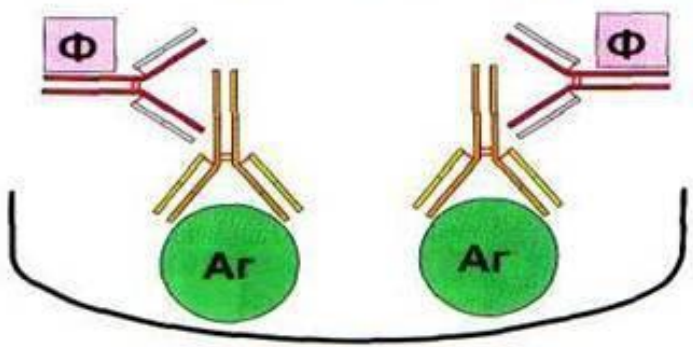
+ сыворотка
больного

②



+ сыворотка против
Ig человека

меченная



③



+ субстрат/хромоген

Непрямая реакция иммунофлюоресценции (**ИРИФ**) для серодиагностики

- Ставится на стекле
- Компоненты:
 - **АГ бактерий (диагностикум)**
 - **сыворотка пациента** (в ней ищут АТ)
 - **антиглобулиновая сыворотка (АГС),
меченная ФИТЦ**
 - **Инкубация, отмывка от несвязавшихся
компонентов**
- Учет с помощью люминесцентного микроскопа:
при “+” реакции наблюдается специфическое
(чаще – зелёное) свечение.