

Практическое занятие № 11

**АНТИГЕНЫ. АНТИТЕЛА.
ПРИМЕНЕНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ
РЕАКЦИЙ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКЕ: СЕРОИНДИКАЦИЯ,
СЕРОИДЕНТИФИКАЦИЯ,
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СЫВОРОТКИ.**

Антигены

АНТИГЕНЫ - это вещества, любого происхождения, в том числе и микробного, которые способны вызывать в организме ответную специфическую иммунную реакцию и принимать участие в её осуществлении.

Свойства антигенов:

1. **Иммуногенность** - способность АГ вызывать иммунный ответ (иммунологические реакции).
2. **Антигенность** — способность АГ специфически реагировать с АТ и рецепторами лимфоцитов.
3. **Специфичность** - каждый АГ имеет специфический участок - *эпитоп* (уникальные фрагменты), за счет которого они могут вступать в реакцию с АТ или Т-лимфоцитом.

Классификация АГ

-Полные- иммуногенные.

-Неполные (гаптены)- относительно простые вещества, способные участвовать в иммунологических взаимодействиях, но не способные активировать самостоятельно иммунный ответ. Лишь после присоединения к крупным (обычно белковым) молекулам, гаптен может приобрести свойства полного антигена.

-Комплексные- состоят из нескольких АГ.

Микробная клетка обладает множеством антигенов, свойственных отдельным ее структурам.

Бактериальные АГ

1. По специфичности:

- а) группоспецифические (встречаются у разных видов одного рода или семейства)
- б) видоспецифические (встречаются у 1 вида)
- в) типоспецифические (делят вид на серологические варианты - серовары)

2. По локализации в бактериальной клетке:

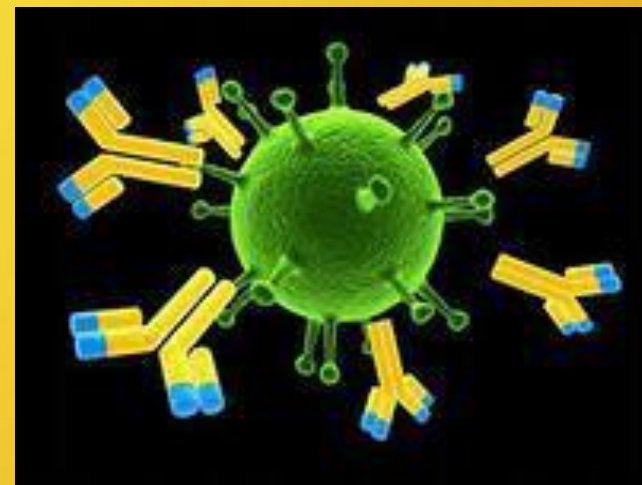
- а) Капсульные или К-АГ (полисахарид исключение полипептид) связаны с ЛПС клеточной стенки и капсулой.
- б) Соматический АГ или О-АГ- связан с бактериальной клеточной стенкой, у Гр- бактерий связан с ЛПС клеточной стенки, термостабилен, не разрушается после обработки формалином, этанолом.
- в) Жгутиковые Н-антигены – входят в состав бактериальных жгутиков. Это белок флагелин, разрушается при нагревании, но сохраняет свои антигенные свойства после обработки фенолом.
- г) Антигены бактериальных токсинов. Токсины бактерий обладают полноценными антигенными свойствами в том случае, если они являются растворимыми соединениями белковой природы.

Ферменты, продуцируемые бактериями, также обладают антигенными свойствами.

Антитела

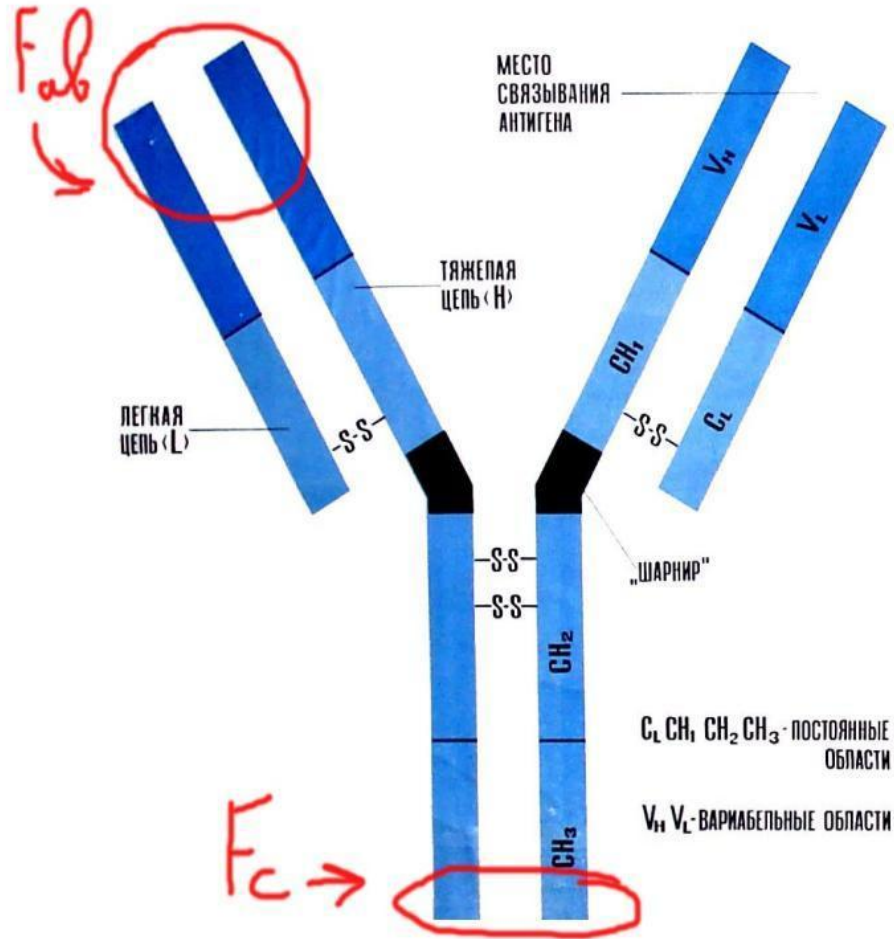
Антитела – это белки, образование которых индуцируется АГ и основным свойством которых является способность к специфическому взаимодействию с АГ.

Свойствами антител обладают белковые молекулы, называемые иммуноглобулинами.



Строение молекулы иммуноглобулина

МОЛЕКУЛА ИММУНОГЛОБУЛИНА



Fab фрагмент - это активный центр АТ, место где происходит связывание с АГ.

Fc фрагмент - осуществляет эффекторные функции: связывание с рецепторами, которые экспрессированы на клетках организма (например, фагоцитах)

Классы АТ

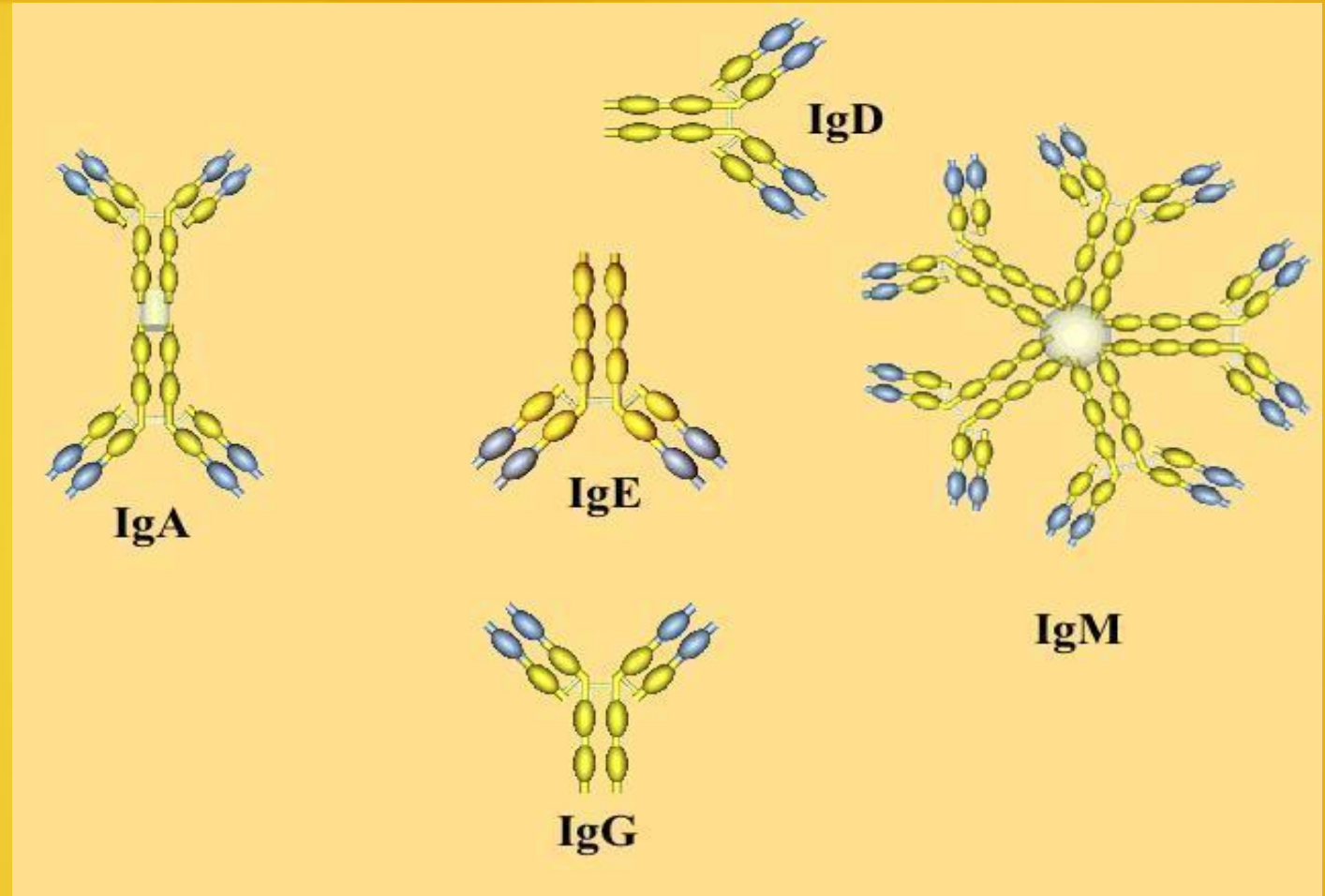
-Ig A

-IgG

-IgM

-IgE

-IgD



Основные реакции системы АГ-АТ

Агглютинация - это склеивание корпускулярных АГ.

Результат: образование хлопьев.

Различают прямую и непрямую (пассивную) агглютинации.

Реакция преципитации- в реакции участвуют растворимые АГ.

Результат взаимодействия $АГ+АТ=$ видимое глазом помутнение или *преципитат*.

Различают: кольца преципитации и преципитация в геле.

Серологические реакции

Серологические реакции - (от лат serum - сыворотка и logos — учение) - *это обнаружение неизвестного АГ или АТ по второму известному реагенту in vitro.*

Принцип состоит во взаимодействии специфических АГ и АТ.

Свойства серологических реакций:

1. Специфичность (определенный АГ взаимодействует с определенным АТ)
2. Чувствительность (для протекания реакции достаточно очень малого количества АТ/АГ (в пикограммах))

Основные направления использования серологических реакций

1. Сероиндикация- обнаружение неизвестных АГ (возбудителя) в исследуемом материале без выделения чистой культуры с помощью диагностических сывороток (препарат из заведомо известных АТ).

Реакции:

- РПГА (реакция пассивной гемагглютинации)
- ИФА (иммуноферментный)
- РП (реакция преципитации)
- РИФ (реакция иммунофлюорисценции)

2. Сероидентификация- определение АГ в чистой культуре возбудителя с помощью известных АТ (диагностической сыворотки). Проводиться на 3 этапе бак.метода.

Реакции:

- РА(реакция агглютинации) -реже РП (реакция преципитации)

3. Серодиагностика - это обнаружение неизвестных АТ в сыворотке крови больного с помощью диагностикумов(заранее известные АГ). Самостоятельный метод диагностики инфекционных заболеваний – серологический метод.

Реакции:

- | | |
|-------------------------------------|-------|
| -РПГА | -РА |
| -РСК(реакция связывания компонента) | -нРИФ |
| -ИФА | |

Схема ответа

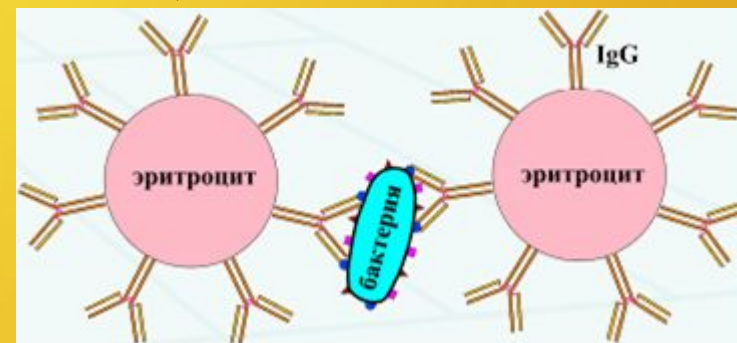
1. Где ставиться реакция
2. Компоненты реакции
3. Учет реакции
4. Трактовка результата

Реакции сероиндикации:

РПГА или РНГА

(реакция пассивной или непрямой гемагглютинации)

1. Ставиться на стекле
2. Исследуемый материал (в нем ищут АГ) + диагностическая сыворотка (*Суспензионные антитела* – получают путем иммунизации лабораторных животных корпускулярным антигеном, с последующей адсорбцией иммуноглобулинов Fc-фрагментом на эритроцитах I группы крови человека, предварительно обработанных танином или формалином для улучшения адсорбционных свойств последних.)
3. Учет реакции: «+» Хлопья красного цвета
«-» Отсутствие хлопьев



Реакция Кольцепреципитации

1. Ставят в стеклянной пробирке.

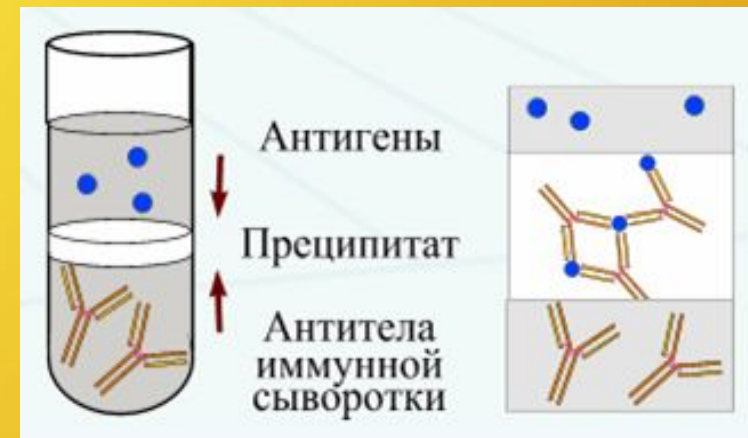
2. Исследуемый материал (ищем растворенный АГ)+
+диагностическая сыворотка (Преципитирующая - содержит
АТ к растворенным АГ (некорпускулярным)).

Наслаивают на исследуемый материал по стеке пробирки.

3. Результат:

«+» на границе растворов образуется помутнение в виде
кольца

«-» на границе растворов нет кольца



РИФ

1. На стекле

2. Исследуемый материал (ищем АГ) фиксируем на стекле + +диагностическую сыворотку (Люминесцирующая сыворотка получают путем иммунизации лабораторных животных корпускулярным антигеном, с последующим присоединением к иммуноглобулину (Fc фрагменту) люминесцентной (флюоресцентной) метки, например ФИТЦ). Инкубируем. Промываем (удаление не связавшихся компонентов реакции).

Результат: люминесцентная микроскопия

«+»- свечение,

«-» нет свечения.

Антиген в ткани



флуоресцентная метка



антитело



флуоресцентная метка



Антиген в ткани

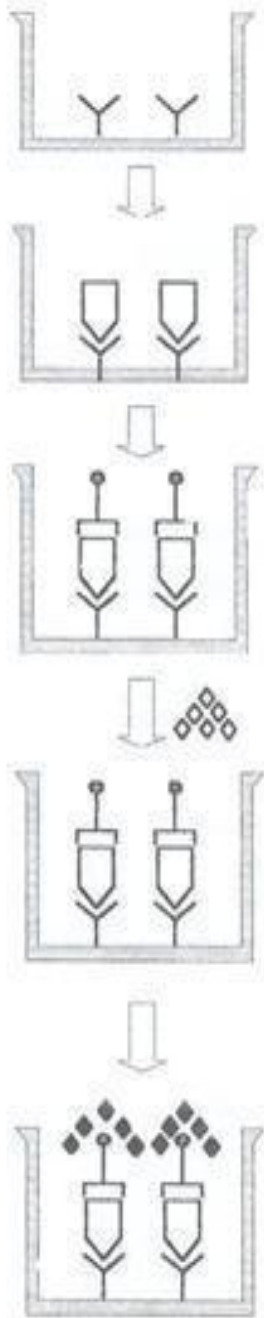


ИФА (сэндвич метод)

1. Лунки-планшеты
2. Компоненты: известные АТ (диагностическая сыворотка) - первые АТ + Исследуемый материал. Инкубация. Отмывка.
Внесение вторых АТ к этому АГ, которые несут ферментную метку (пероксидаза).
Инкубация. Отмывка.
+ S к ферментной метке (H_2O_2) взаимодействие = E-S комплекс
+ хромоген (индикатор).
Инкубация.

Результат:

1. С помощью спектрофотометра (ридера) по оптической плотности.
2. Глазом цвет(голубой)(+) или бесцветный (-)



Связывание антител с твердой фазой,
отмывка

Инкубация с исследуемым образцом,
содержащим антигены, отмывка

Инкубация с мечеными ферментом
моноклональными антителами,
отмывка

Внесение субстрата

Образование окрашенного продукта
реакции, учет результатов на
ИФА-ридере.



Сероидентификация

РА

1. На стекле

2. Компоненты реакции: **ЧИСТАЯ КУЛЬТУРА**
бактерий + Диагностическая сыворотка
(Агглютинирующая сыворотка)

Результат:

«+» Хлопья белого цвета,

«-» отсутствие хлопьев.

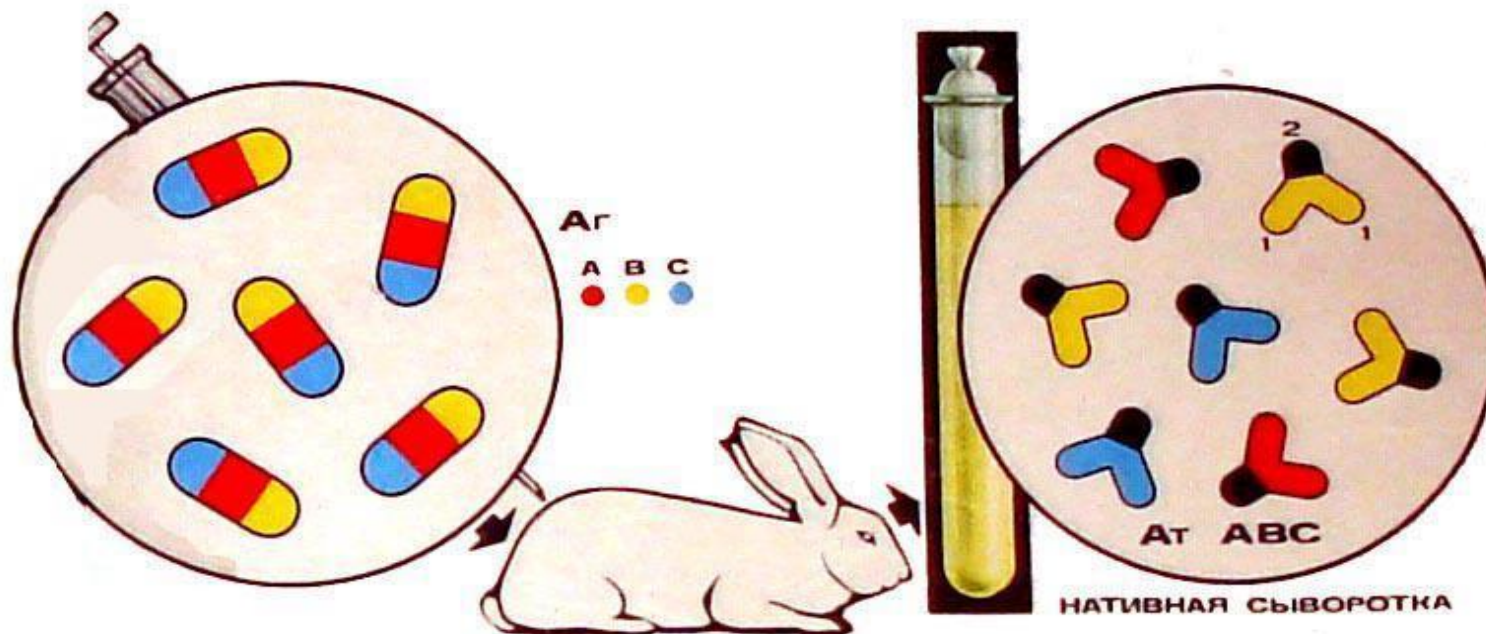


Агглютинирующие сыворотки – получают путем иммунизации лабораторных животных корпускулярным антигеном.

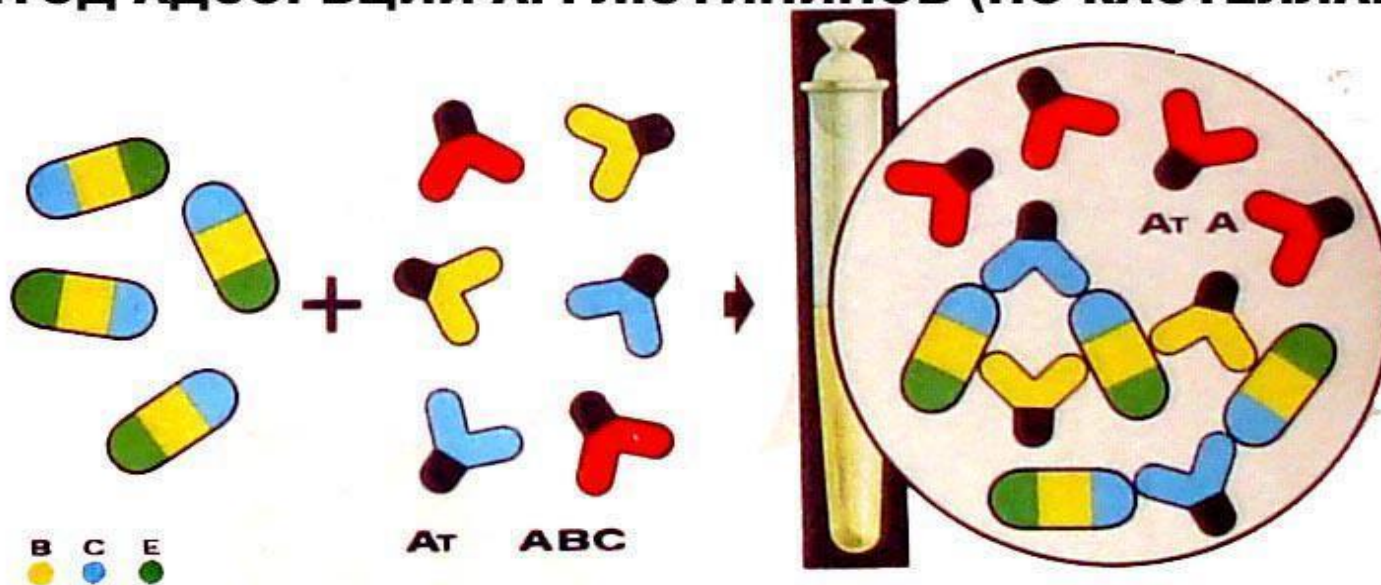
Различают *неадсорбированные* (содержат полный набор антител) и *адсорбированные* (удалены ненужные антитела).

Ненужные антитела удаляют адсорбцией по Кастелани: иммунизируют лабораторных животных корпускулярным антигеном, с последующим добавлением в полученную сыворотку микроорганизмов, имеющих в структуре антигены, сходные по структуре с теми, на которые наработались ненужные антитела. Т.о. ненужные антитела взаимодействуют с антигенами микроорганизмов и выпадают в осадок.

ПОЛУЧЕНИЕ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК



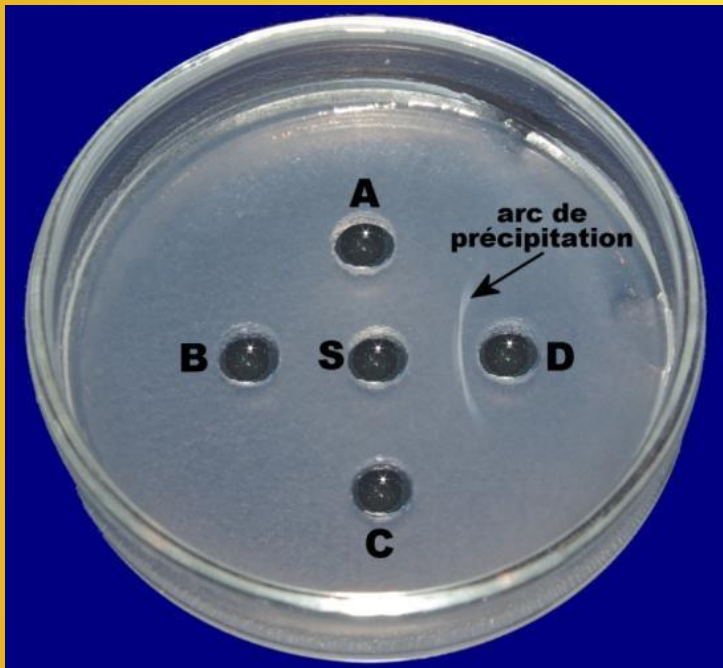
МЕТОД АДСОРБЦИИ АГГЛЮТИНИНОВ (ПО КАСТЕЛЛАНИ)



РП Для сероидентификации

Данная реакция используется для определения токсигенности выделенной чистой культуры (экзотоксины)

1. Чашка Петри
2. Питательный агар (гель) + антитоксическая диагностическая сыворотка.
3. Результат: «+» образование полос (усов) преципитации, «-» отсутствие полос преципитации.
4. Трактовка «+» - токсигенная культура, «-» не токсигенная культура.

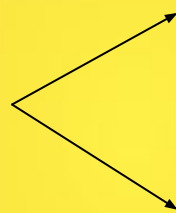


Классификация диагностических сывороток

-Суспензионные

-Люминесцентные

-Агглютинирующие



Неадсорбированные

Адсорбированные

-Преципитирующие

-Антитоксические

-Лизирующие