Реакция Аг+Ат. Серологический метод диагностики

профессор Бажукова Т.А.
зав.каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии

Иммунные реакции

- **Иммунные реакции – это взаимодействие между Аг и Ат, реакции специфичны и обладают высокой чувствительностью.**

Использование ИР:

- **Определение Ат в сыворотке больного (серодиагностика).**
- **Определение Аг (серотипирование – идентификация возбудителя; обнаружение Аг в биологических жидкостях).**

Типы антигенов

- Корпускулярные или клеточные
- Растворимые или гаптены
- Молекулярные (вирусы, экстракты)

Механизм реакции Аг + Ат

I фаза специфическая – образование комплекса Аг+ Ат

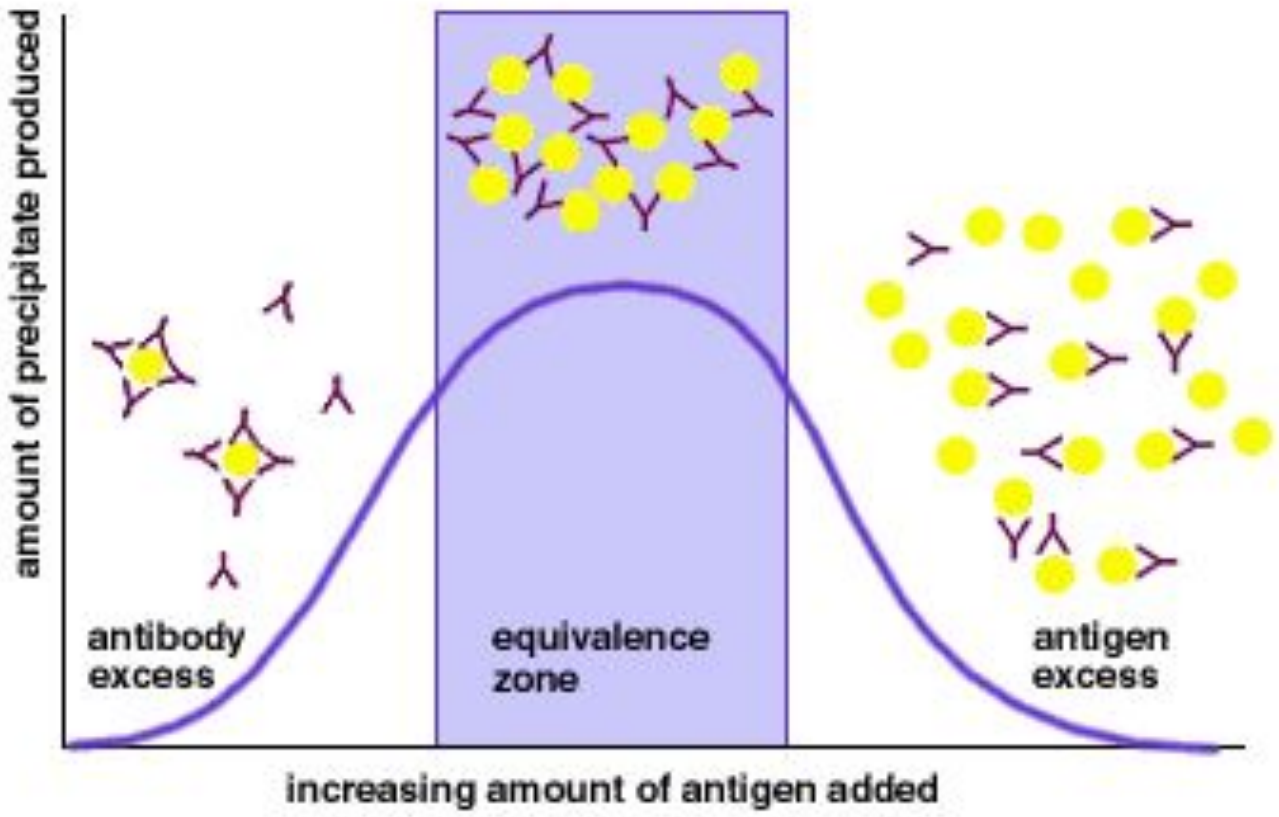
- **Условия: специфичность эпитопа (валентность) и паратопа (авидность и аффинность).**
- **Аффинность – сила специфического взаимодействия Ат с Аг (энергия их связи). Определяется степенью стерического (пространственного) соответствия эпитопа и паратопа. Чем > связей, тем устойчивее и продолжительнее жизнь Аг+Ат. Наиболее аффинными являются нормальные Ат.**
- **Авидность – прочность связывания Аг и Ат. Определяется количеством паратопов у Ат (IgM).**

Механизм реакции Аг + Ат

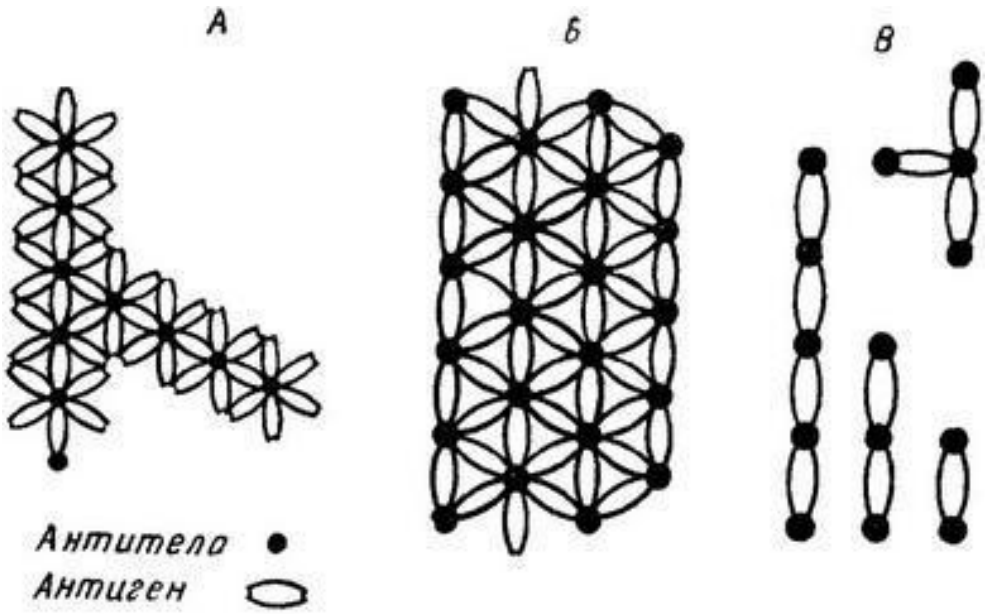
II фаза неспецифическая – видимые физические явления (выпадение в осадок, помутнение и т.д.)

- Условия:
- солевой состав (электролиты),
- pH среды,
- осмотическая плотность,
- температура среды.

Реакция Аг+Ат



Реакция Аг+Ат



- Схема комплекса антиген — антитело.
- А — зона избытка антигена;
- Б — точка эквивалентности;
- В — зона избытка антител

АГ+АТ

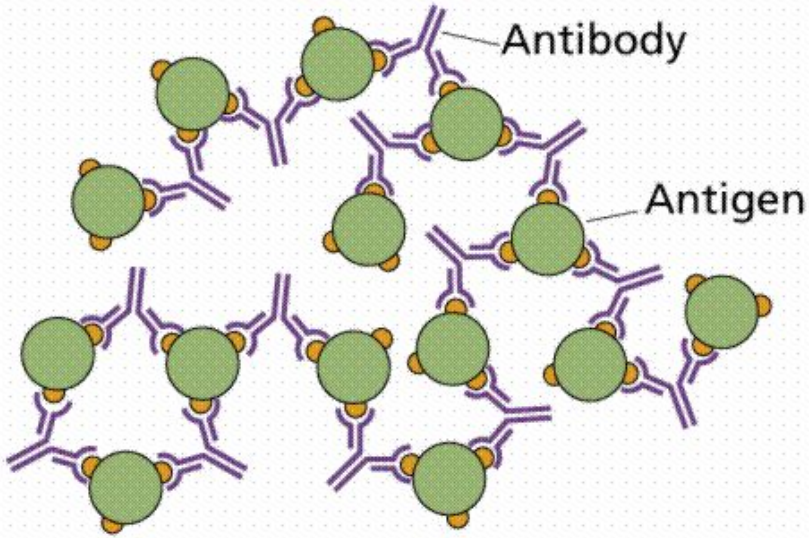
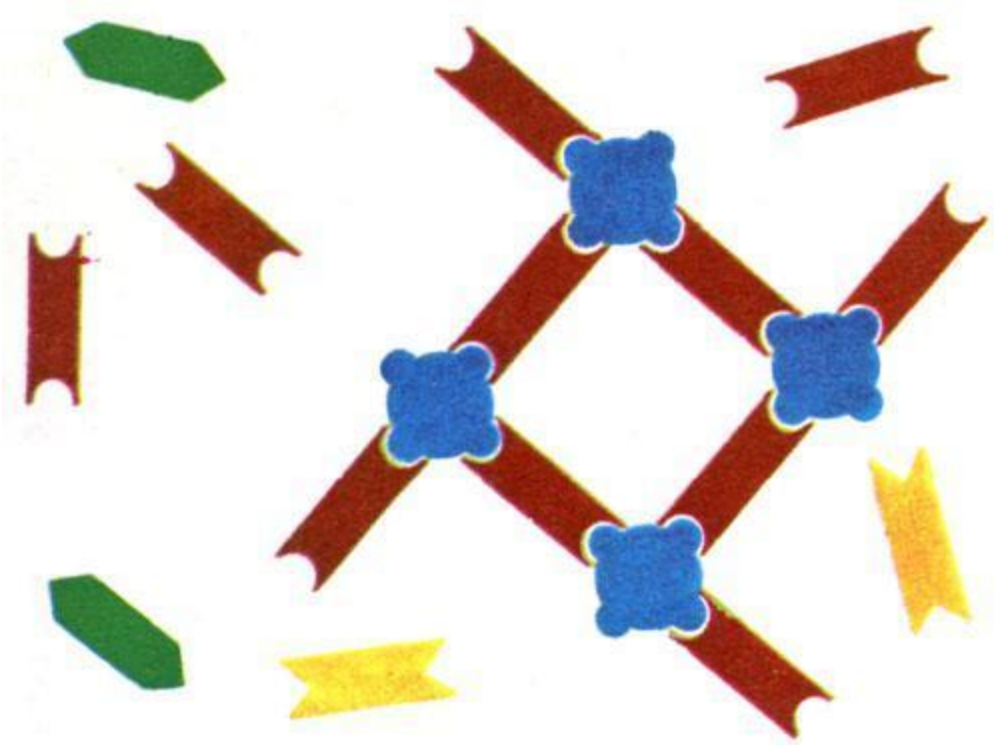
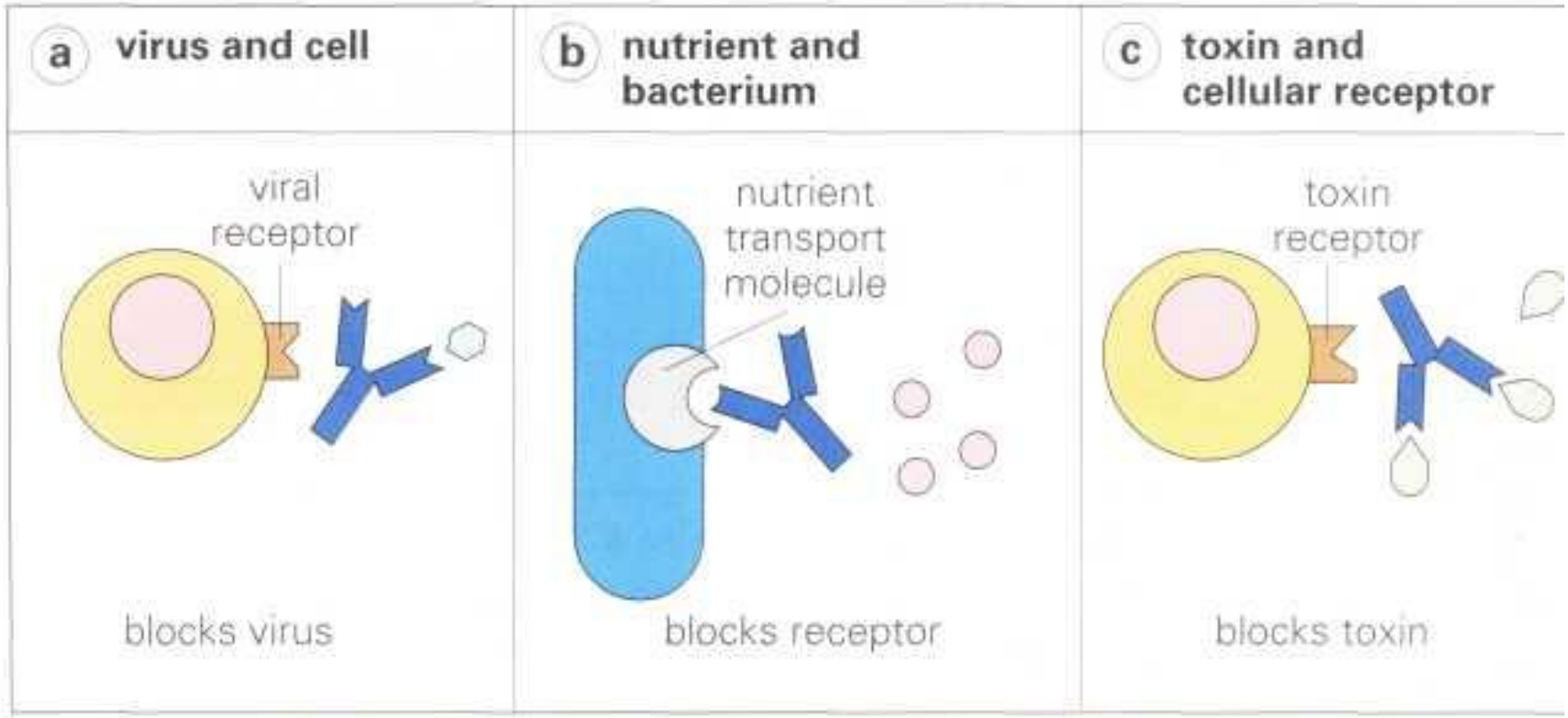


Figure 16.11

Реакция Аг+Ат



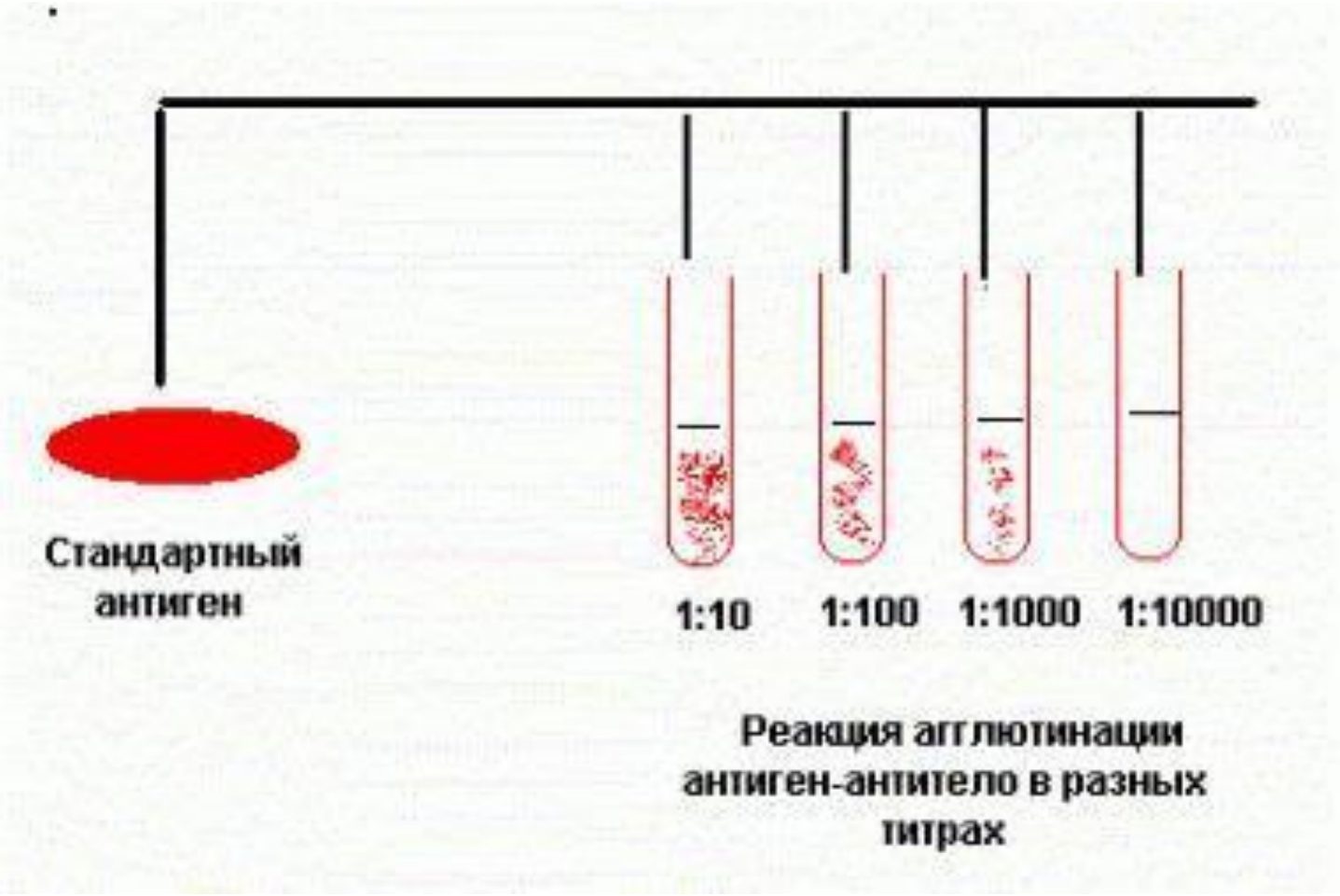
Реакция Аг+Ат



Виды ИР

1. Реакции агглютинации
2. Реакции преципитации
3. Реакции с участием комплемента (РСК)
4. Реакции с использованием меченых компонентов (РИФ, ИФА, РИА)

Реакция агглютинации



Механизм реакции агглютинации

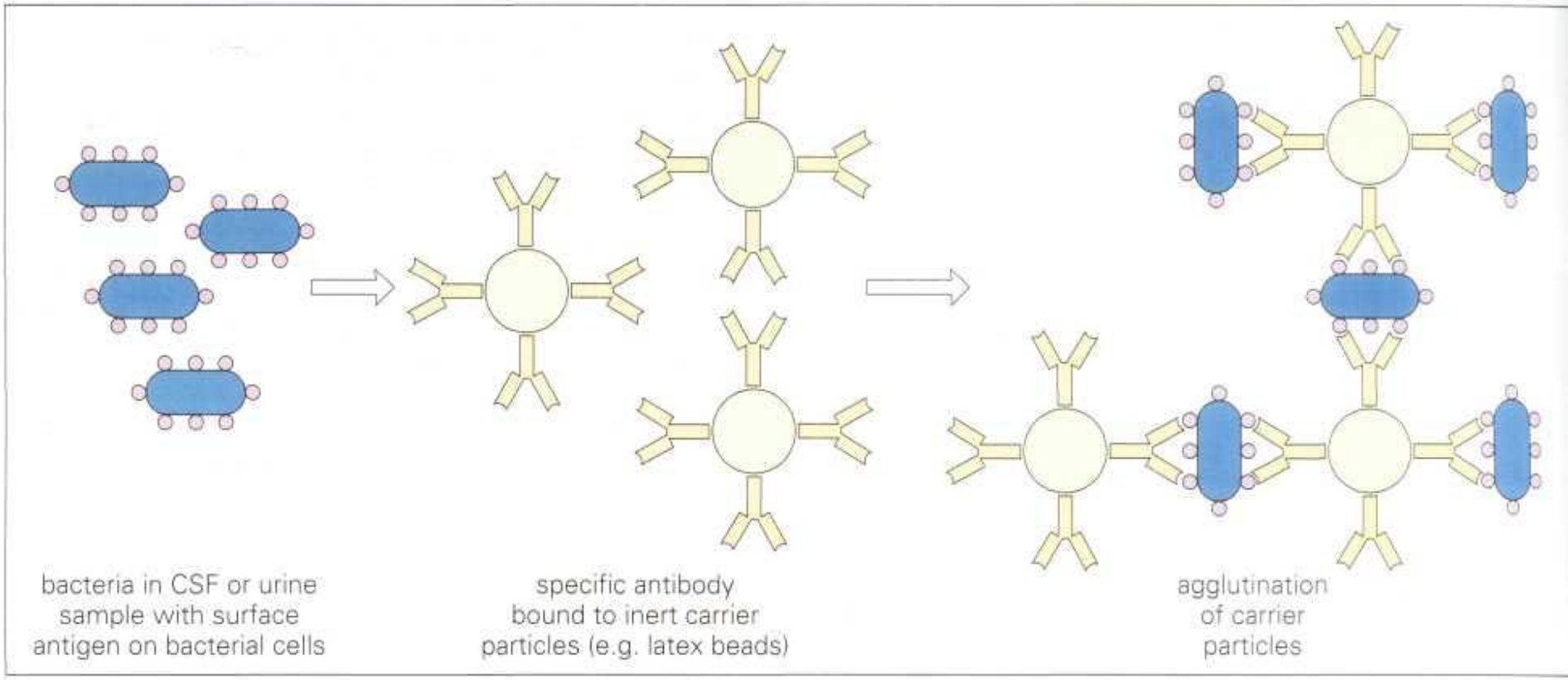


Fig. 14.10 When a specimen of cerebrospinal fluid (CSF) containing bacteria (e.g. *Haemophilus influenzae*) is mixed with a suspension of latex particles coated with specific antibody (e.g. *H. influenzae* anticapsular antibodies), the interaction between antigen and antibody causes an immediate agglutination of particles, which is visible to the naked eye.

Виды РА

- Линейная или объемная
- РА на стекле
- РПГА
- РТГА
- Реакция Кумбса

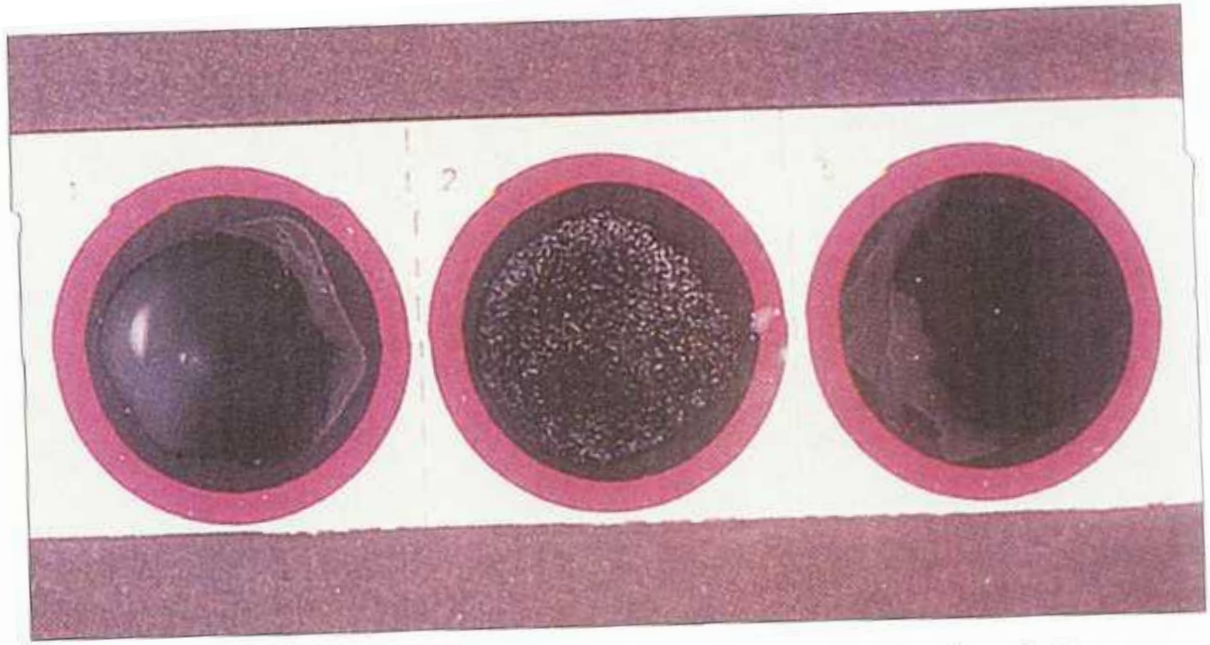
Использование:

- Определение титра антител
- Определение возбудителя (антигена) иммунологическая идентификация
- Определение групп крови

Схема реакции агглютинации на стекле

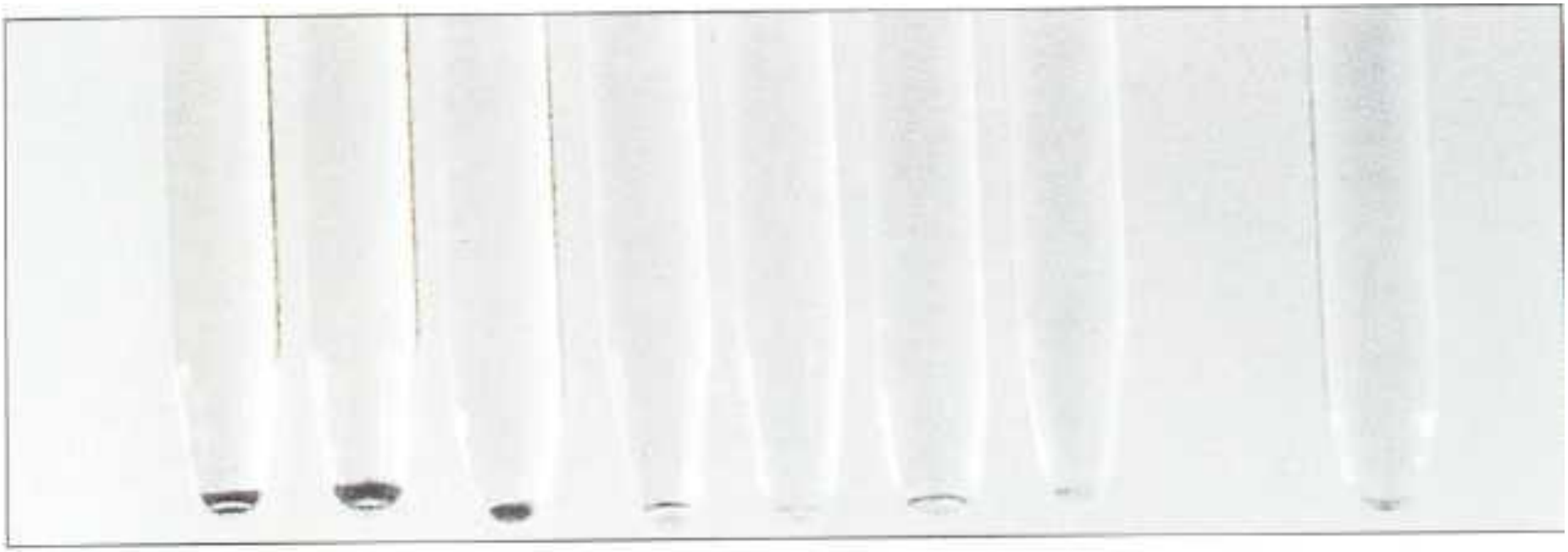
1 - контроль; 2 – агглютинат (хлопья) положительная реакция.

РА на стекле



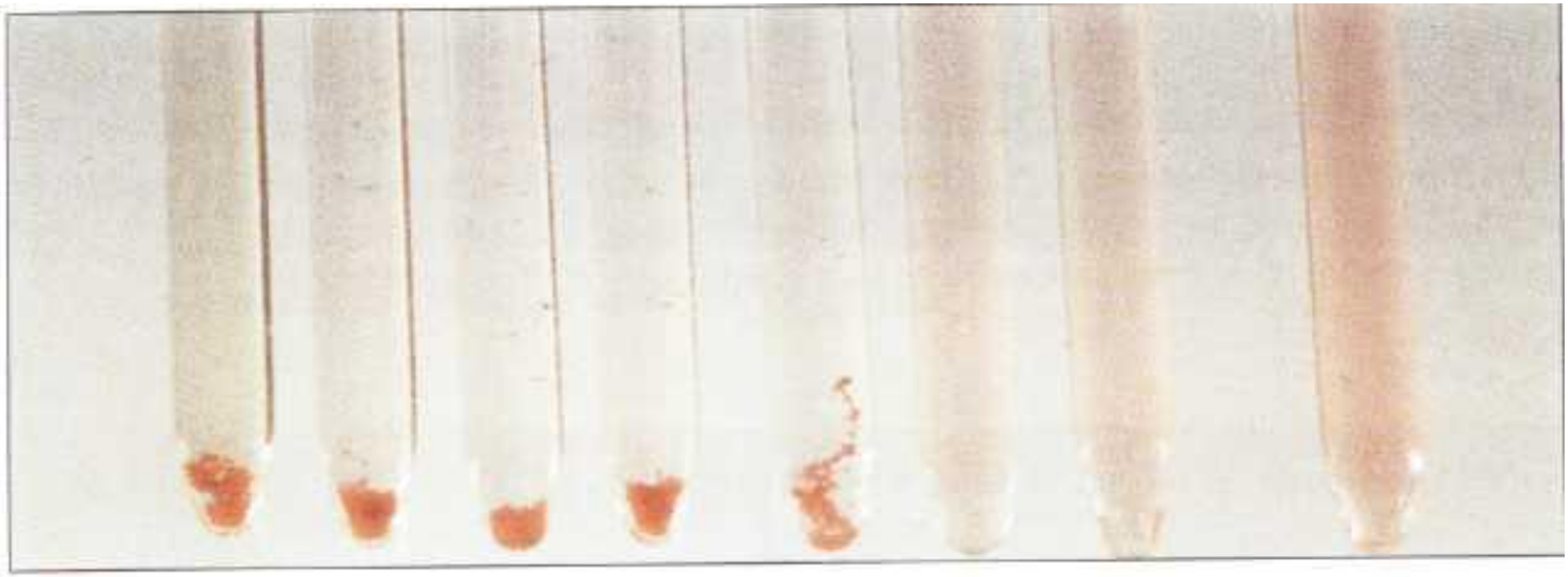
123 Lancefield grouping. Beta hemolytic streptococci are classified into Lancefield groups according to their surface carbohydrate antigens. A slide agglutination test can be used with antisera to the different Lancefield groups. Positive agglutination with the appropriate antisera will determine the group. Positive agglutination in centre circle. *(Agglutination after 2 min at room temperature)*

Линейная агглютинация



192 Widal test for serological diagnosis of typhoid fever. The Widal test measures the patient's antibodies against *Salmonella typhi* O and H antigen preparations. Serial dilutions of the patient's serum are added to the antigens in tubes, the highest dilution giving granular agglutination with the O antigen and floccular agglutination with the H antigen being reported. Dilutions 1:20–1:1280 and a negative control. O titre 1:80. *(Incubated for 2 h at 37°C)*

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации – РНГА, РПГА



193 **Widal test, H agglutination.** H titre 1:320. *(Incubated for 3 h at 37°C)*

РПГА

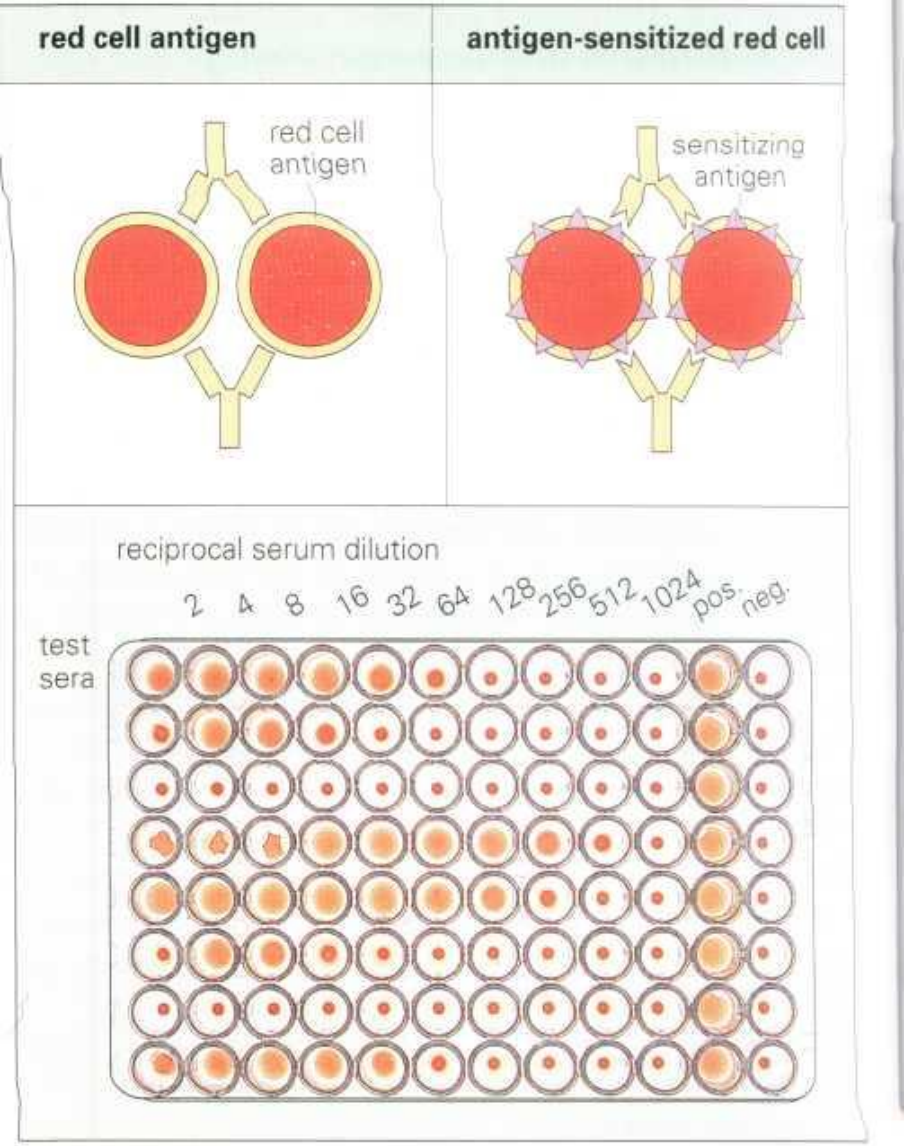
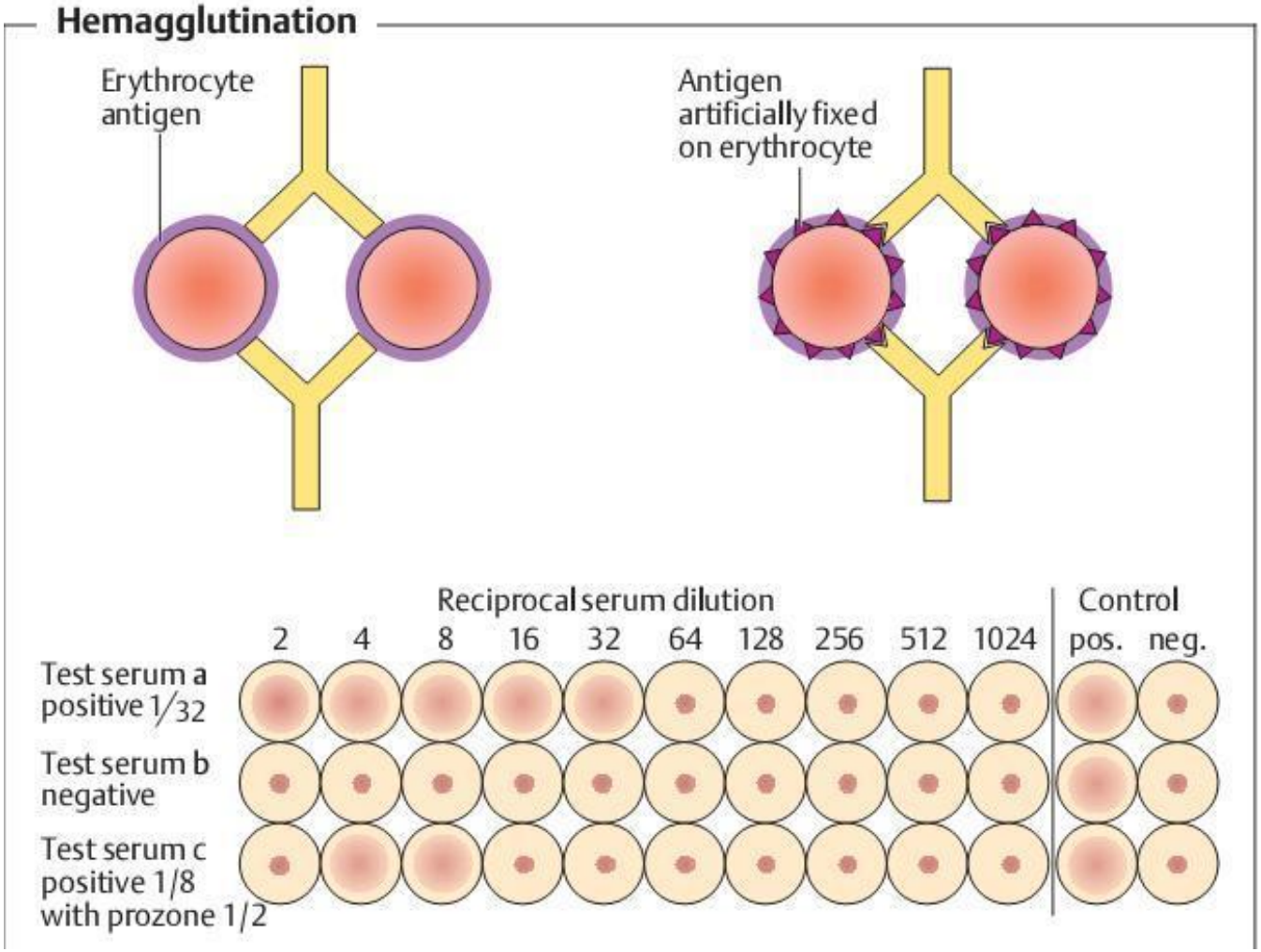
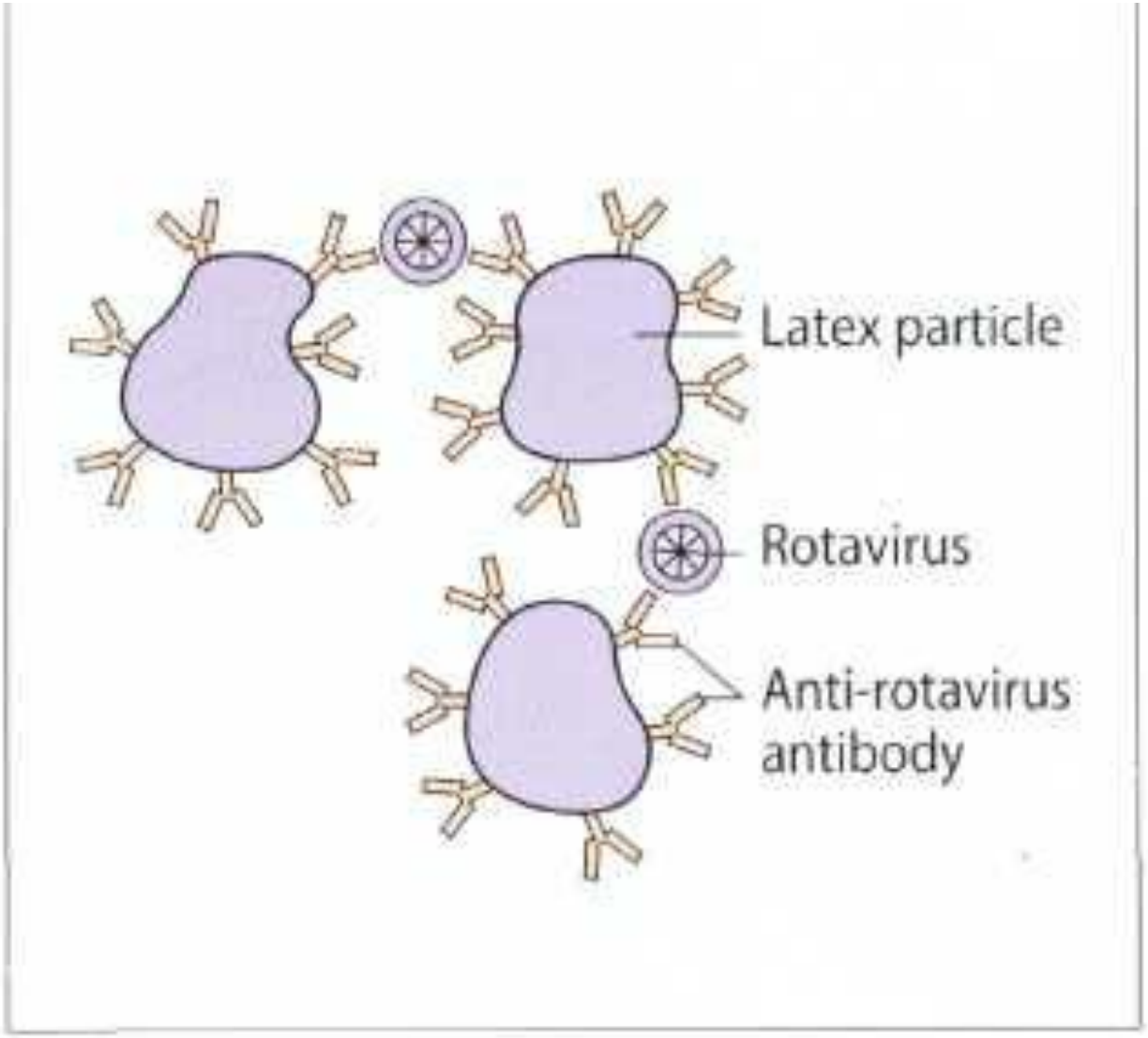


Fig. 14.25 The hemagglutination test for antibodies using red cells sensitized by antigen. Doubling dilutions of sera are made (horizontal row), with positive and negative controls in vertical rows 11 and 12 respectively. A tight button of cells indicates a negative reaction. Agglutinated cells form a carpet over the bottom of the well. A rapid microagglutination method is used for the detection of antibodies to *Legionella* in the patient's serum.

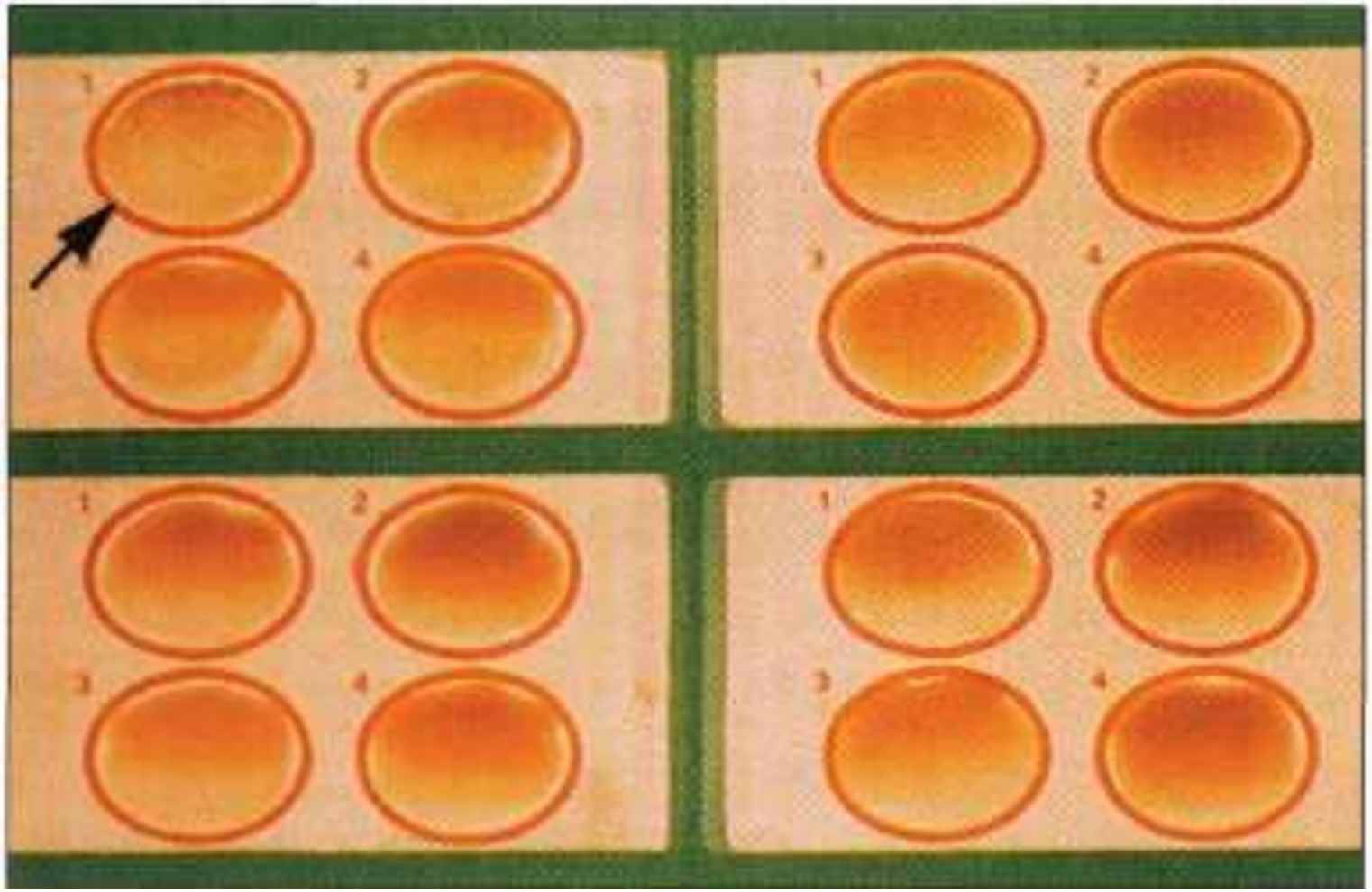
РПГА


Hemagglutination
Erythrocyte antigen
Antigen artificially fixed on erythrocyte
Reciprocal serum dilution
2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024
Control
pos. neg.
Test serum a positive 1/32
Test serum b negative
Test serum c positive 1/8 with prozone 1/2

Латекс-агглютинация



Латекс-агглютинация



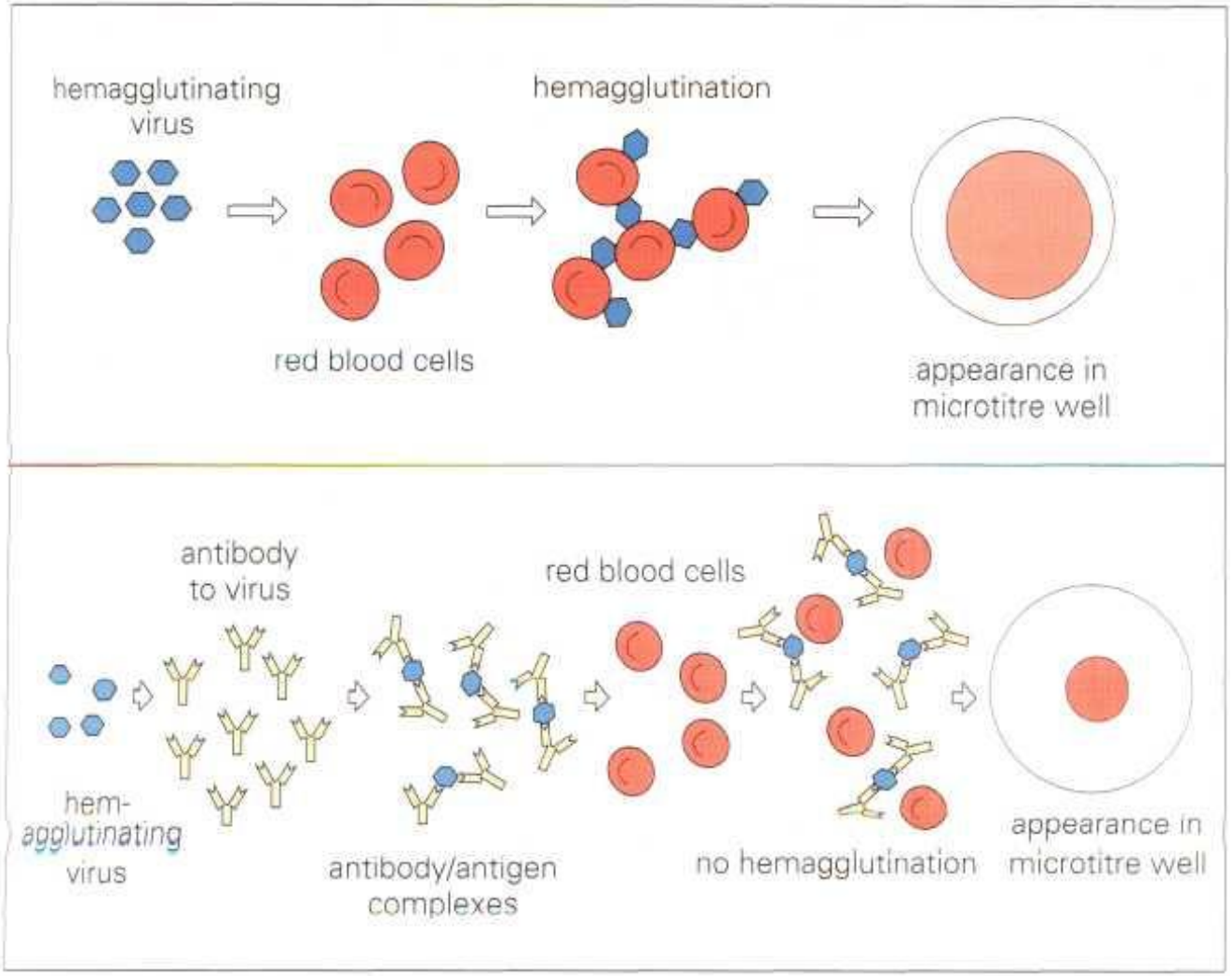
Реакция обратной непрямой гемагглютинации - РОНГА

- Антительные эритроцитарные диагностикумы (определение антигена)
- Для определения:
- токсинов (ботулинический и др.)
- гормонов (гонадотропный при беременности и др)
- повышенной чувствительности к лекарственным препаратам

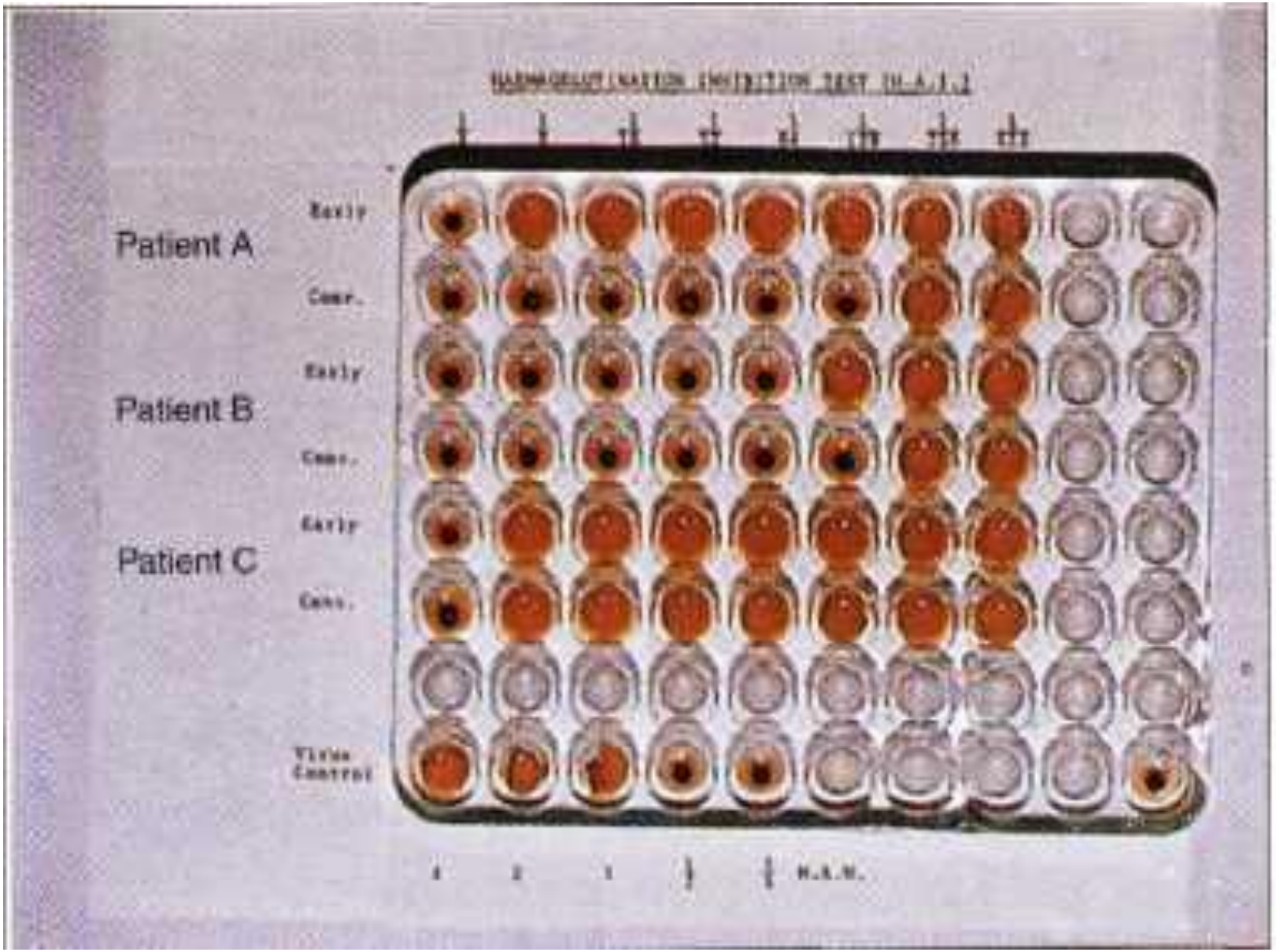
Реакция коагглютинации

- Определение возбудителя с помощью стафилококков, обработанных иммунной диагностической сывороткой (сродство белка А стафилококка и Fc – фрагментов иммуноглобулинов, которые взаимодействуют с возбудителем (антигеном).
- Образование хлопьев.

Реакция торможения гемагглютинации - РТГА



РТГА



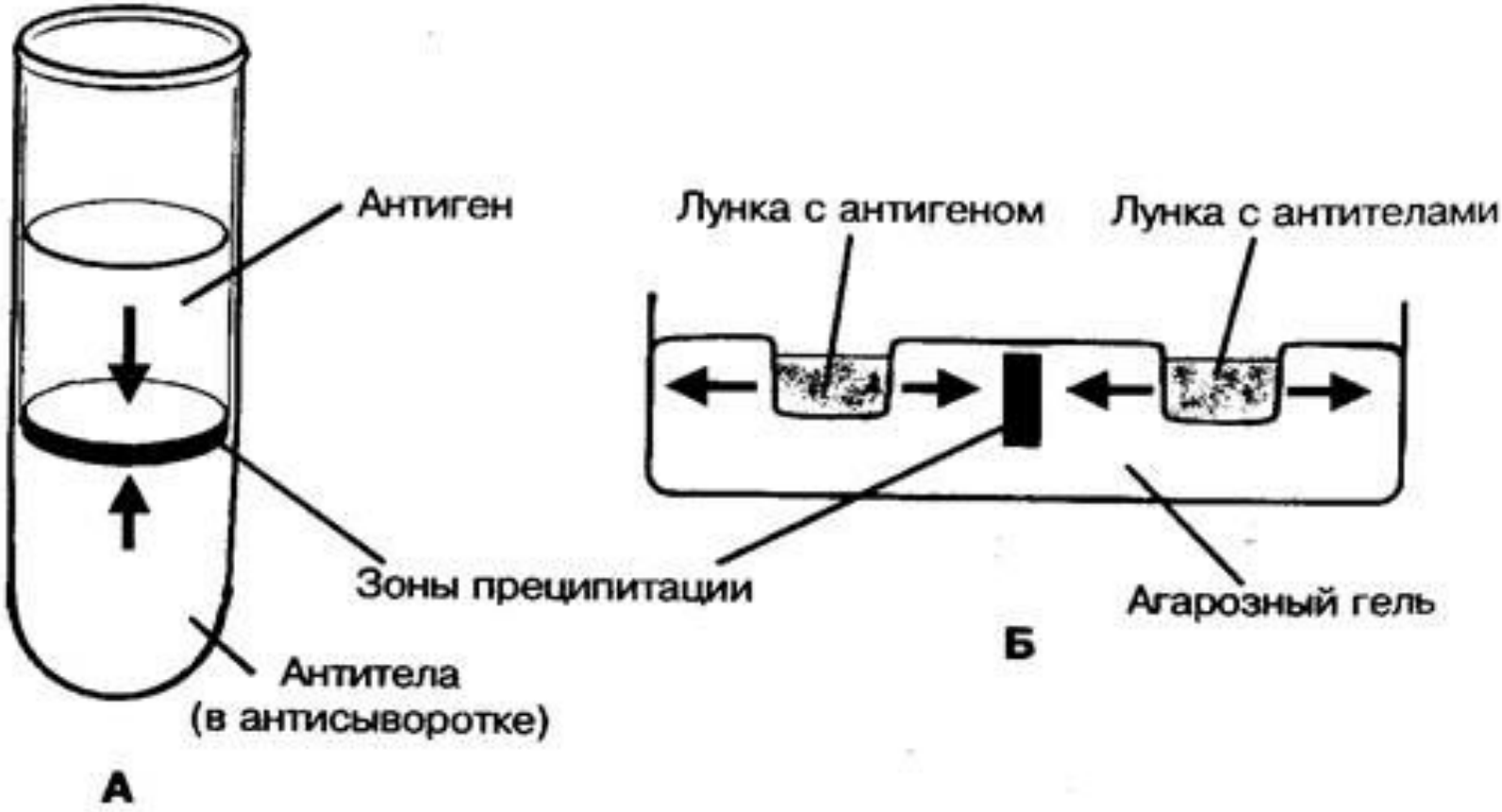
РА

- РА для определения групп крови
- РА для определения резус-фактора
- РА для определения антирезусных антител (непрямая реакция Кумбса)- для определения неполных Ат.

Виды РП

- Р кольцепреципитации
- Р двойной иммунодиффузии по Оухтерлони (преципитации в агаре)
- Осадочные РП
- Р радиальной иммунодиффузии (реакция Манчини)
- Р иммуноэлектрофореза
- Р флоккуляции (по Рамону)

Реакция преципитации



Реакция двойной иммунодиффузии в геле

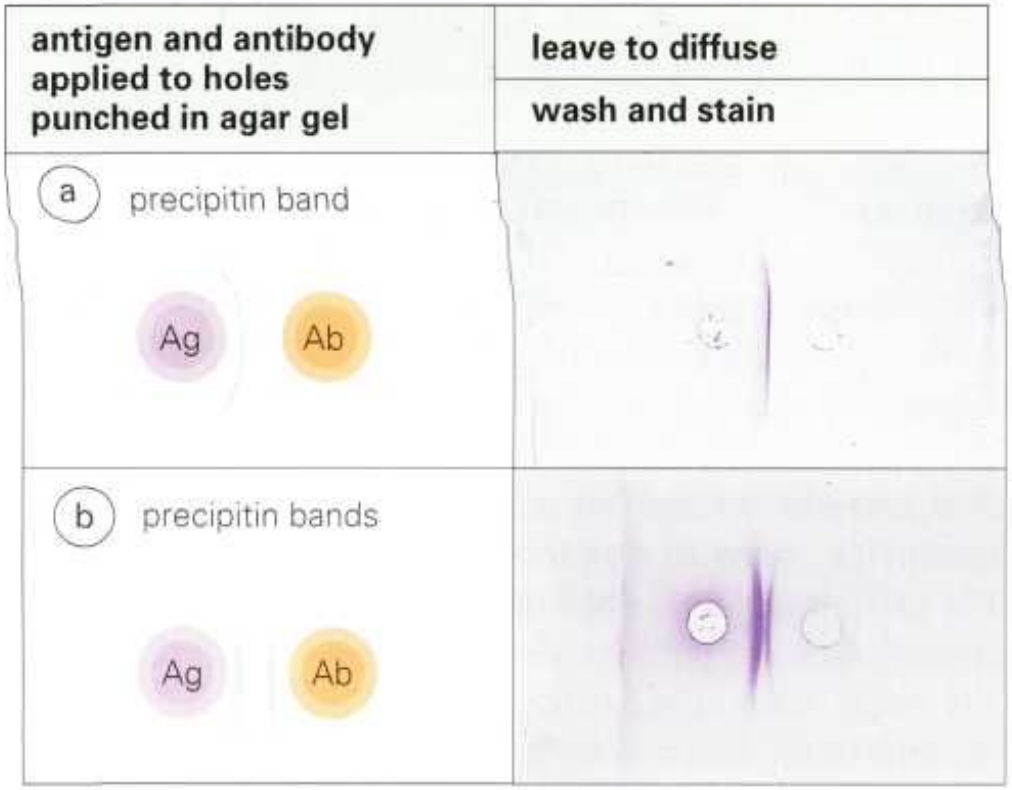
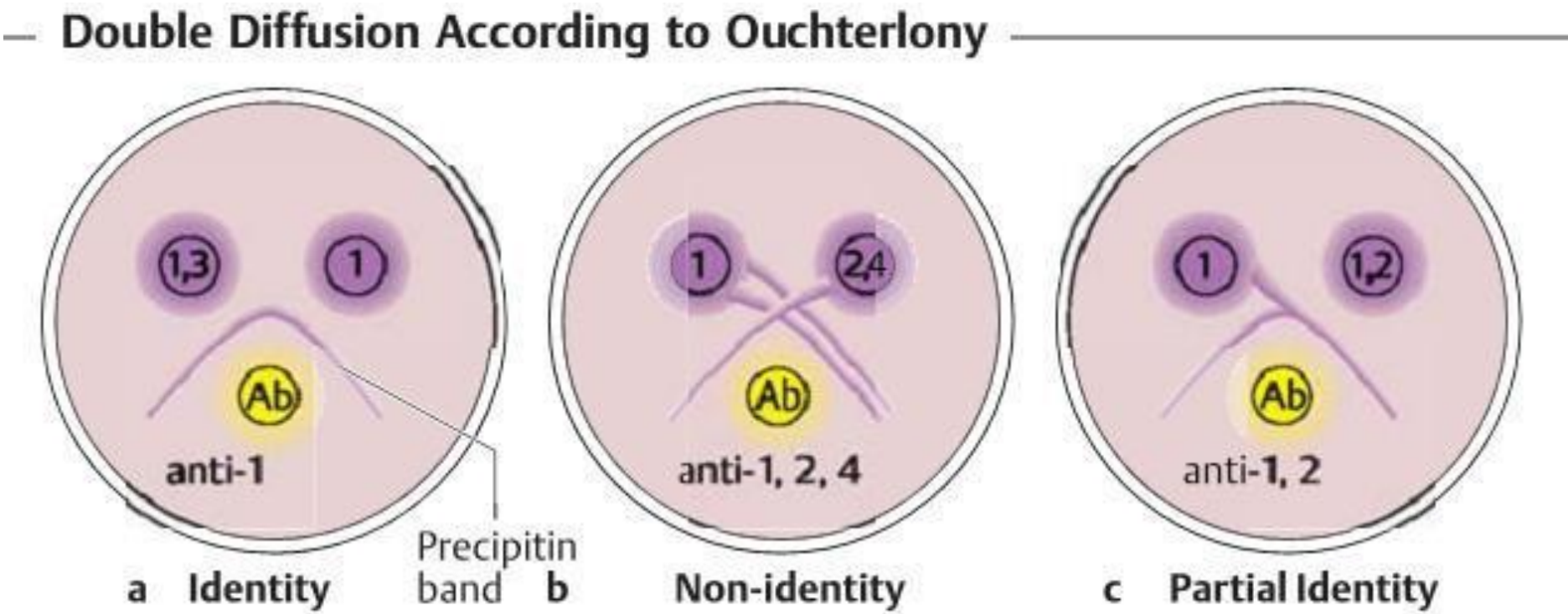
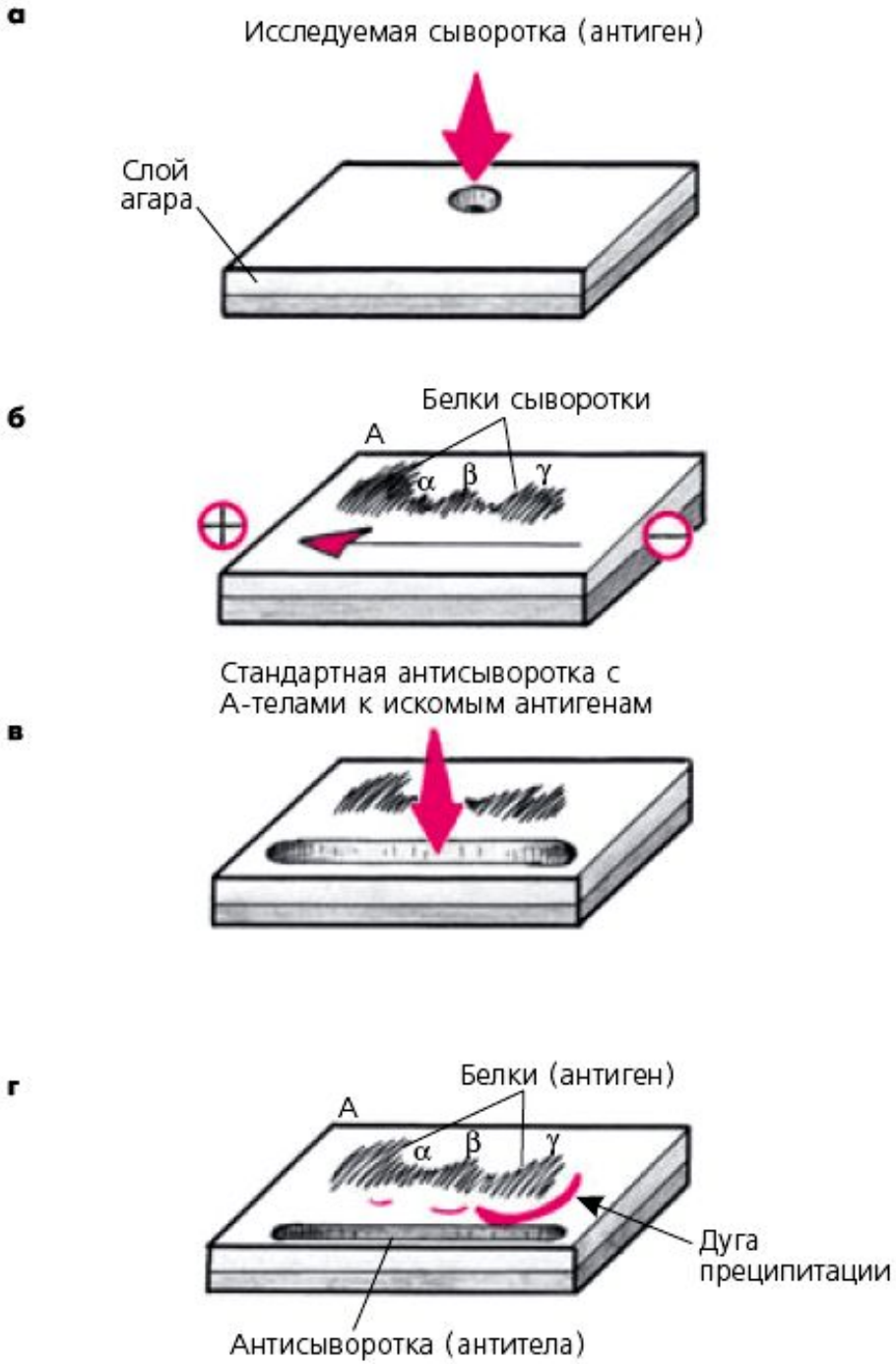


Fig. 14.24 Double diffusion and immunoprecipitation in agar gels. The opaque lines can be better visualized by staining. (a) Precipitin band formed with a single antigen. The two independent antigens in (b) give separate precipitation bands with their corresponding antibody sets (Abs), coexisting within the complex.

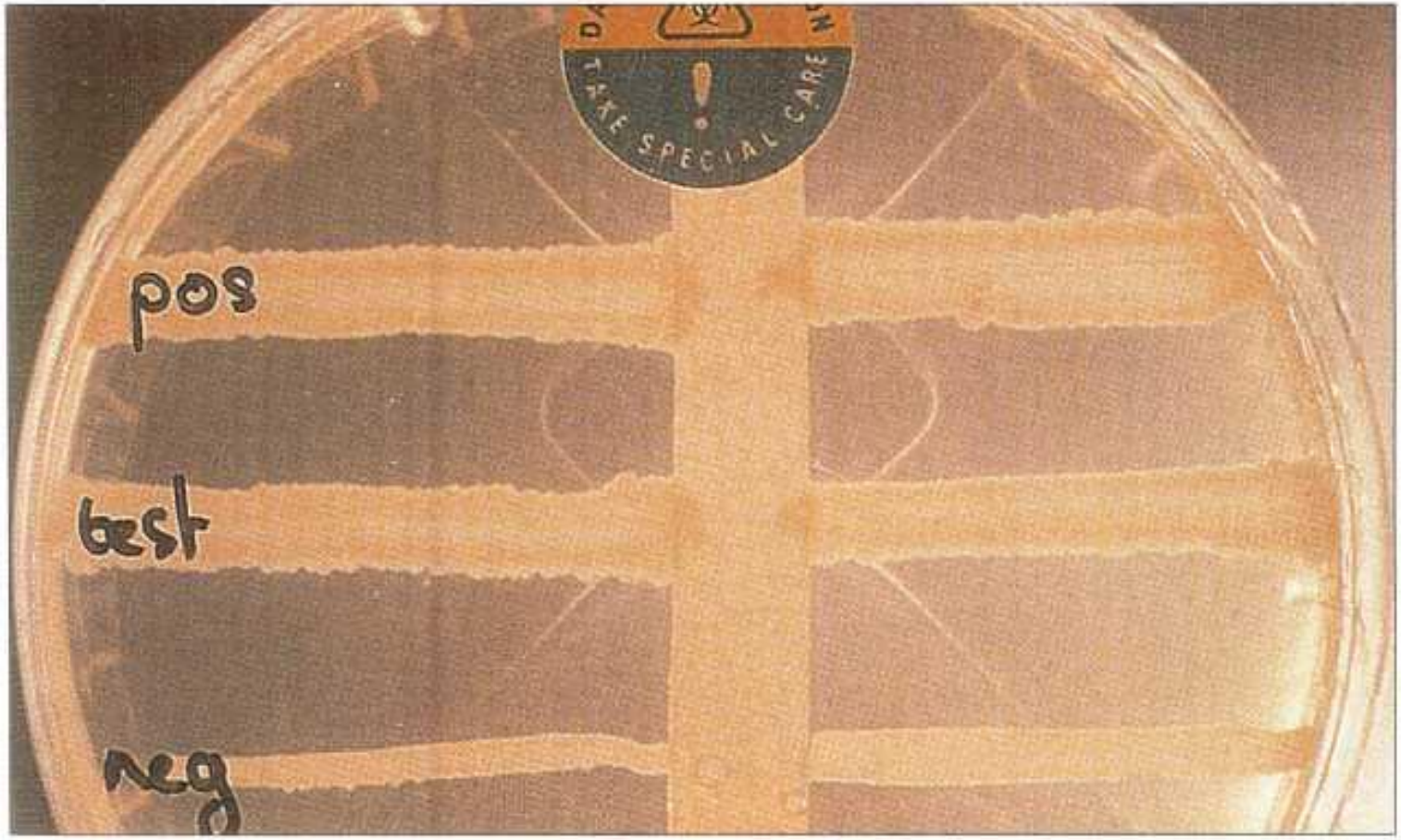
РП по Оухтерлони



РП в агаре


а
Исследуемая сыворотка (антиген)
Слой агара
б
Белки сыворотки
А
α
β
γ
в
Стандартная антисыворотка с А-телами к искомым антигенам
г
Белки (антиген)
А
α
β
γ
Дуга преципитации
Антисыворотка (антитела)

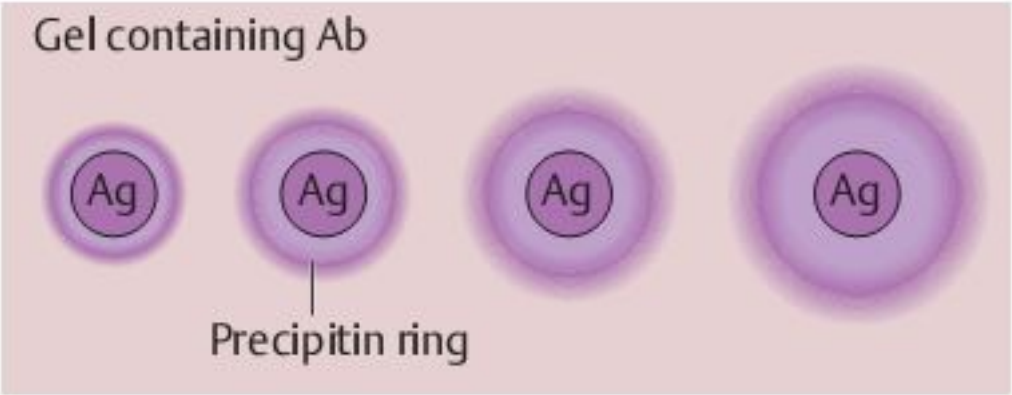
РП в агаре

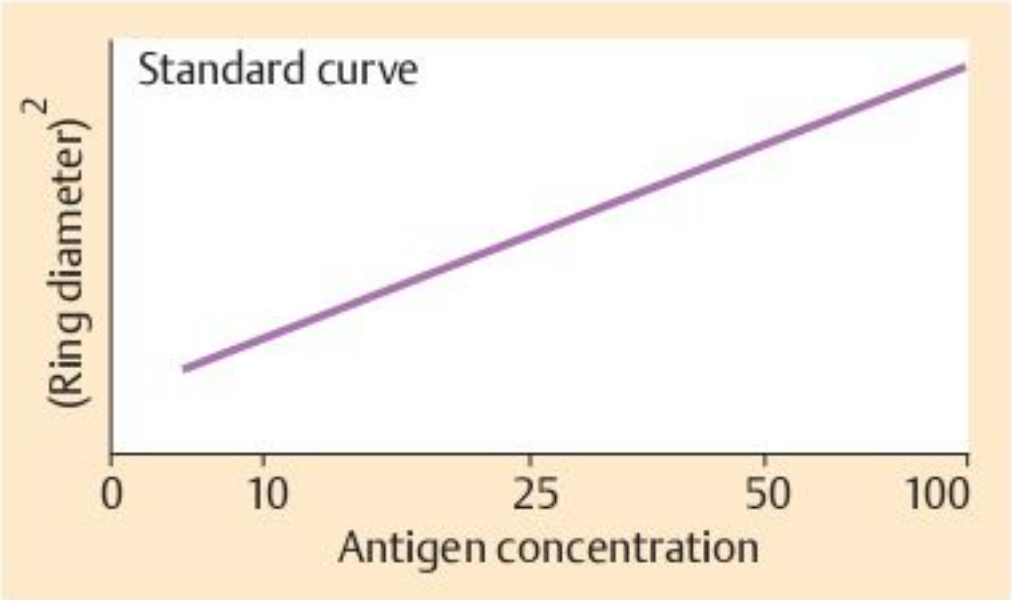


146 Elek plate to demonstrate the toxigenicity of *Corynebacterium diphtheriae*. The filter paper strip contains diphtheria antitoxin; it is placed in the Petri dish and the medium is poured on. The test strain and toxigenic and non-toxigenic strains are inoculated at right angles to the strip. A toxigenic strain produces a V-shaped line of precipitation between the toxin and anti-toxin. *(Elek's medium, 48 h at 37°C)*

Реакция радиальной иммунодиффузии (Манчини)

- **Radial Immunodiffusion According to Mancini**





Иммуноэлектрофорез

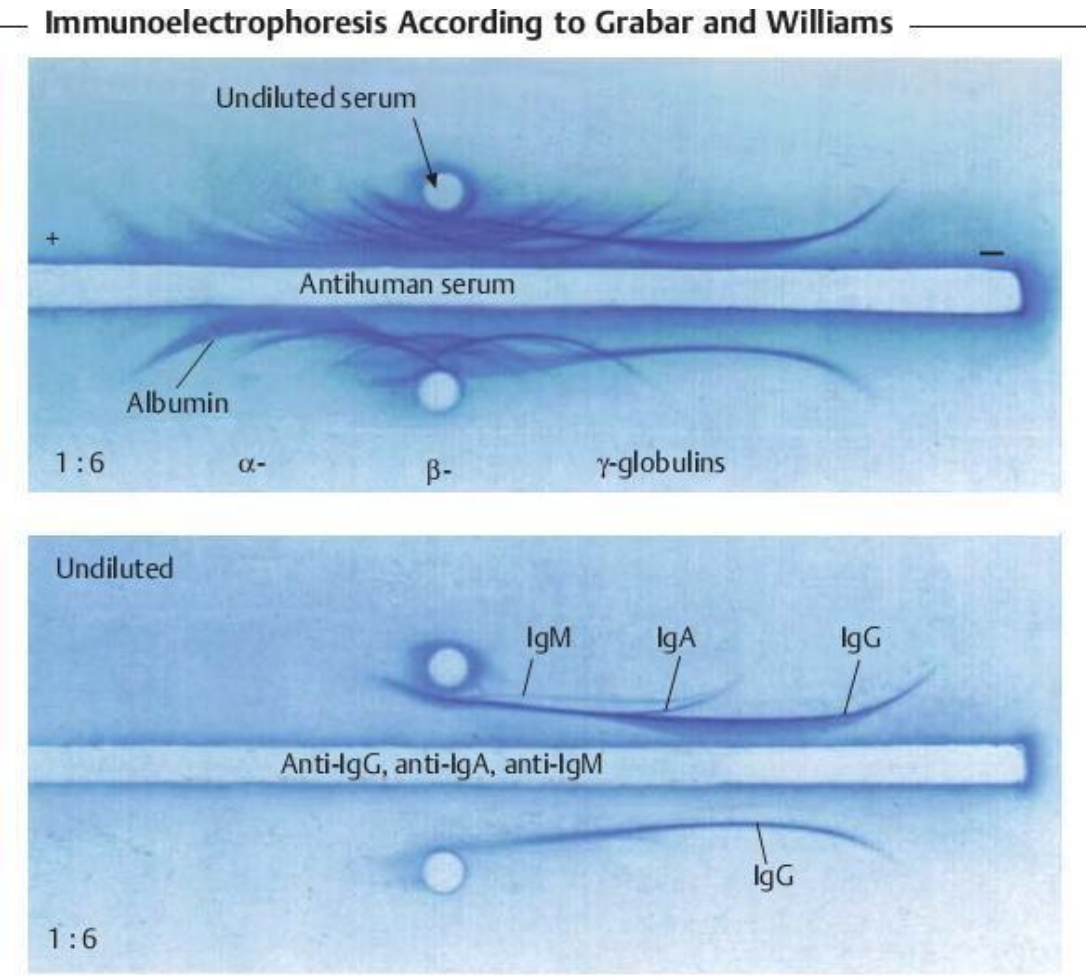


Fig. 2.**23** Serum is separated within agarose by an electric field, and rendered visible with anti-serum directed against human serum (above), or with selected specific antibodies (below).

Сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации. Смесь антигенов вносят в лунки геля и разделяют с помощью электрофореза. Затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят сыворотку и в месте «встречи» с антигеном образуются линии преципитата.

РП

- Реакция флоккуляции (по Рамону)

  Для определения активности антитоксической сыворотки и анатоксина.
- Иммунная электронная микроскопия – электронная микроскопия вирусов обработанных антителами (иммунными сыворотками) – микропреципитаты («венчик» из антител контрастированных фосфорно-вольфрамовой кислотой или другими электронно-оптическими прпаратами)

Реакции с участием комплемента

- Реакция лизиса
- Реакция связывания комплемента
- Реакция радиального гемолиза
- Реакция иммунного прилипания

Реакция лизиса

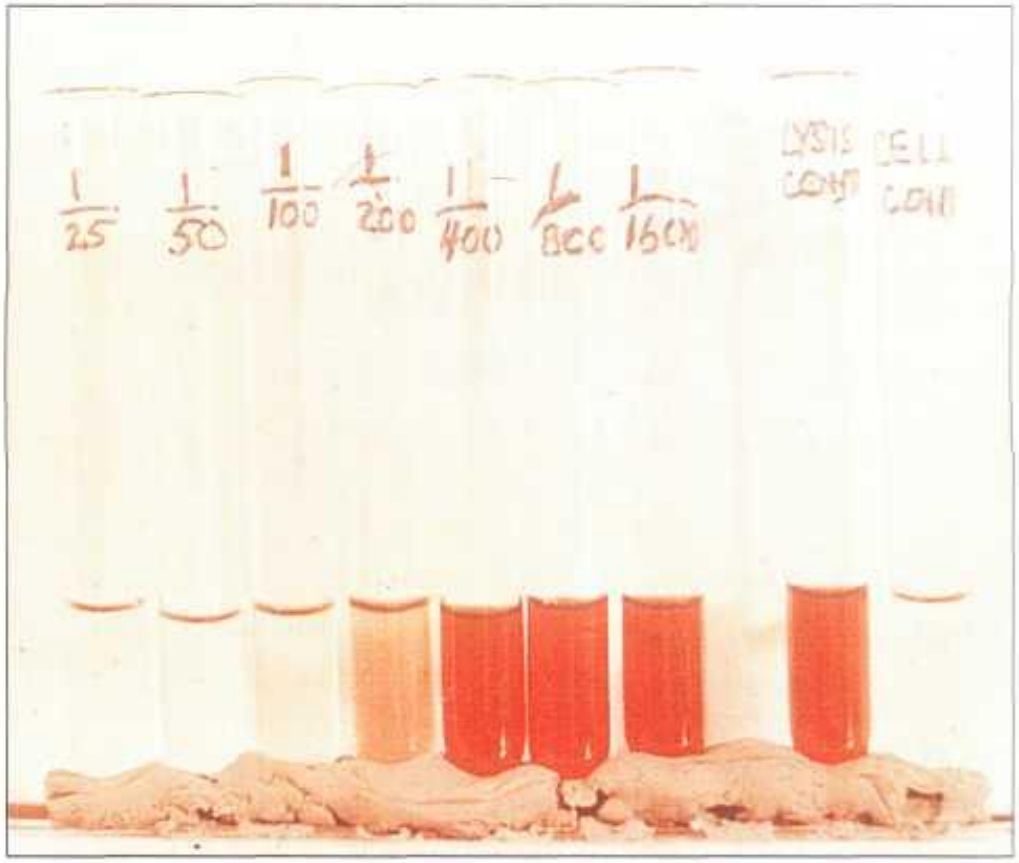


Fig. 14.28 Anti-streptolysin O (ASO) test. The O-toxin lyses red cells and test serum is diluted until it no longer inhibits lysis by a standard concentration of toxin. Positive and negative controls are included in the test (right).

Реакция лизиса

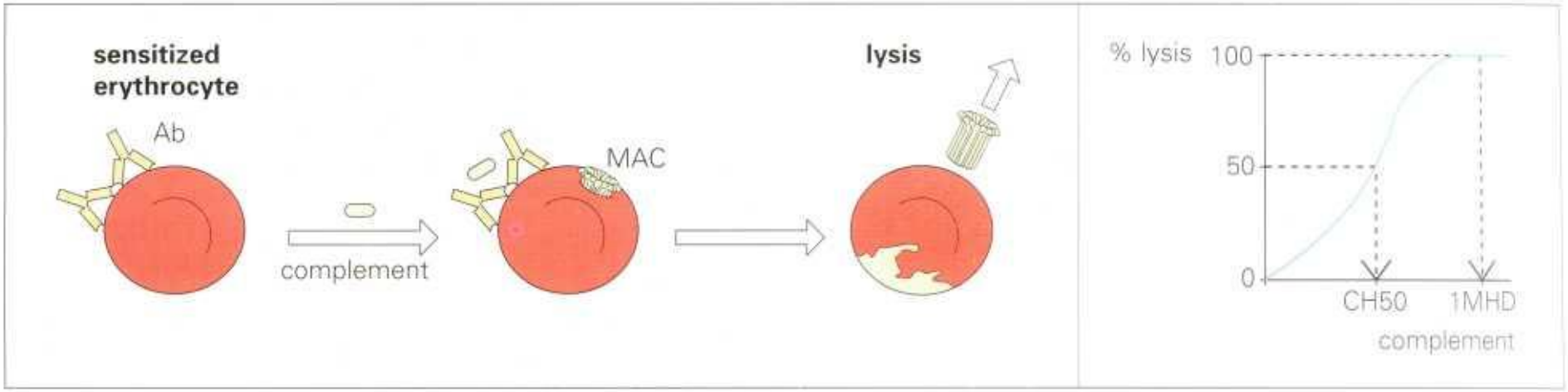
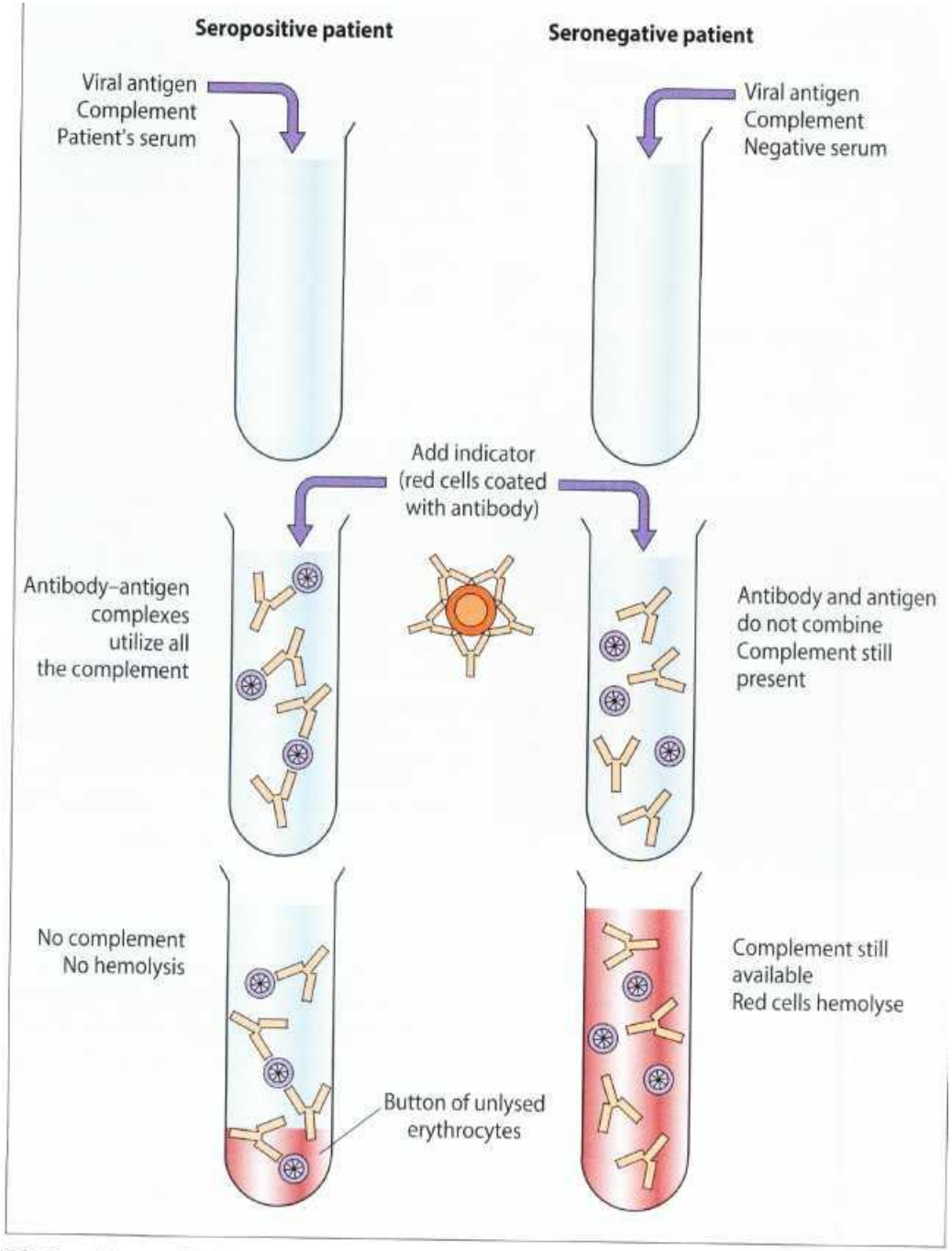


Fig. 14.29 The lysis of red cells sensitized by antibody (left) is used to assay the hemolytic complement activity of a serum sample. The curve (right) shows the lysis of antibody-sensitized red cells with increasing amounts of complement. Because of the sigmoid shape of the curve, the minimum hemolytic dose (MHD) cannot be measured as accurately as the amount giving 50% hemolysis (CH50) so the latter is preferred as a unit. (MAC, membrane attack complex.)

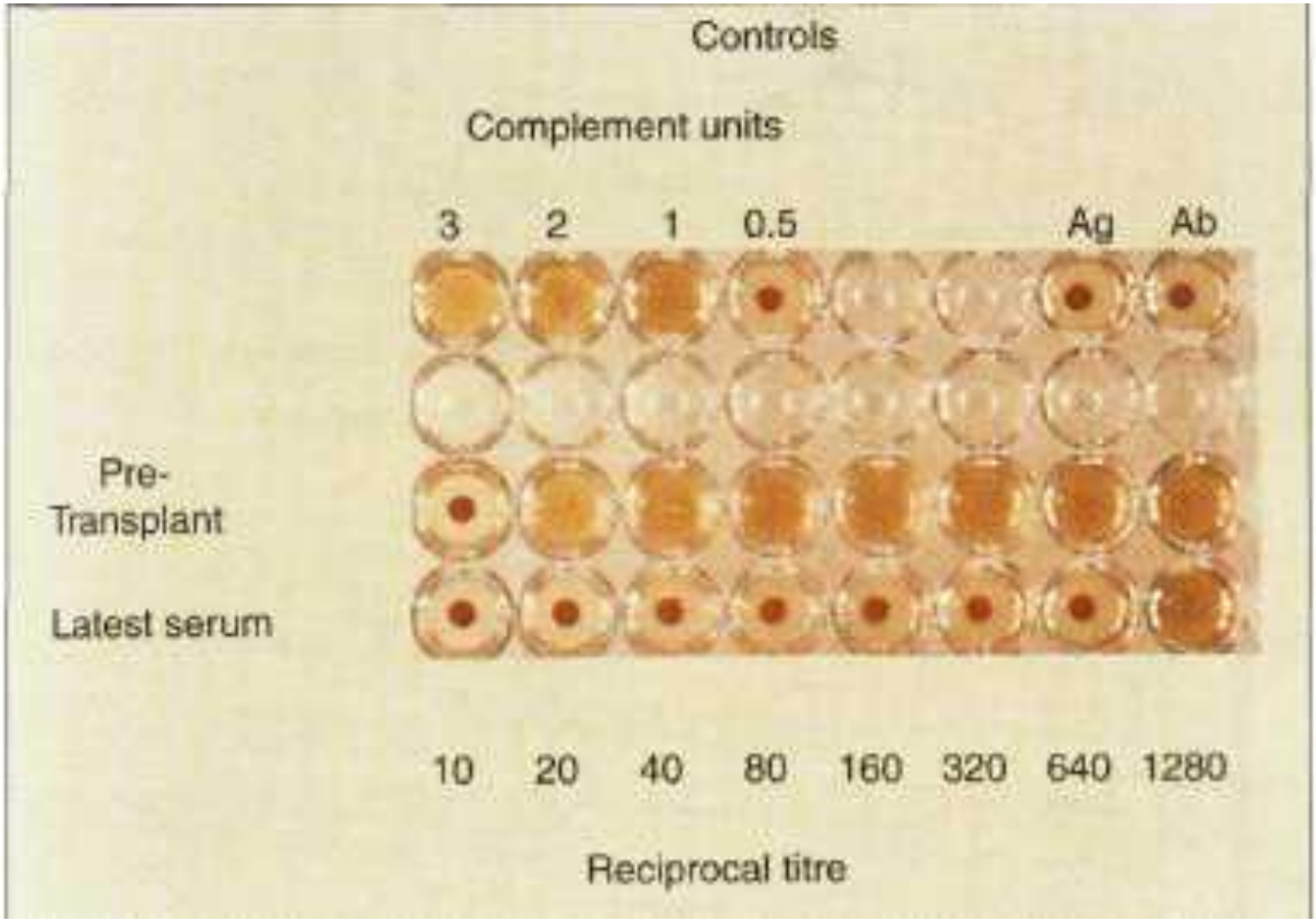


90 Complement fixation test.

РСК

1 фаза – Аг+Ат+С
2 фаза – индикаторная выявление свободного комплемента при добавлении гемолитической системы (Э+ГС)

РСК


Controls
Complement units
3
2
1
0.5
Ag
Ab
Pre-
Transplant
Latest serum
10
20
40
80
160
320
640
1280
Reciprocal titre

РСК

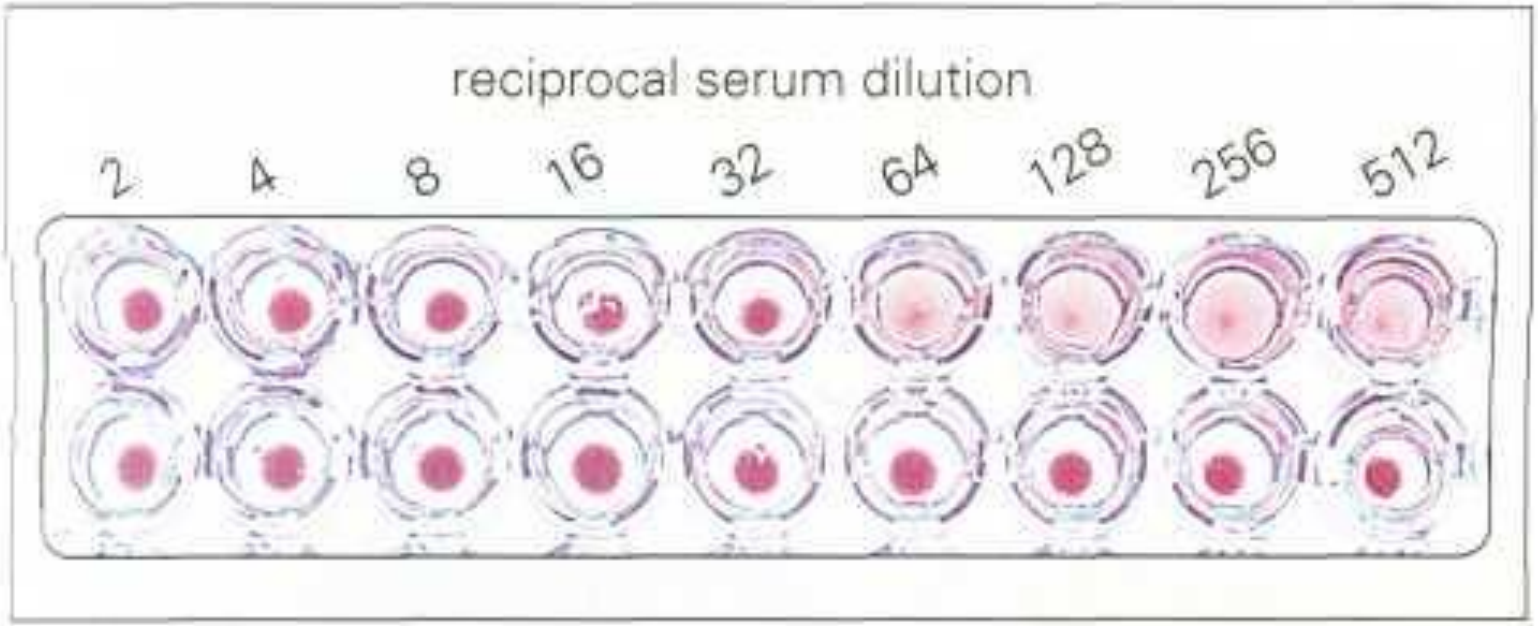
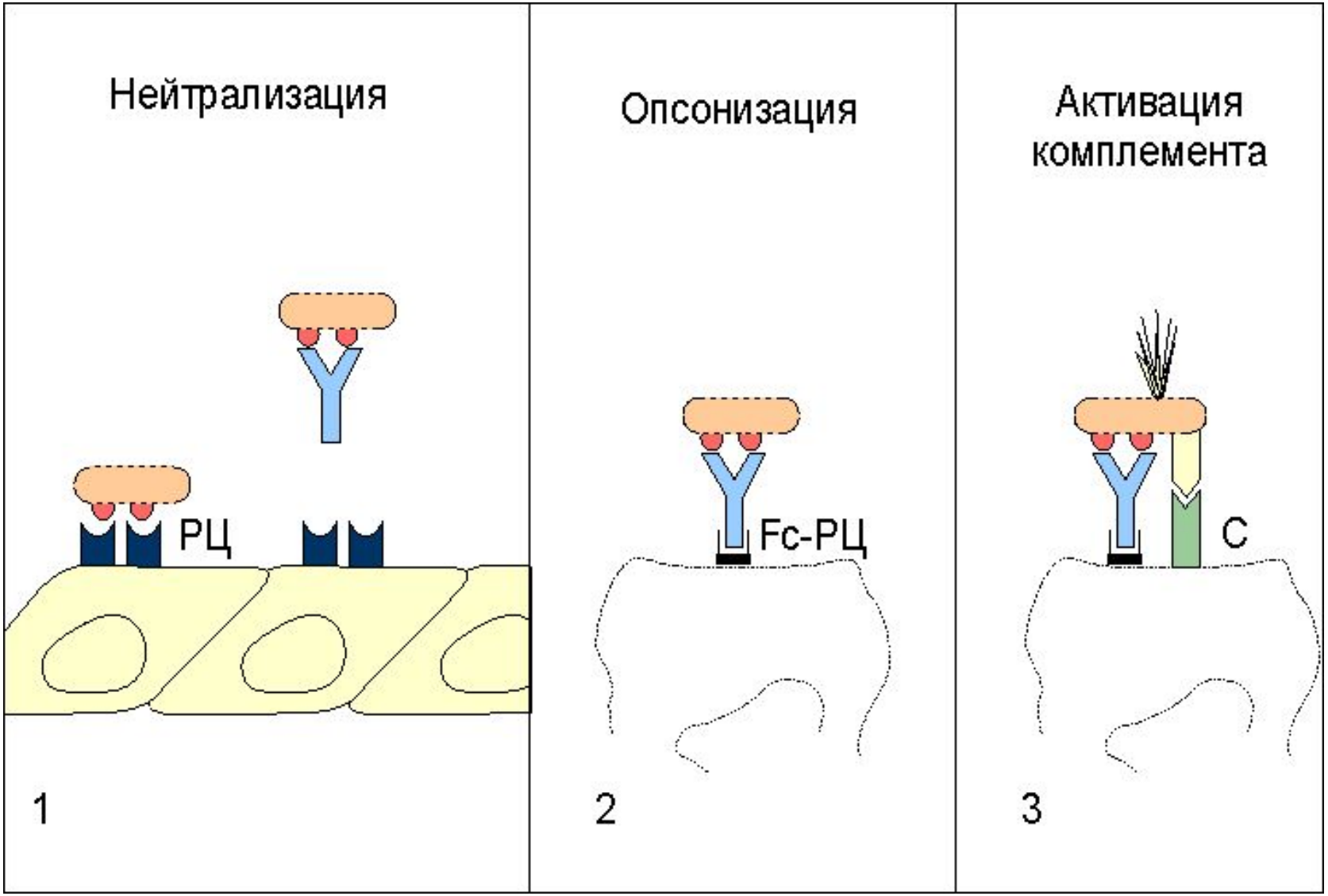


Fig. 14.27 Complement fixation tests (CFTs) are available for the serologic diagnosis of a range of infections. If antigen plus a source of complement (usually guinea pig serum) is added to a test serum, any antibodies present will bind the antigen and in most cases the

Реакция нейтрализации

- РН токсина антитоксином
- РН на культуре клеток

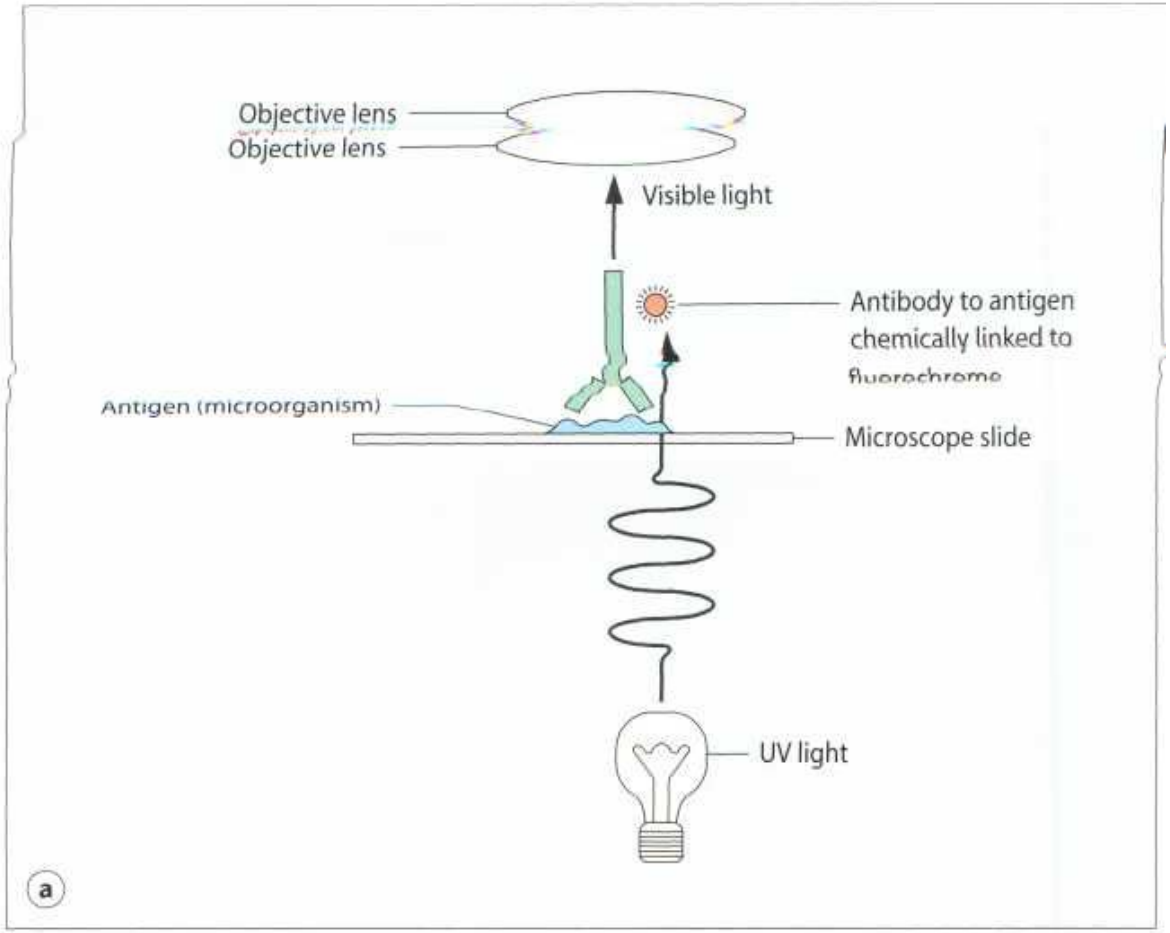
Виды иммунных реакций



Реакции с использованием меченых Аг или Ат

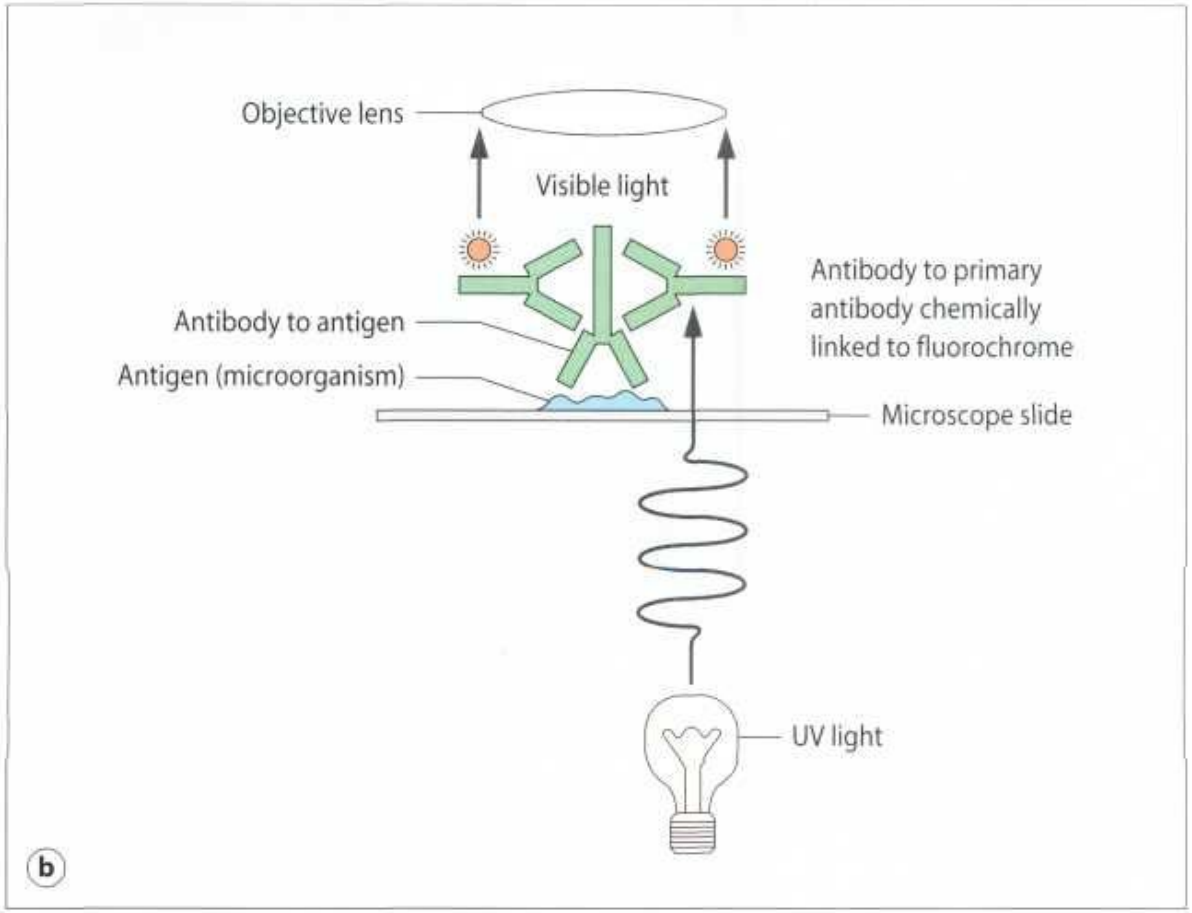
- Р иммунофлюоресценции (РИФ, реакция Кунса) – прямая и непрямая
- Иммуноферментный анализ (ИФА)
- Иммуноблотинг (сочетание электрофореза и ИФА)
- Р радиоиммунного анализа (РИА)
- Иммунная электронная микроскопия – микроскопия в электронном микроскопе вирусов предварительно обработанных иммунной сывороткой меченой электронооптически плотными препаратами (ферритин).

Реакция иммунофлюоресценции



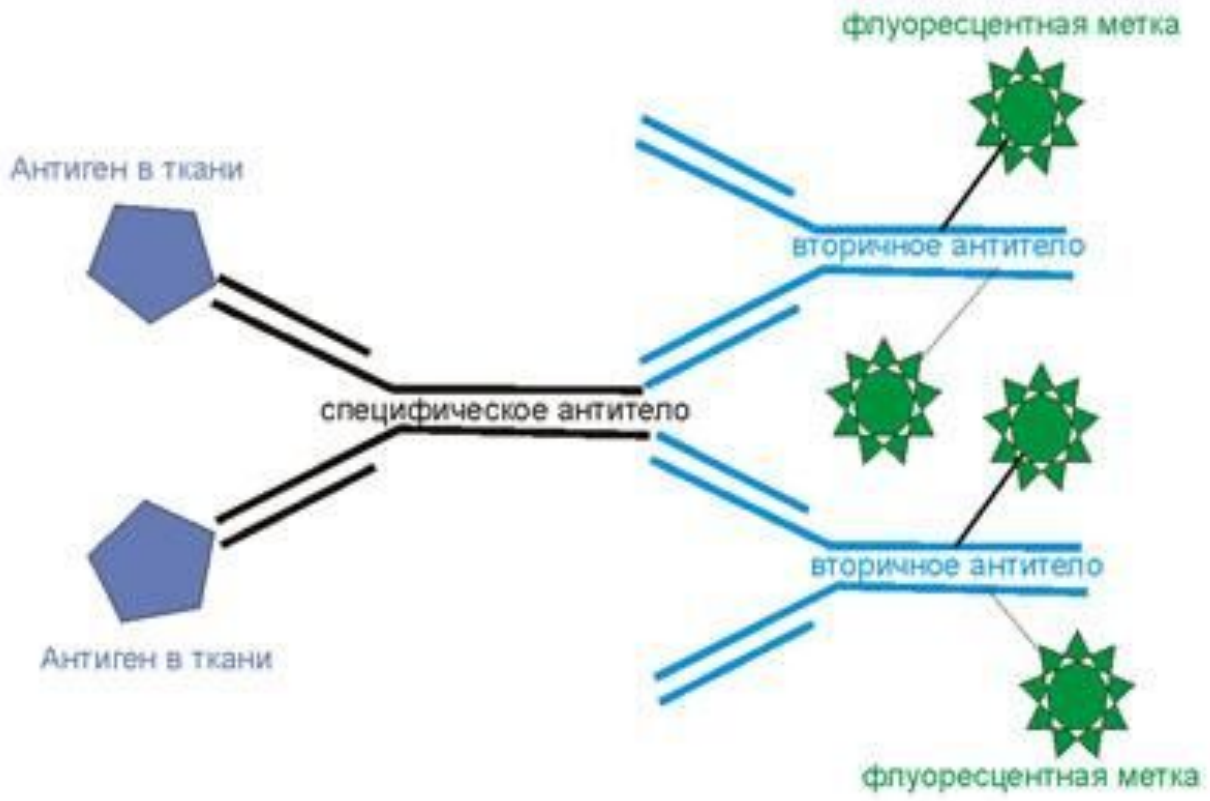
7 a Direct immunofluorescene. In direct immunofluorescence, the object is visualized using a fluorescein-tagged antibody directed against epitopes on the microorganism.

Реакция иммунофлюоресценции

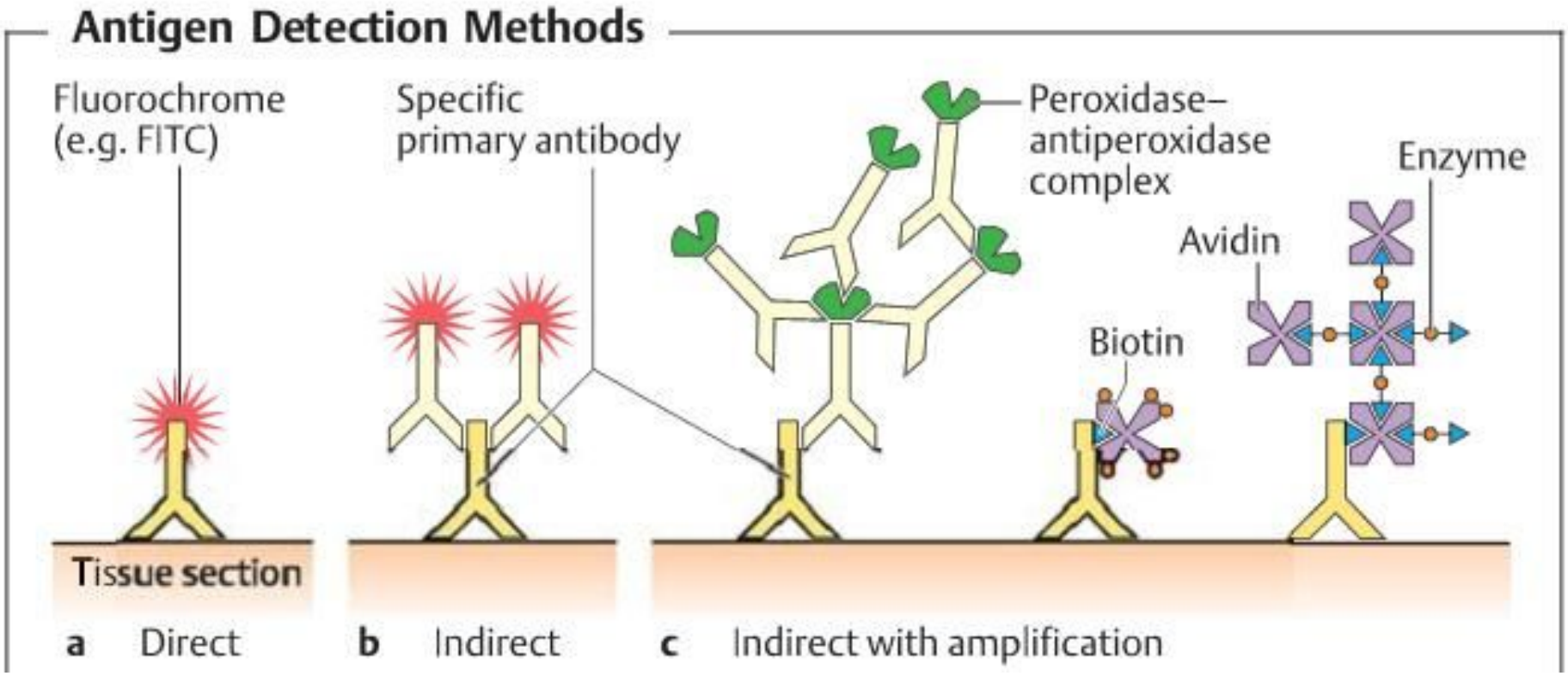


7 b Indirect immunofluorescence. In indirect immunofluorescence, the antiserum directed against the microorganism is added and the slide washed. A fluorescent-labelled antibody directed against the first antibody is then added. This technique can be used to detect either microorganisms or antibodies to the microorganism in a patient's serum.

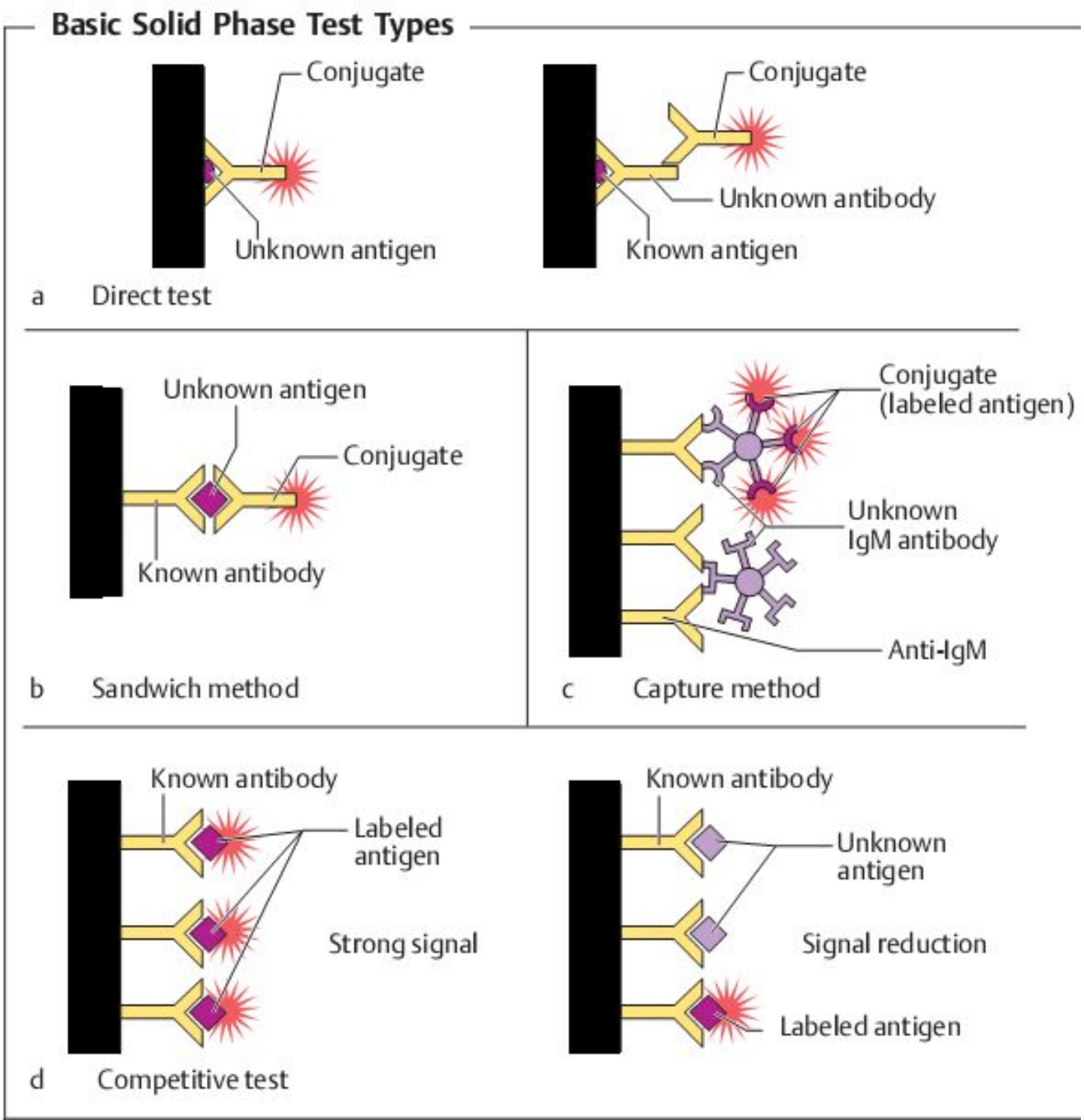
Реакция иммунофлюоресценции



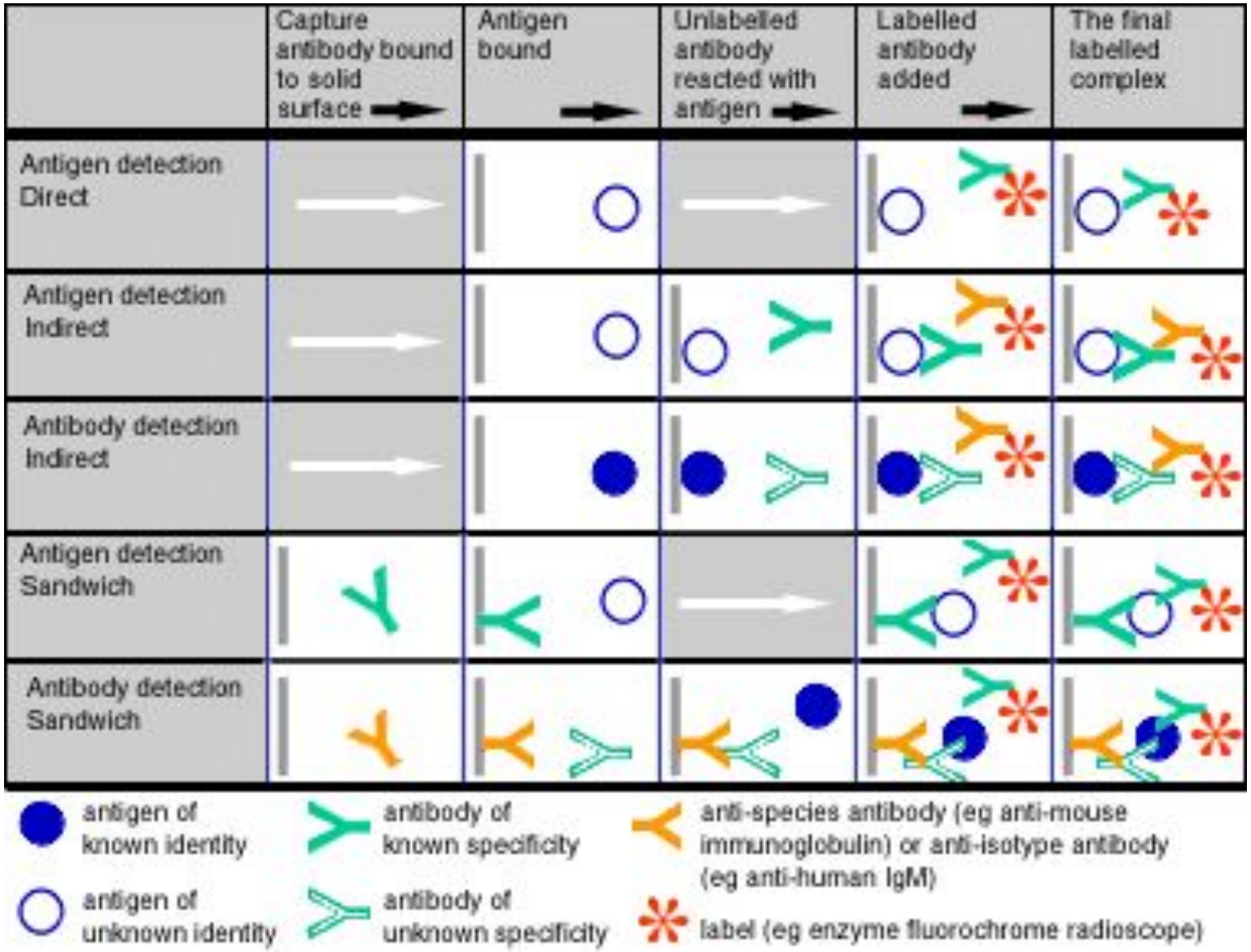
Реакция иммунофлюоресценции



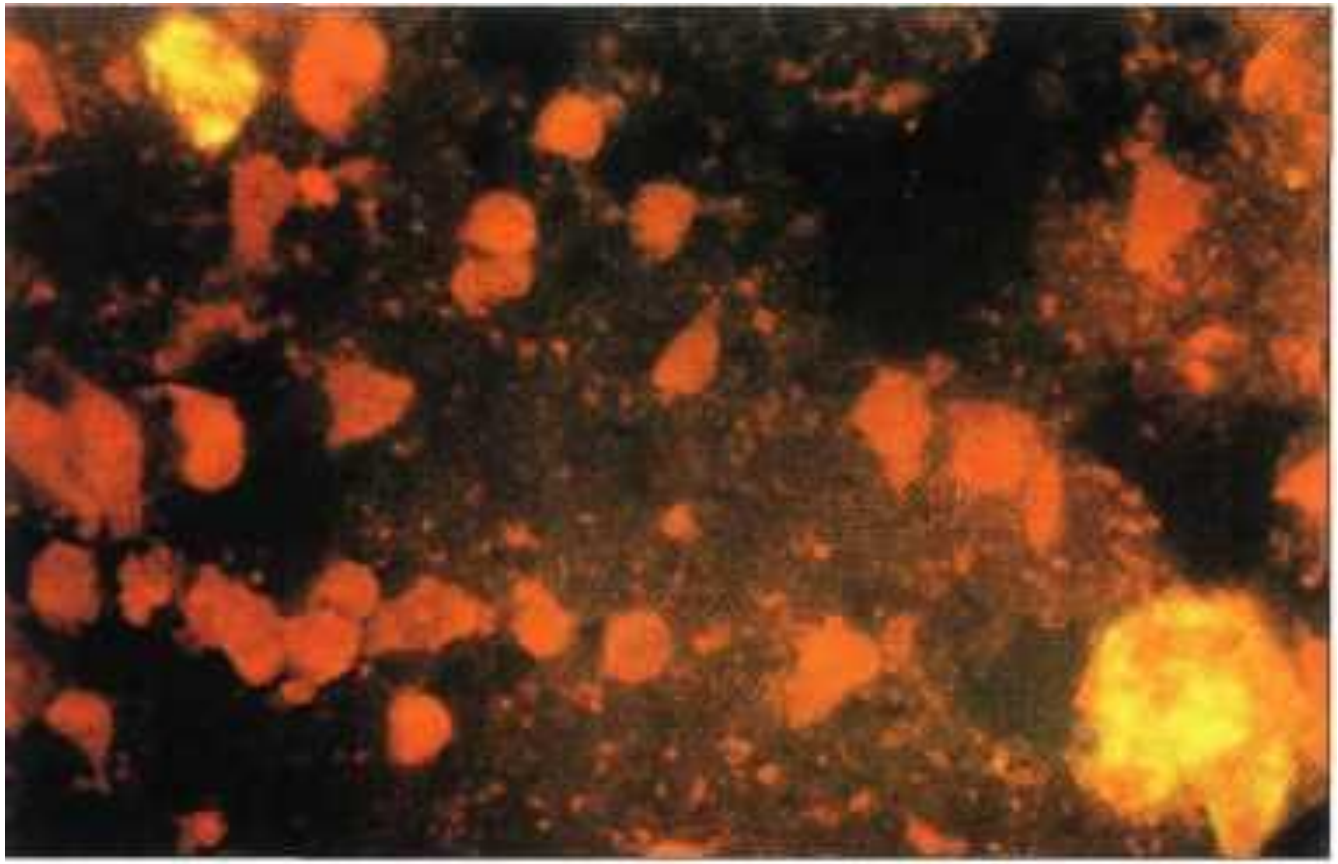
РИФ


Basic Solid Phase Test Types
Conjugate
Unknown antigen
a Direct test
Conjugate
Unknown antibody
Known antigen
Unknown antigen
Conjugate
Known antibody
b Sandwich method
Conjugate
(labeled antigen)
Unknown
IgM antibody
Anti-IgM
c Capture method
Known antibody
Labeled
antigen
Strong signal
Known antibody
Unknown
antigen
Signal reduction
Labeled antigen
d Competitive test

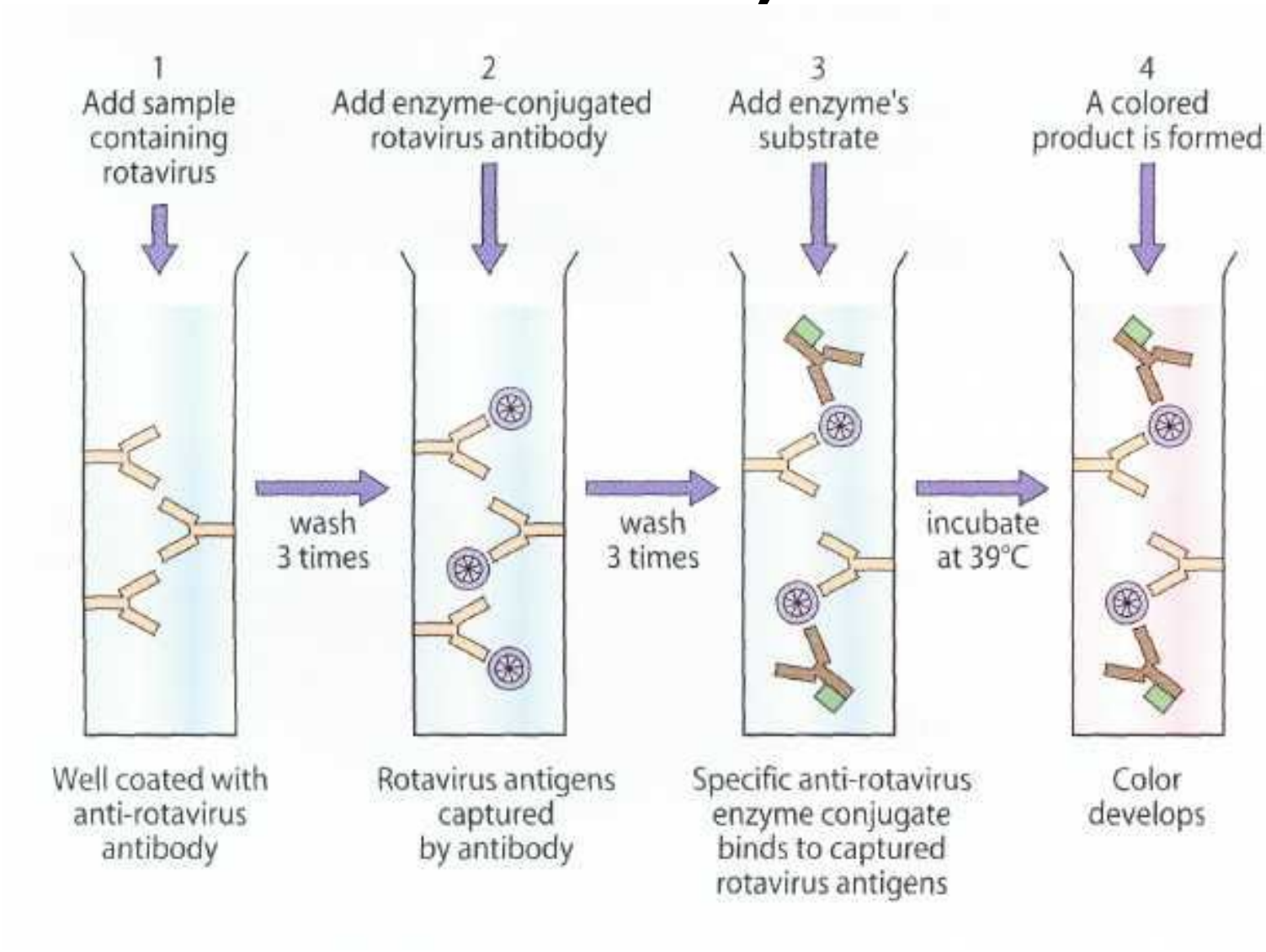
Иммунные реакции с мечеными Аг и Ат



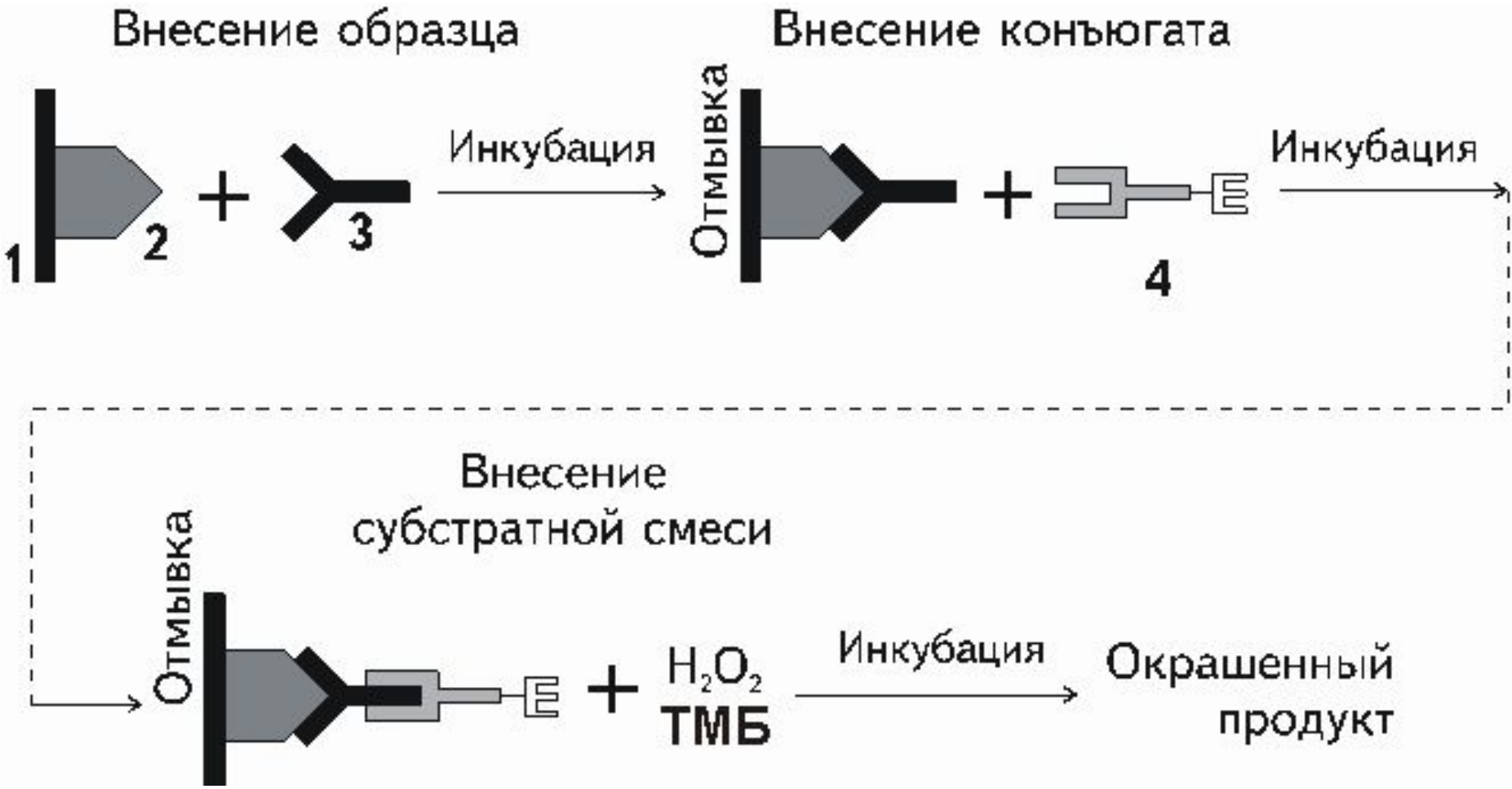
РИФ



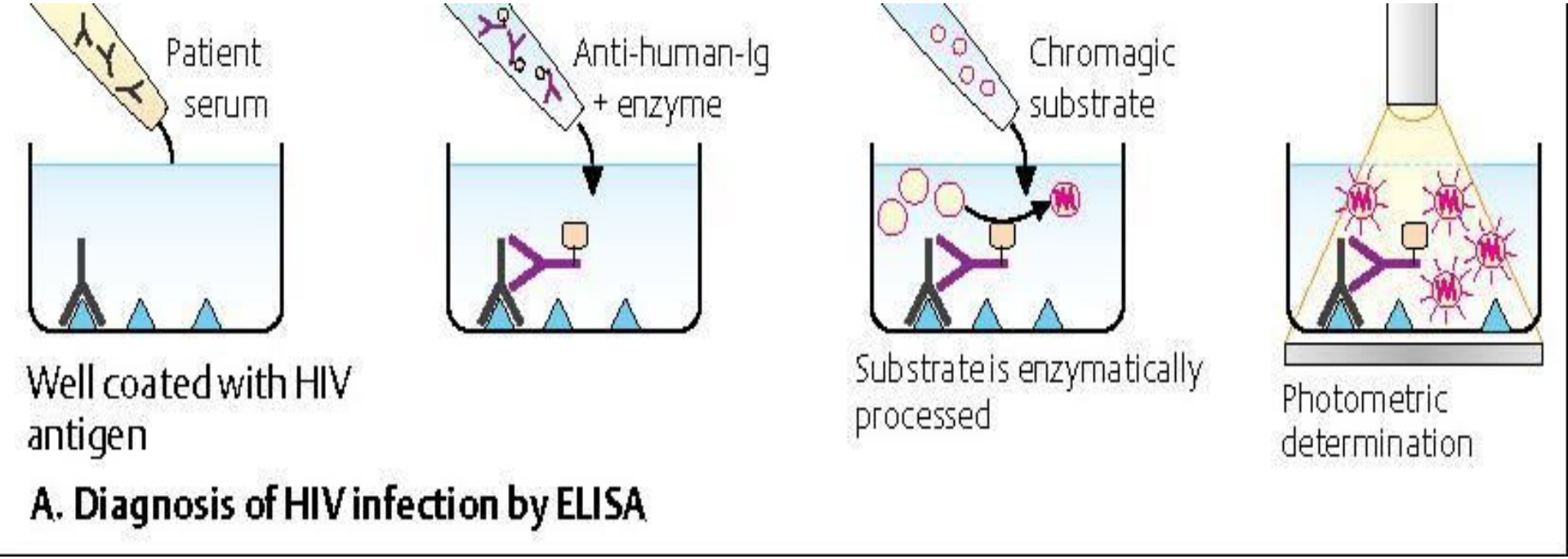
ИФА (иммуно-ферментный анализ)



ИФА


Внесение образца
1
2
3
Инкубация
Отмывка
Внесение конъюгата
4
Инкубация
Отмывка
Внесение
субстратной смеси
H_2O_2
ТМБ
Инкубация
Окрашенный
продукт

ИФА


Patient
serum
Anti-human-Ig
+ enzyme
Chromagic
substrate
Well coated with HIV
antigen
Substrate is enzymatically
processed
Photometric
determination
A. Diagnosis of HIV infection by ELISA

ИФА

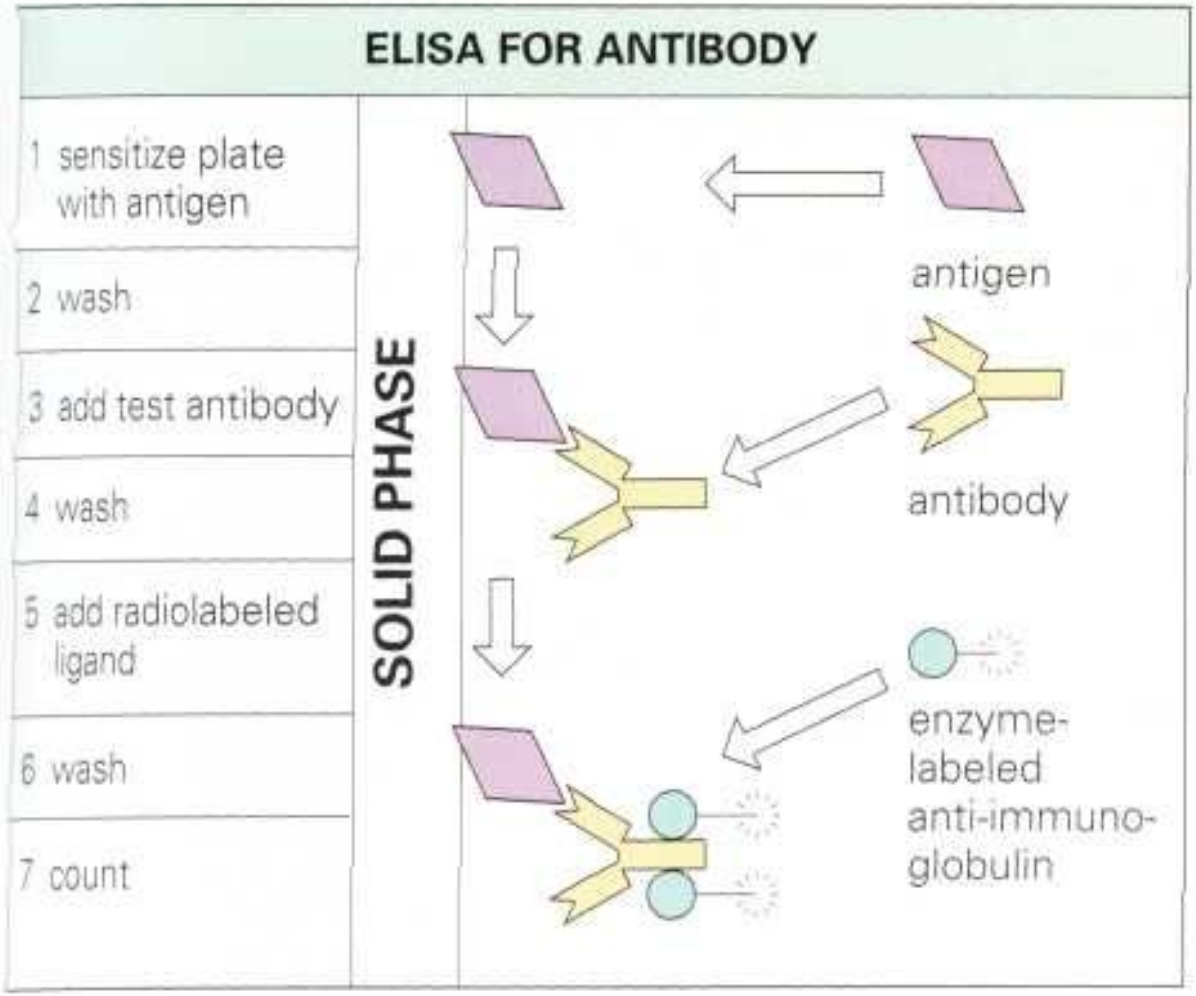
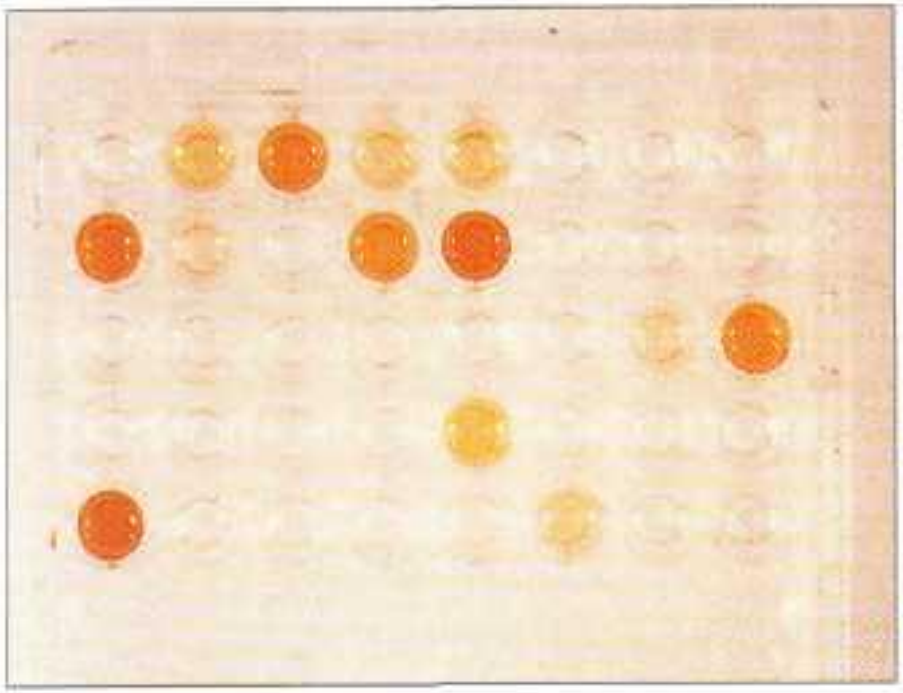


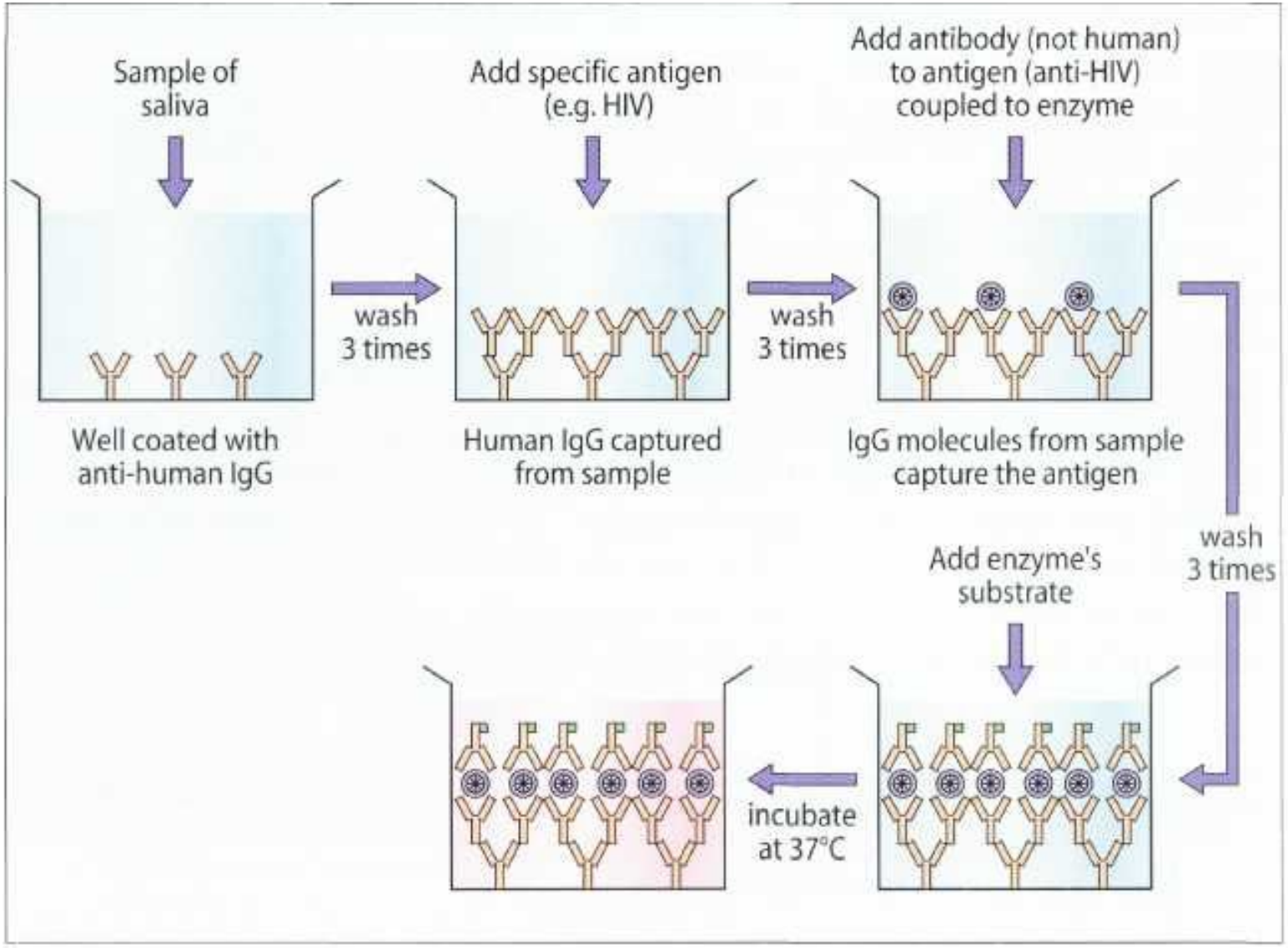
Fig. 14.12 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The binding of antibody in the test serum to solid phase antigen is measured by the binding of a labeled second reagent, usually an anti-immunoglobulin (see indirect test in *Fig. 14.7*) labeled with an enzyme, which can be detected by a color reaction.

ИФА

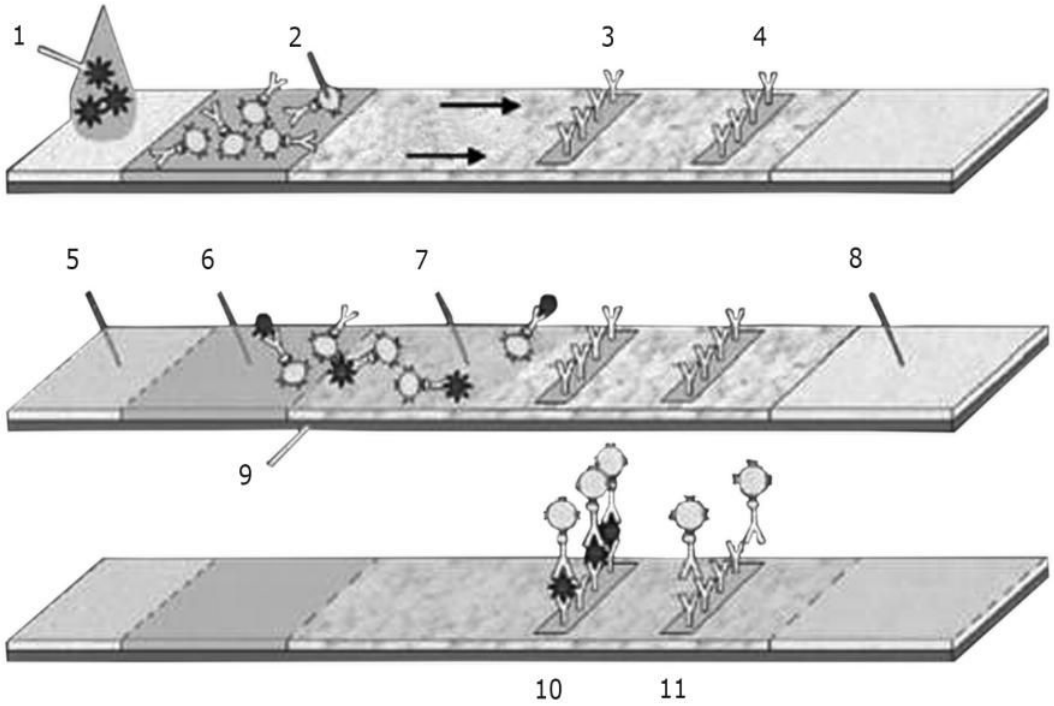


73 Enzyme-linked immunosorbent assay plate showing positive (yellow-brown) and negative wells. In this case, the enzyme used was alkaline phosphatase, and antibody to hepatitis C virus was being detected.

ИФА


Sample of saliva
Add specific antigen (e.g. HIV)
Add antibody (not human) to antigen (anti-HIV) coupled to enzyme
wash 3 times
wash 3 times
Well coated with anti-human IgG
Human IgG captured from sample
IgG molecules from sample capture the antigen
wash 3 times
Add enzyme's substrate
incubate at 37°C

Иммунохроматография

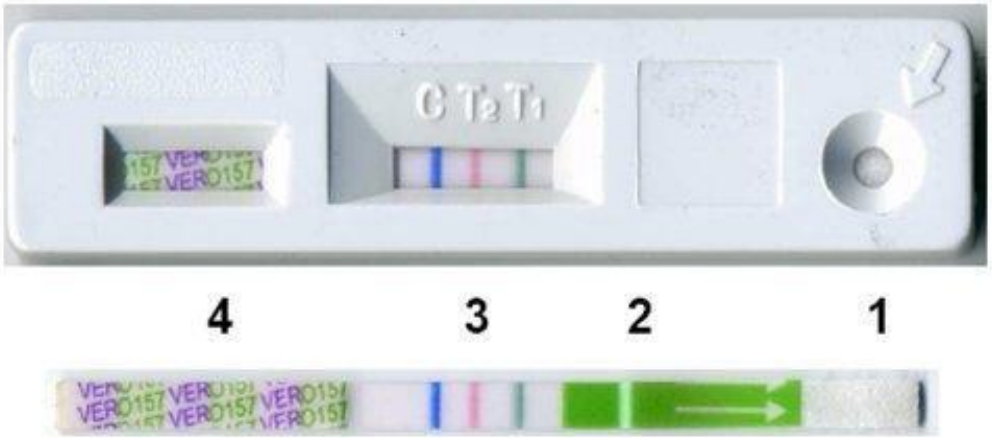


- **Рис. 1. Принцип работы иммунохроматографического экспресс-теста.**
- **1 – образец, содержащий аналит; 2 – конъюгат; 3,4 – иммобилизованные антитела (тестовая и контрольная полосы); 5 – подушечка для образца; 6 – подушечка для конъюгата; 7 – мембрана; 8 – подушечка для абсорбции реагентов; 9 – подложка для мембраны; 10 – тестовая полоса: положительный результат; 11 – контрольная полоса: достоверный результат теста.**

Иммунохроматография

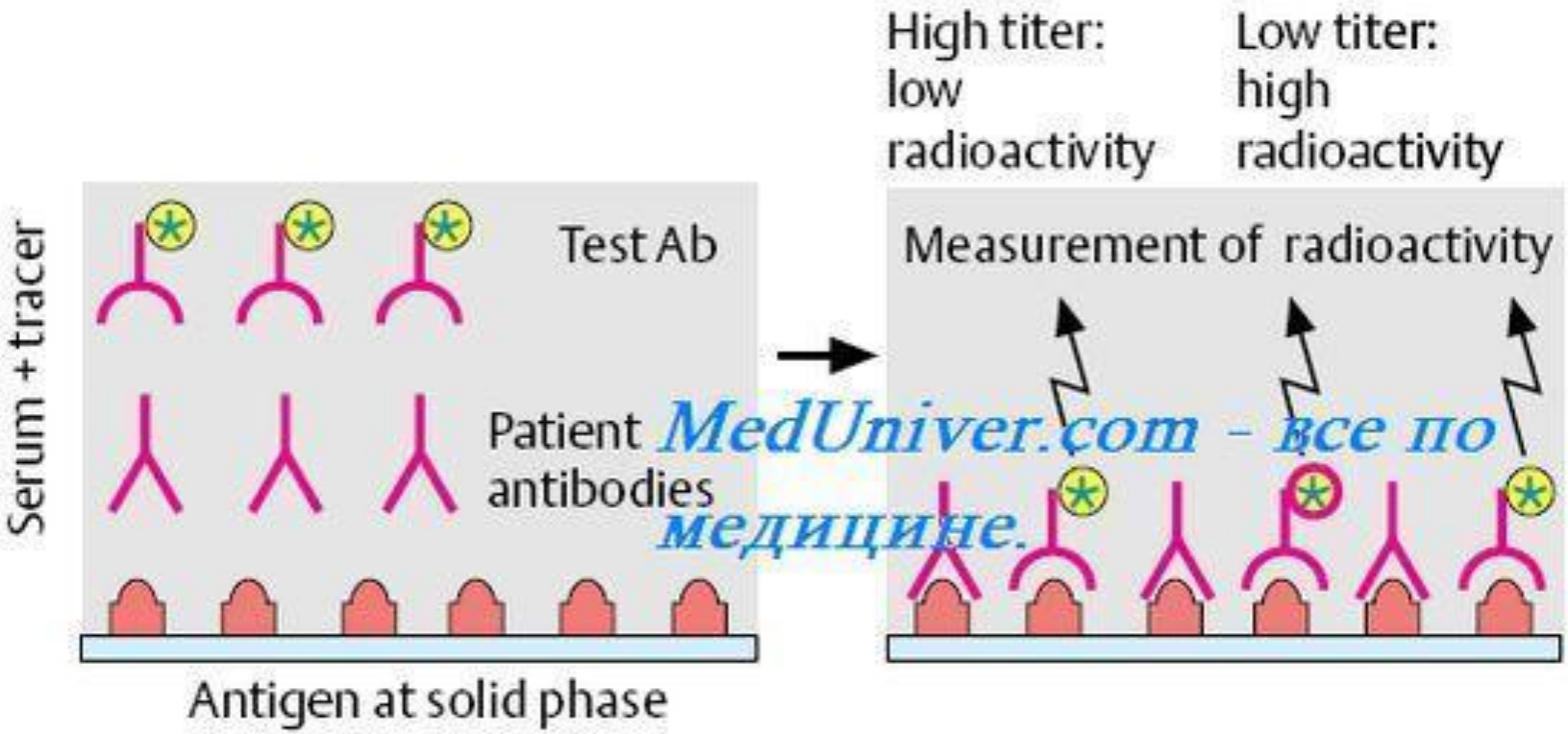
- Исследуемый образец суспендируют в специальном буферном растворе. Надосадочная жидкость смешивается в определенной пропорции с конъюгатом – специфичными антителами, связанными с окрашенными частицами латекса.
- Частицы комплекса «антиген–конъюгат» двигаются вдоль нитроцеллюлозной мембраны, в которой иммобилизованы антитела, специфичные к антигену.
- Они связывают частицы движущегося комплекса, в тестовой зоне образуется видимая полоса, свидетельствующая о наличии определяемого возбудителя в образце.
- Контрольная полоса, свидетельствующая о том, что миграция образца вдоль мембраны произошла нормально.
- В результате анализа появляются полосы разного цвета, соответствующих присутствующему в образце возбудителю.

Иммунохроматография



- **Положительный результат экспресс-теста RIDA Quick Verotoxin / O157 Combi**
  Формат теста: вверху – тест-кассета, внизу – тест-полоска.
  1 – участок внесения образца.
  2 – участок расположения конъюгата.
  3 – реакционная зона; слева направо – контрольная полоса (С); тестовая полоса, свидетельствующая о наличии в образце веротоксина (Т2); тестовая полоса, свидетельствующая о наличии антигенов штамма О157 (Т1).
  4 – участок абсорбции реагентов (закрыт пленкой с названием теста).

РИА (радиоиммунный анализ)

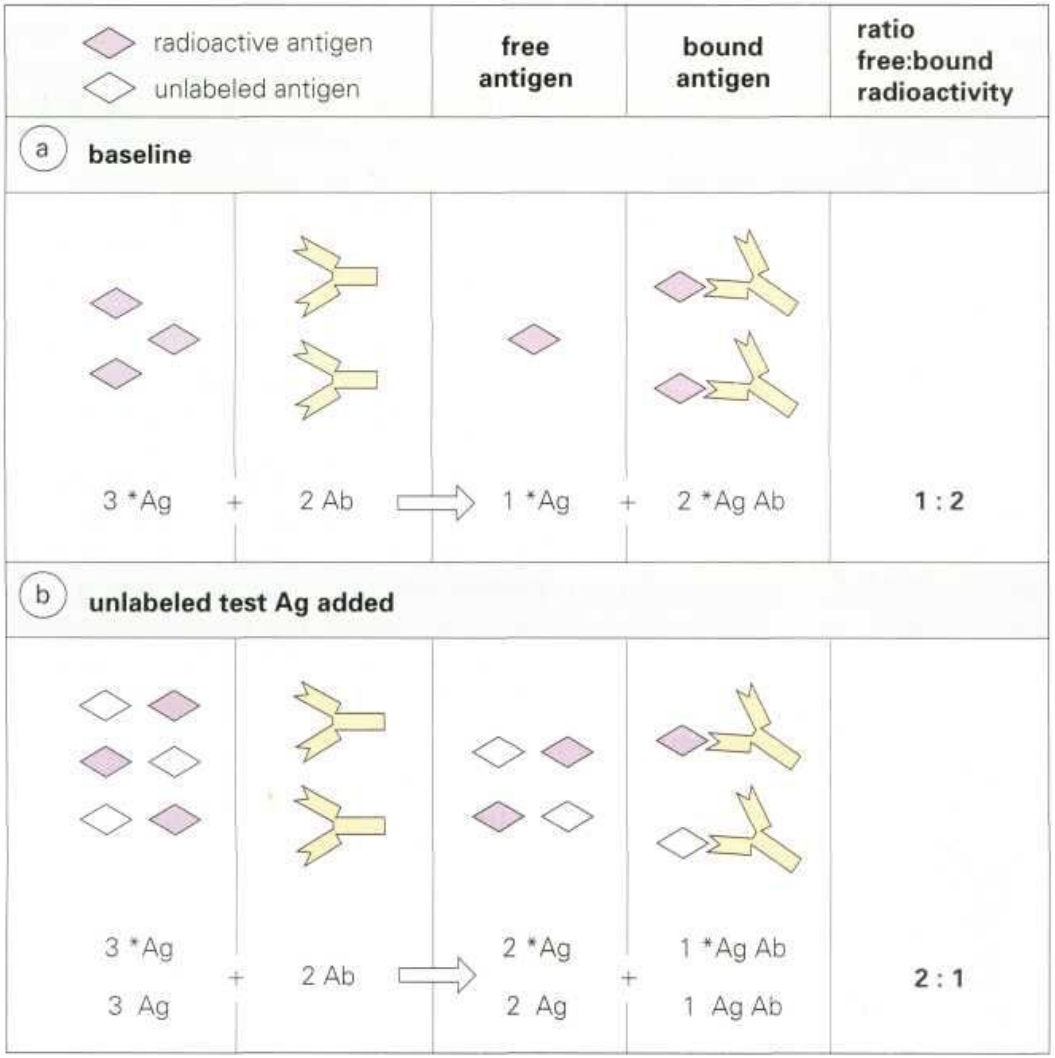


MedUniver.com - все по медицине.

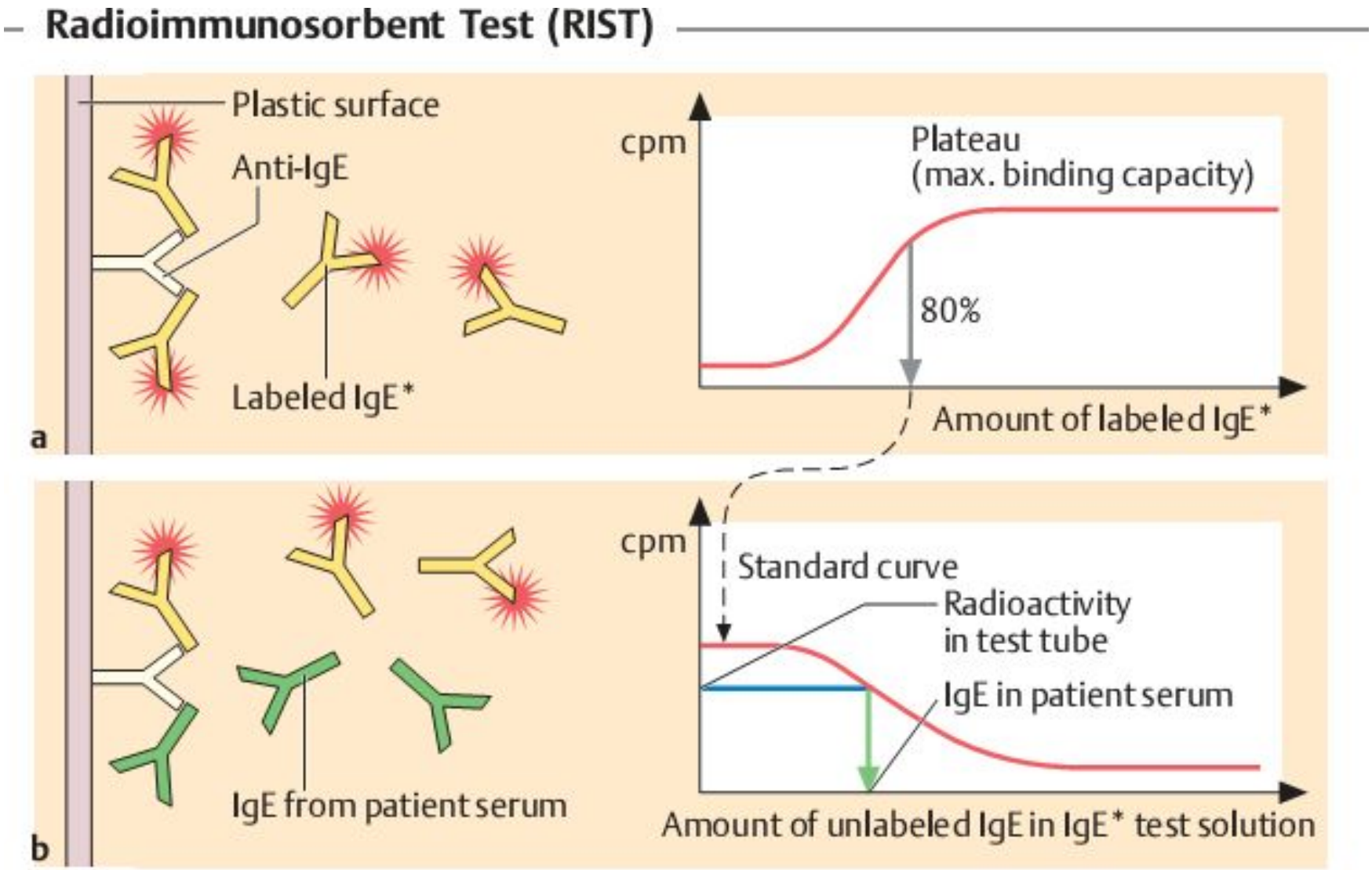
Principle: antibody in patient serum competes with radioactively labeled test antibody

C. Radioimmunoassay (classical method)

РИА (радиоиммунный анализ)

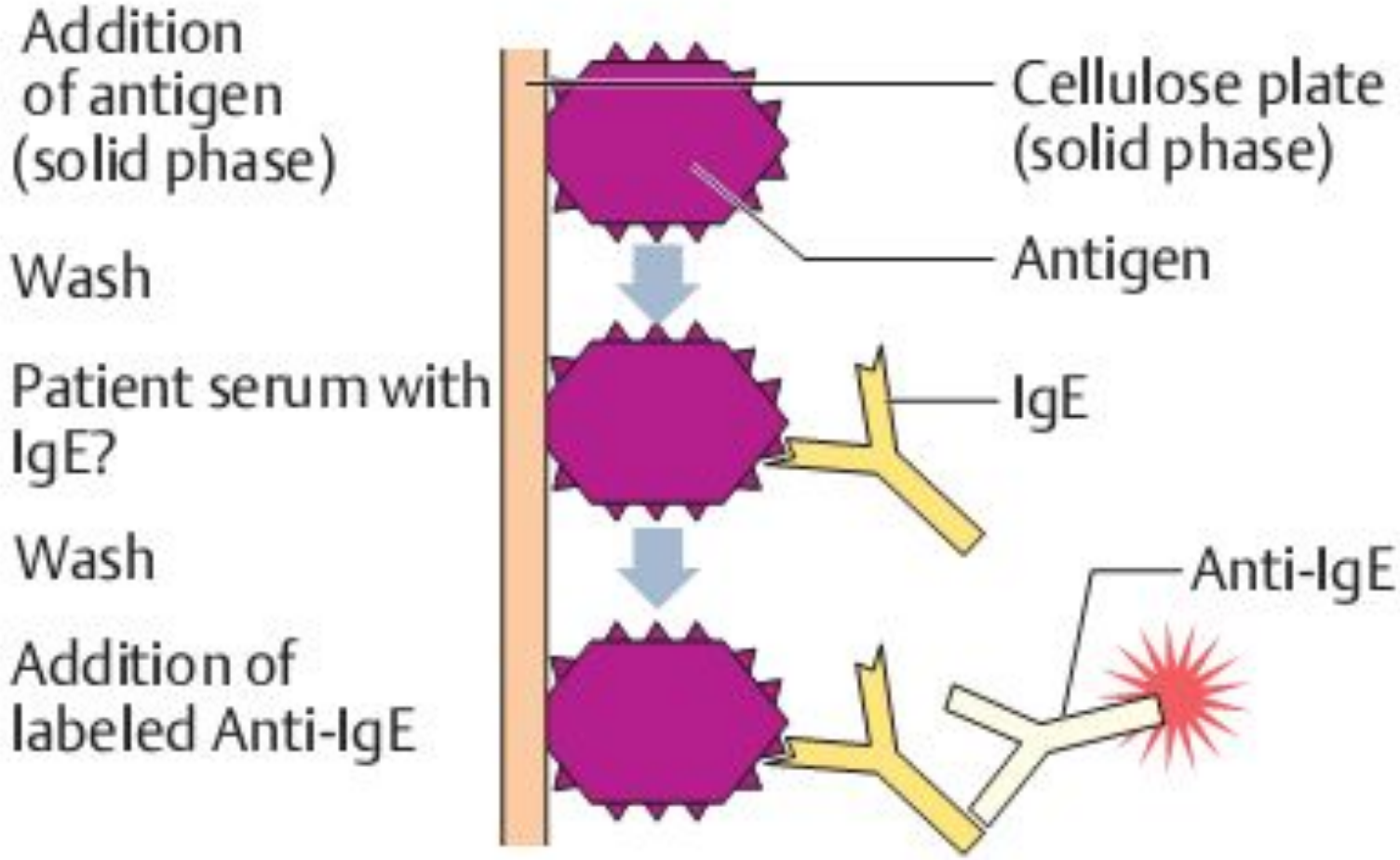


РИА


Radioimmunosorbent Test (RIST)
Plastic surface
Anti-IgE
Labeled IgE*
a
cpm
Plateau
(max. binding capacity)
80%
Amount of labeled IgE*
IgE from patient serum
b
cpm
Standard curve
Radioactivity
in test tube
IgE in patient serum
Amount of unlabeled IgE in IgE* test solution

РИА

– **Radioallergosorbent Test (RAST)**



Иммуноблотинг

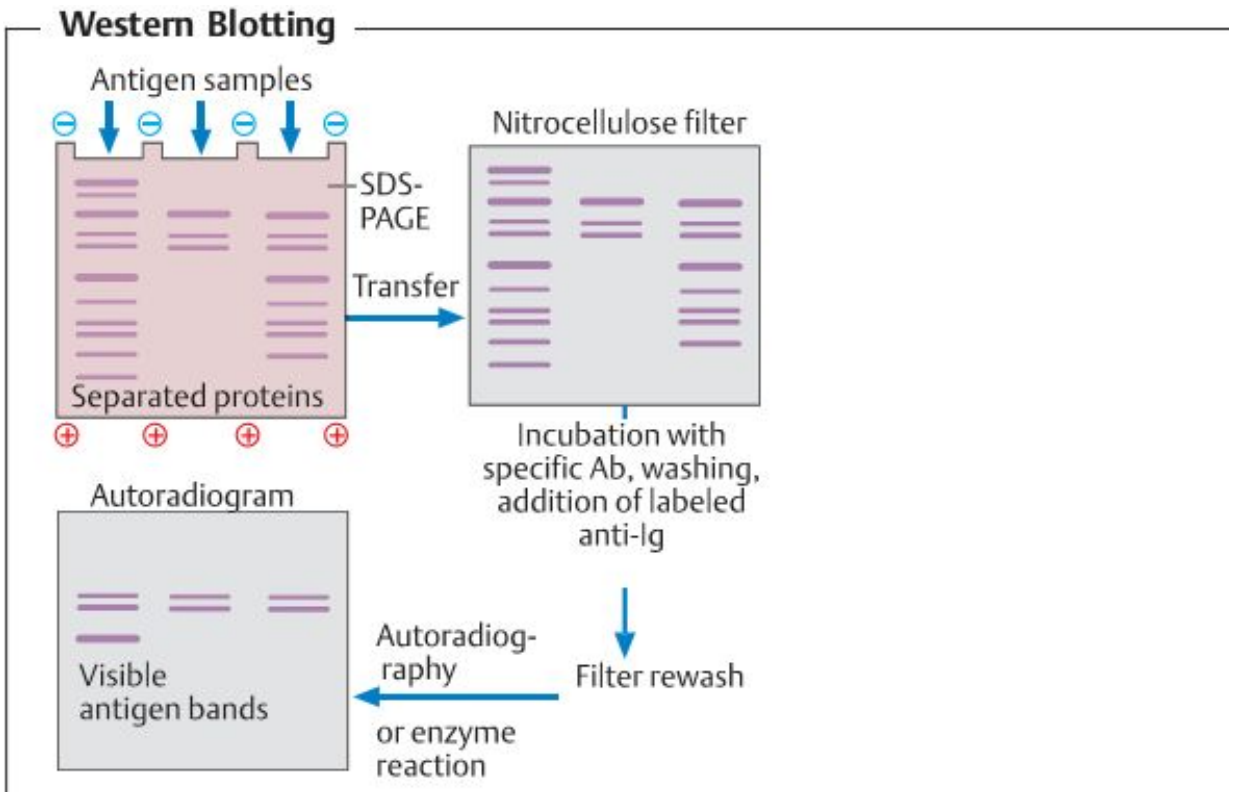


Fig. 2.**24** Antigen samples separated in a gel are transferred to nitrocellulose. Non-specific binding of the antibodies to the filter is then prevented with serum albumin or irrelevant proteins that do not cross-react with any of the antibodies used. Antibodies specific for the antigens being sought are then added. Once immune complexes have formed, the unbound antibodies are thoroughly washed away and the remaining bound antibodies are labeled using anti-immunoglobulin antibodies. These are in turn rendered visible by the autoradiographic procedure.

Блоттинг – (*Blot* – пятно) основан на сочетании электрофореза и ИФА или РИА
Антиген выделяют с помощью ЭФ в геле
Переносят на активированную бумагу или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ИФА.
(коммерческие)

Иммуноблотинг

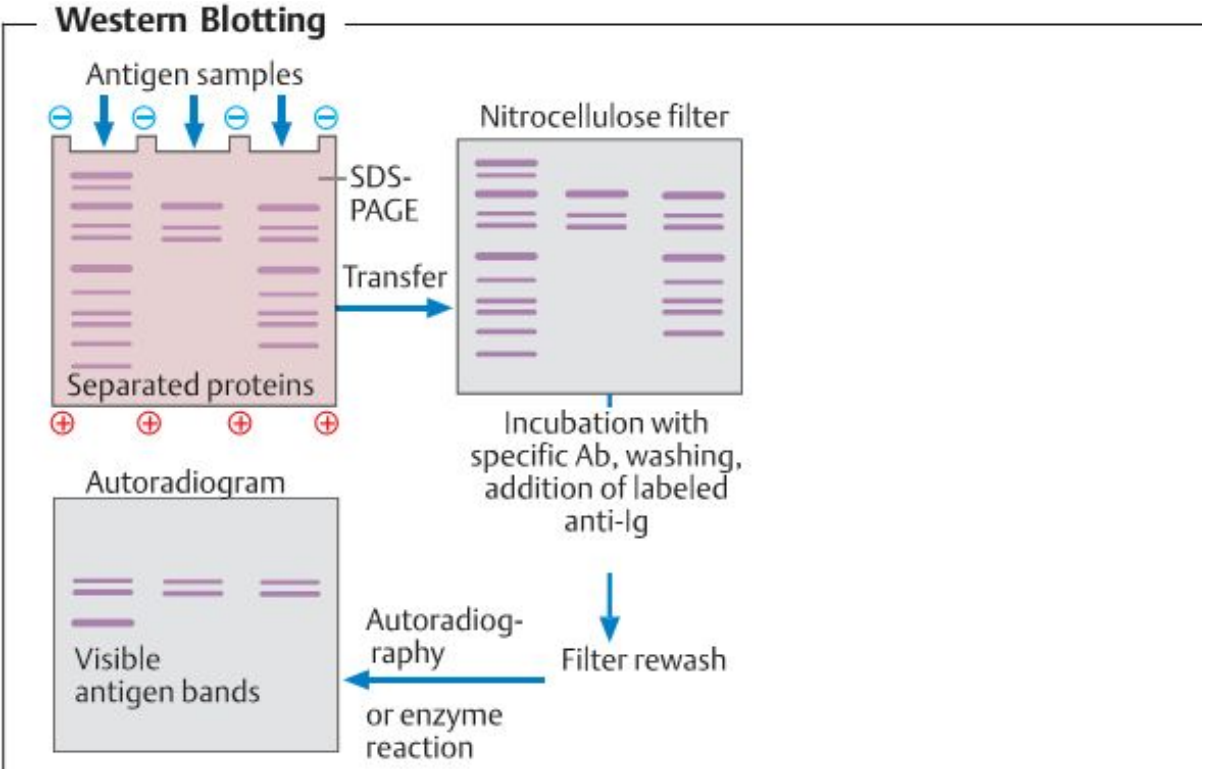
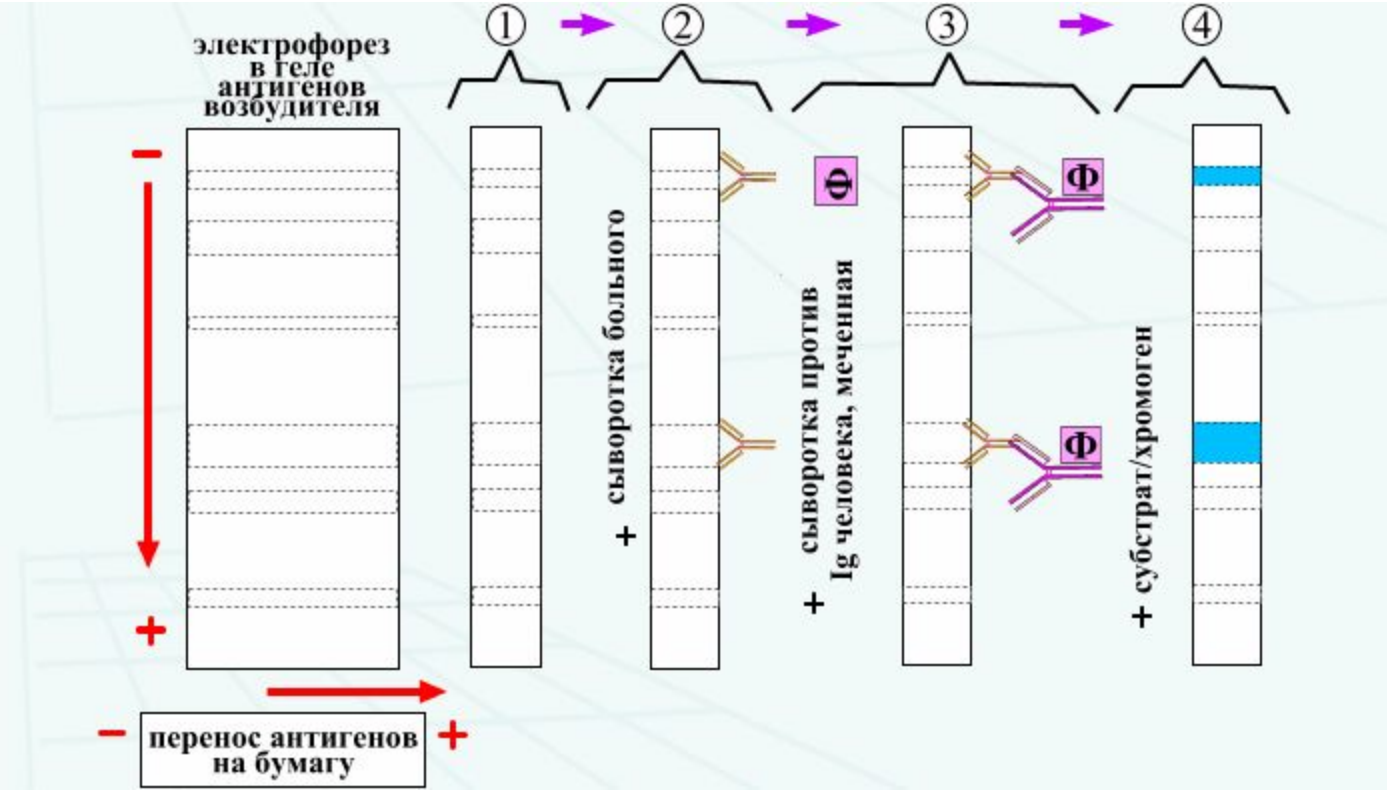


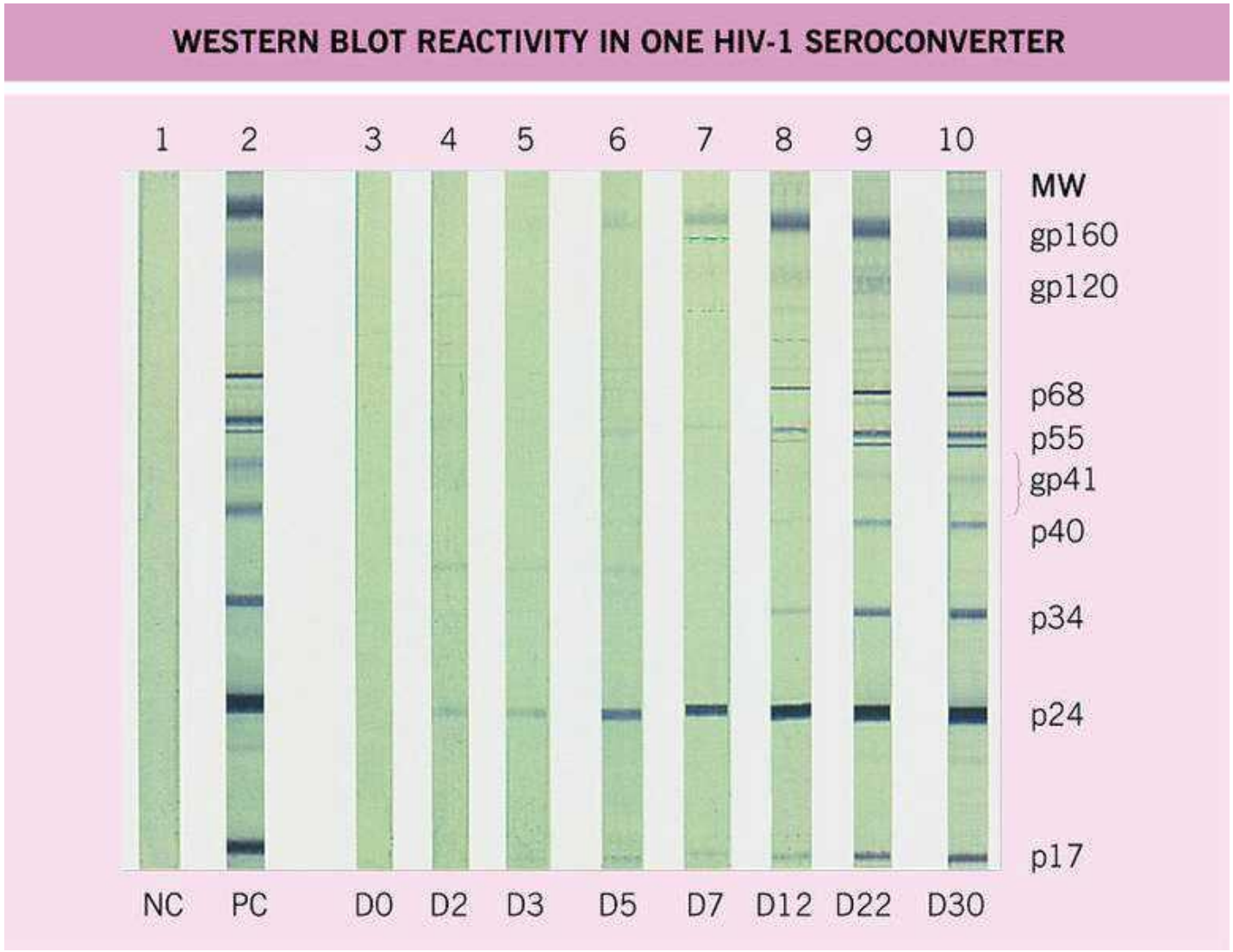
Fig. 2.**24** Antigen samples separated in a gel are transferred to nitrocellulose. Non-specific binding of the antibodies to the filter is then prevented with serum albumin or irrelevant proteins that do not cross-react with any of the antibodies used. Antibodies specific for the antigens being sought are then added. Once immune complexes have formed, the unbound antibodies are thoroughly washed away and the remaining bound antibodies are labeled using anti-immunoglobulin antibodies. These are in turn rendered visible by the autoradiographic procedure.

- **На полоски наносят сыворотку больного**
- **Отмывают**
- **Наносят антисывортку меченую ферментом**
- **Добавляют хромоген**
- **Изменение окраски**
- **Возможна радиография если добавляли сыворотку меченую радиоактивной меткой**

Иммуноблотинг



Иммуноблотинг



Проточная цитометрия

- **Проточная цитометрия и сортировка – это современная технология быстрого измерения параметров клеток или клеточных компонентов, основанная на пропускании суспензии микрообъектов через зону чувствительности прибора с возможностью их последующего разделения на основе измеренных характеристик.**
- **Использование моноклональных Ат к CD-антигенам.**

Проточная цитофлюорометрия

- Фенотипирование клеток с применением моноклональных антител
- Изучение пролиферативной активности нормальных и опухолевых клеток на основе анализа клеточного цикла
- Выявление анеуплоидных клонов и апоптозных клеток
- Автоматический счет форменных элементов крови
- Исследование размеров клеток
- Дифференциальный анализ с подсчетом формулы крови
- Выделение атипичных клеток

Достоинства

1. Высокая скорость анализа
2. Большая точность и воспроизводимость измерений
3. Надежность и достоверность результатов
4. Анализ точности измерений, сто дает возможность «контроля качества»
5. Большая разрешающая способность и чувствительность метода
6. Способность определять и анализировать ничтожно малые концентрации частиц (при тромбоцитопениях)
7. Применение при анализе компьютерной техники при регистрации, накоплении и хранении данных

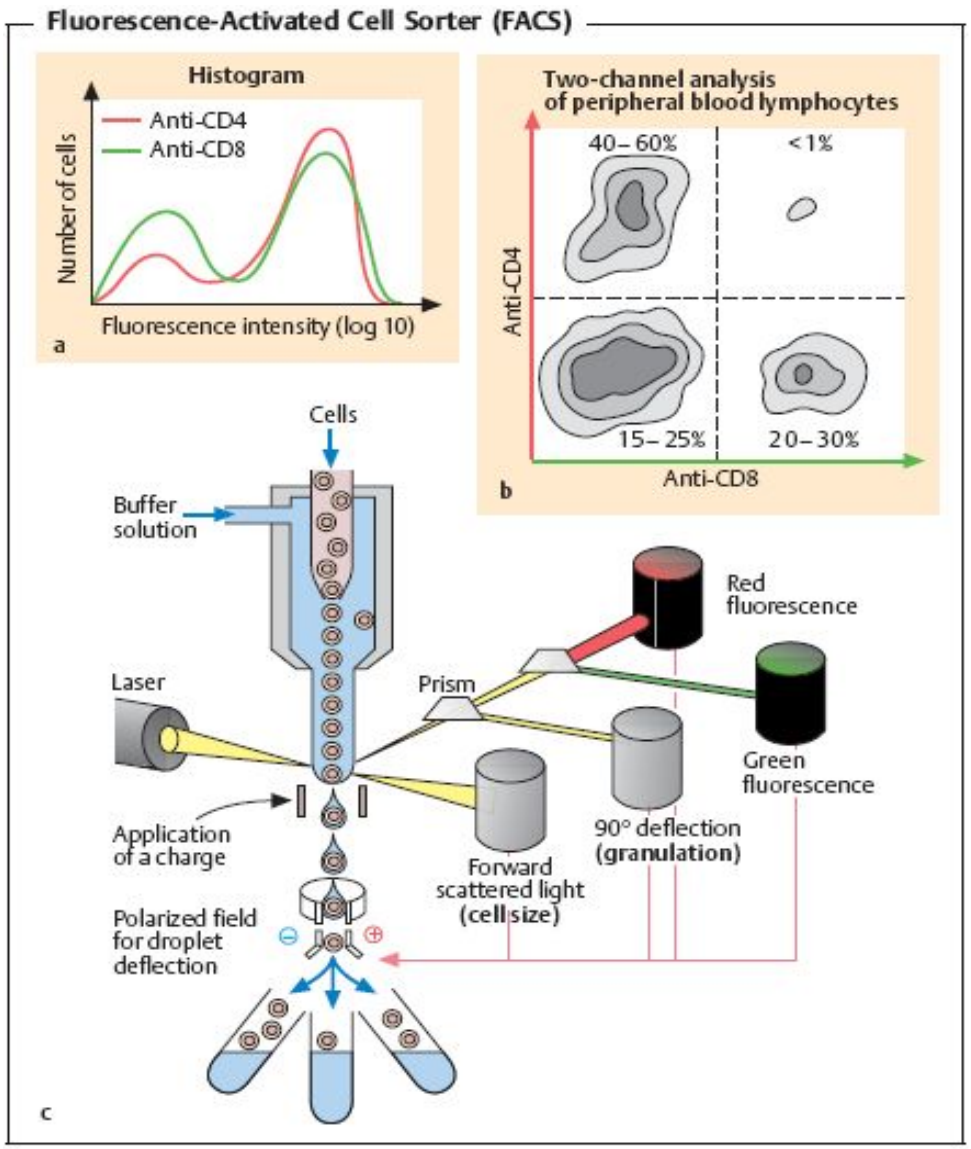
Недостатки

- Высокая стоимость аппаратуры для проточной цитометрии
- Дороговизна обучения технического персонала
- Отсутствие прямого визуального анализа объектов и изучения тонкой структуры клеток по сравнению с компьютерной цитофотоморфометрией фиксированных препаратов

Задачи

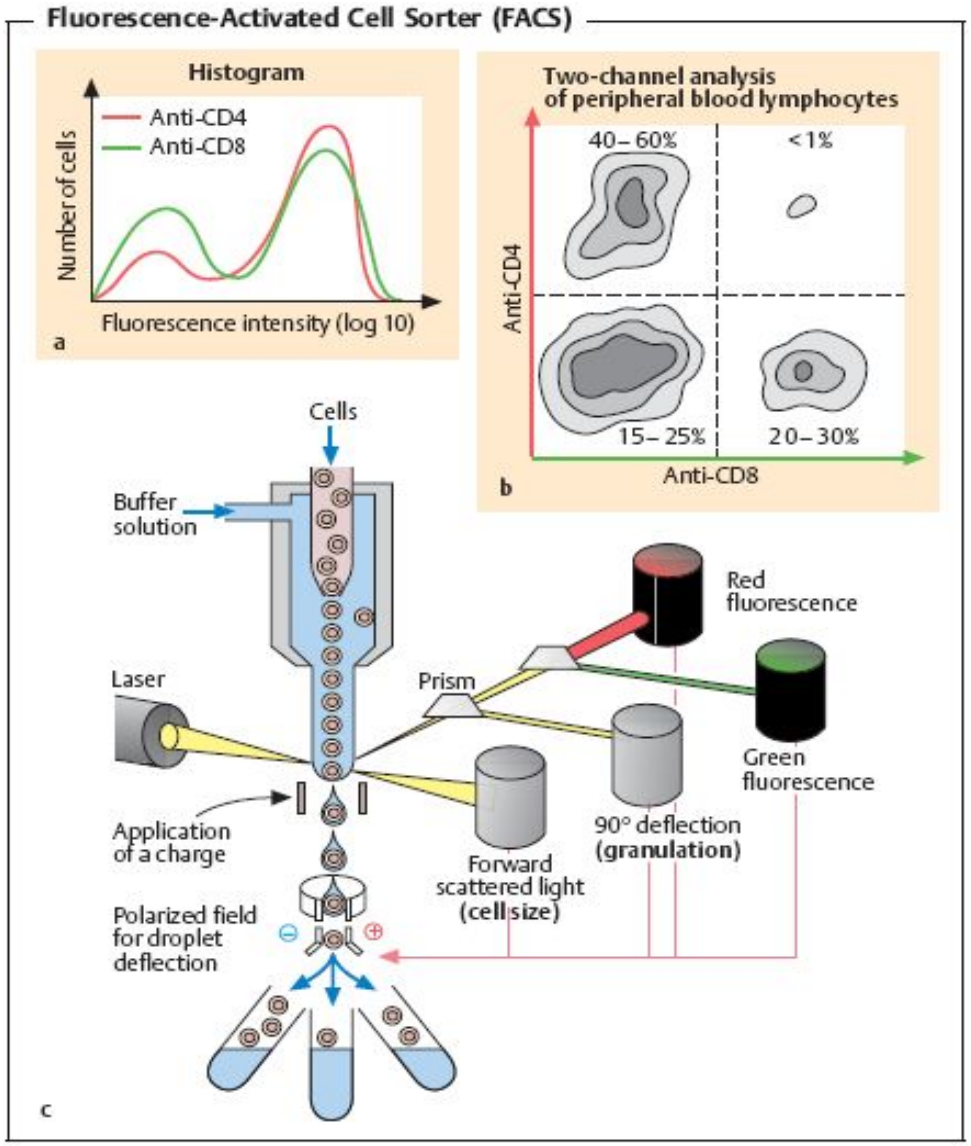
1. Подсчет и анализ клеточных элементов, редко встречающихся в популяции (стволовых клеток)
2. Исследование распределения клеток по стадиям клеточного цикла
3. Изучение анеуплоидных клеток, особенно в случаях, когда это затруднительно при помощи кариологического анализа (низкий уровень пролиферации или клетки находятся в стадии $G_{0)}$
4. Количественная оценка экспрессии антигена
5. Выявление клеток по наличию 2,3 и более иммунологических маркеров
6. Прижизненный анализ и сортировка клеток
7. Быстрый анализ динамики протекания клеточных процессов в гетерогенных популяциях
8. Возможность препаративной сортировки, в том числе стерильной, для последующей работы с живыми клетками

Проточная цитометрия



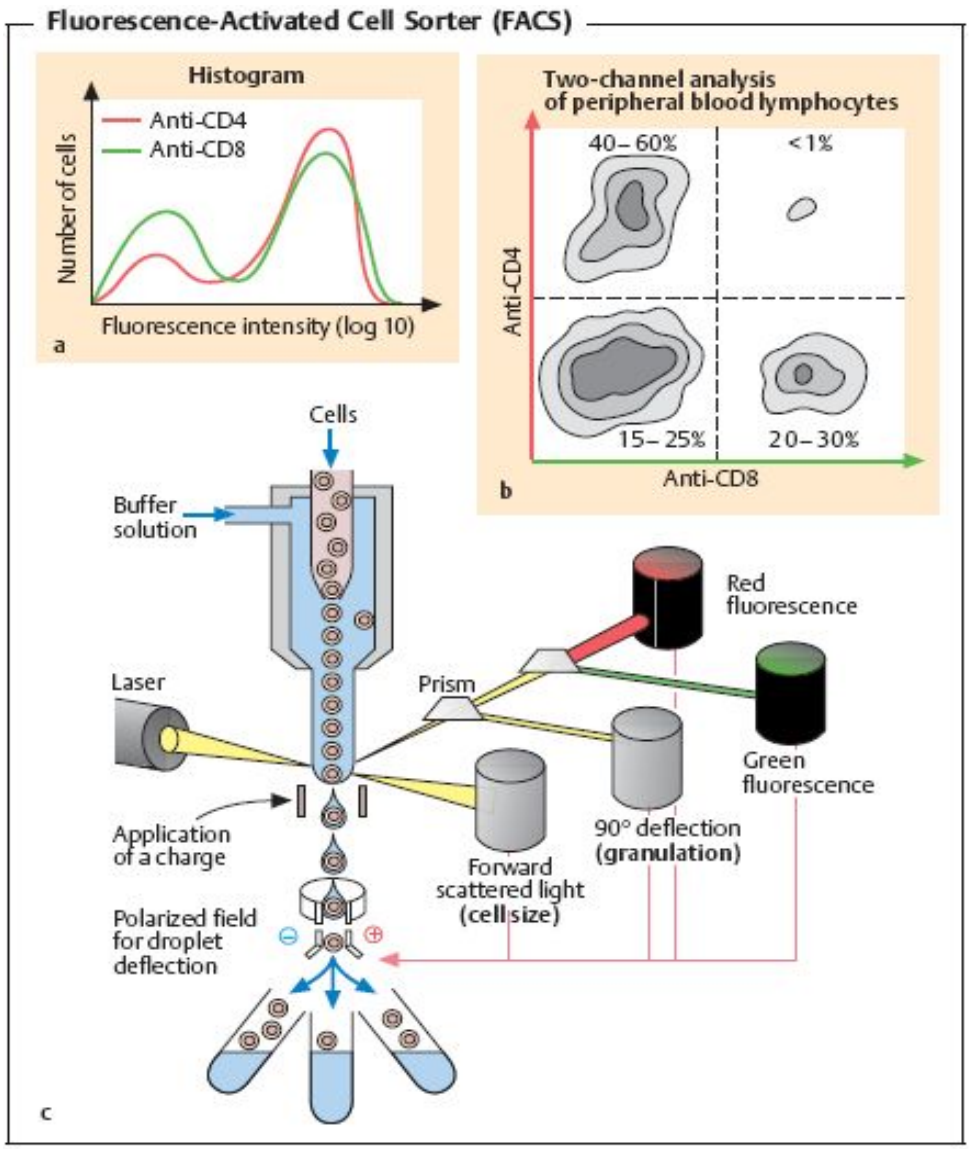
1. Быстрое пропускание суспензии клеток через зону чувствительности прибора (до 30м/с с регистрацией 1000 кл/с)
2. Гистограмма составляется (установление шкалы интенсивности по оси абсцисс по оси ординат – число клеток с данным значением измеряемого параметра)
3. При измерении 2-х параметров данные представляются в виде графика в двухмерной системе координат.

Измерение клеток - методы



- **Кондуктометрия** – капилляр диаметром 70 мкм и длиной 0,75 диаметра, с большой скоростью пропускается суспензия клеток. По обе стороны от капилляра – электроды, между которыми постоянный ток. Электрическое сопротивление клетки выше чем электролита
- **Радиочастотный анализ** (RF –radio frequency) разновидность кондуктометрического метода на гематологических анализаторах

Измерение клеток - методы



- **Регистрация светорассеяния и поглощения.** Светорассеяние обусловлено клеточным размером, формой, плотностью, окрашиванием и гранулярностью внутриклеточных структур.
- Рассеянный свет от клеток и частиц состоит из дифракционных, рефракционных и рассеивающих компонентов.

Измерение клеток - методы

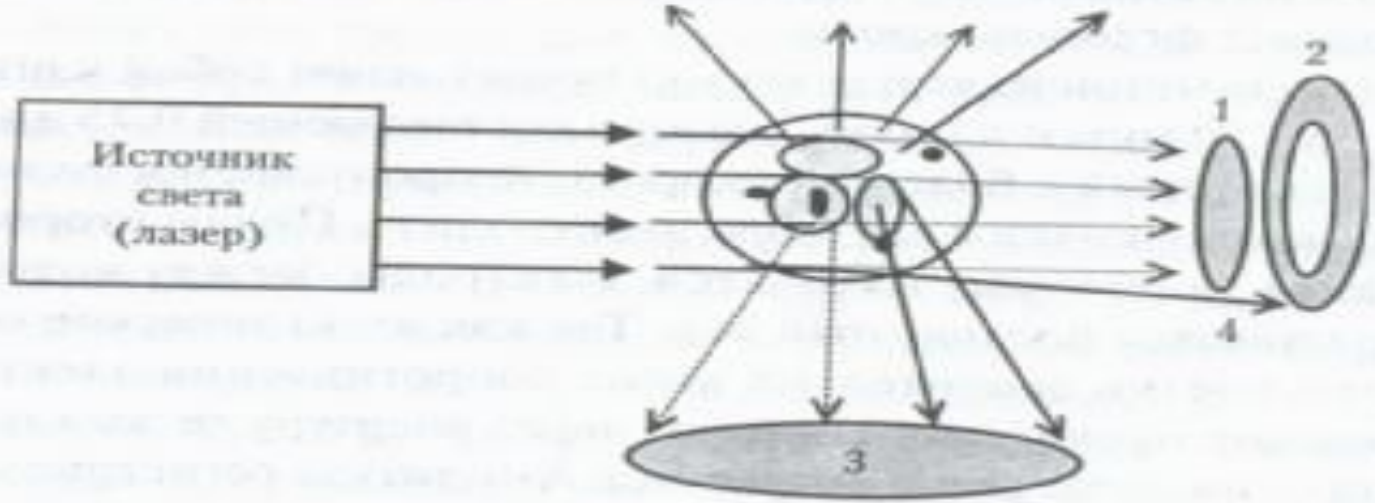
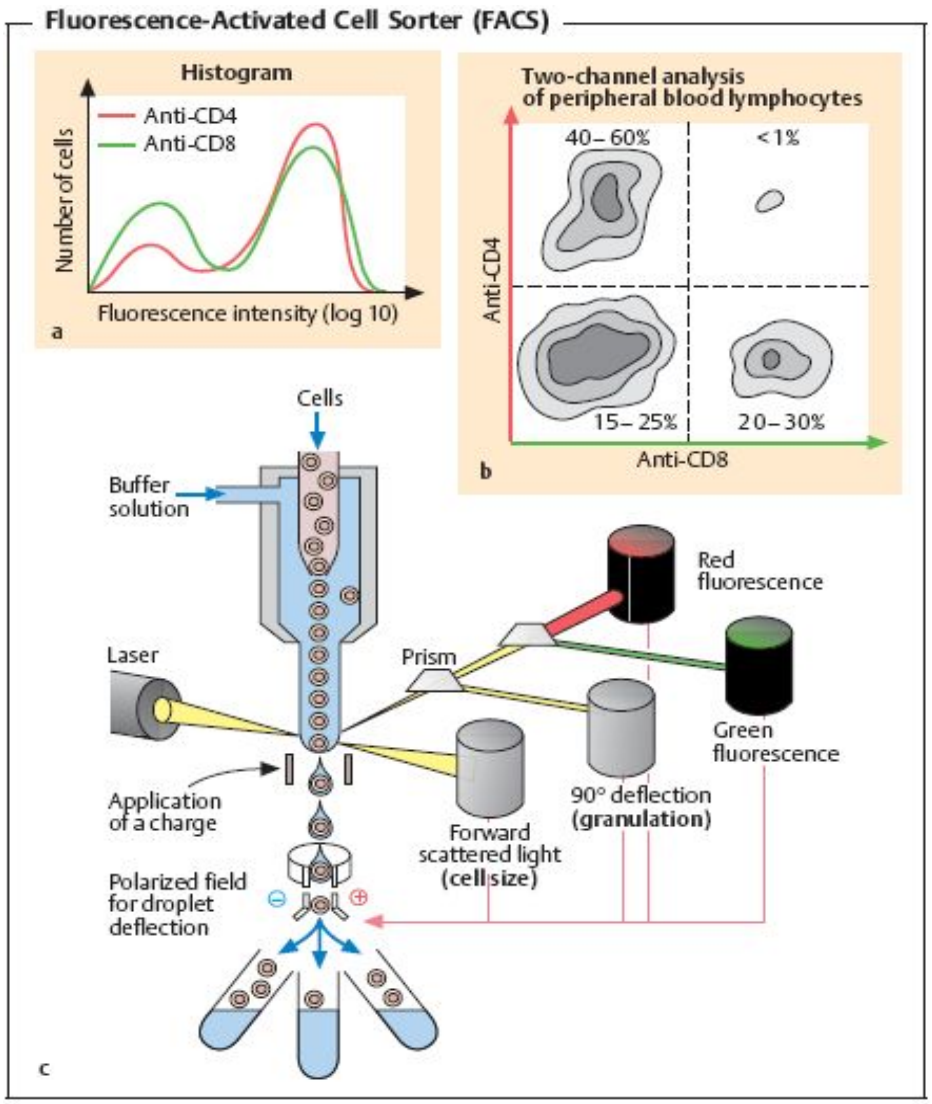


Рис. 1.1. Схема взаимодействия луча света с клеткой и регистрации оптических сигналов при проточной цитометрии:

1 — регистрация поглощения света (содержание адсорбционных красителей); 2 — детекция сигналов светорассеяния под углом 0,5–5°, по которым оцениваются размеры размеры клетки; 3 — регистрация флуоресценции (пунктирные линии) и светорассеяния под углом 90° (сплошные линии); последний параметр отражает размеры ядра и структурированность цитоплазмы клетки; 4 — луч света, рассеянный под малым углом (см. пункт 2)

Измерение клеток - методы

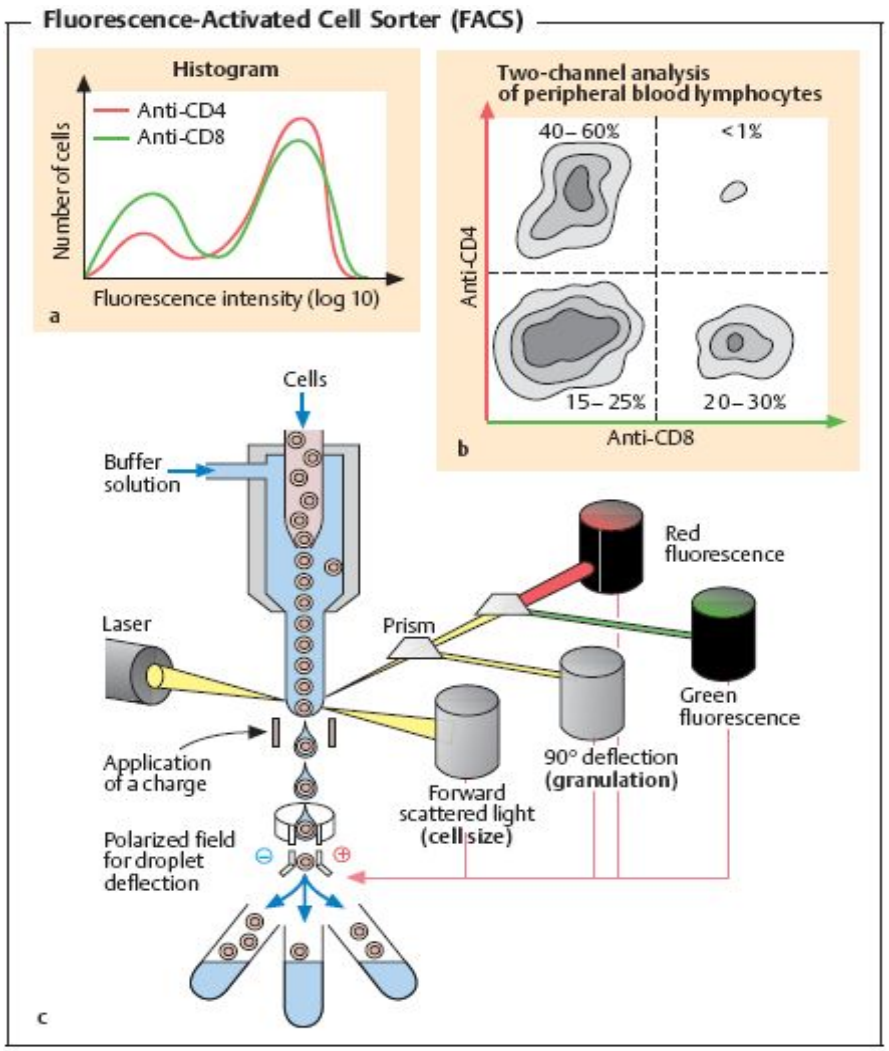


- **Флуориметрия -** измерение флюоресценции красителей, связанных с избирательными клеточными структурами.
- Регистрация флуоресценции имеет преимущества:
- Флуоресцентное излучение прямо пропорционально специфическим клеточным компонентам
- Концентрация красителя для исследования клетки очень низкая, что минимально сказывается на жизнеспособности объекта
- Нефлуоресцирующие соединения могут становиться флуоресцирующими при взаимодействии с внутриклеточными структурами или ферментами

Измерение клеток - методы

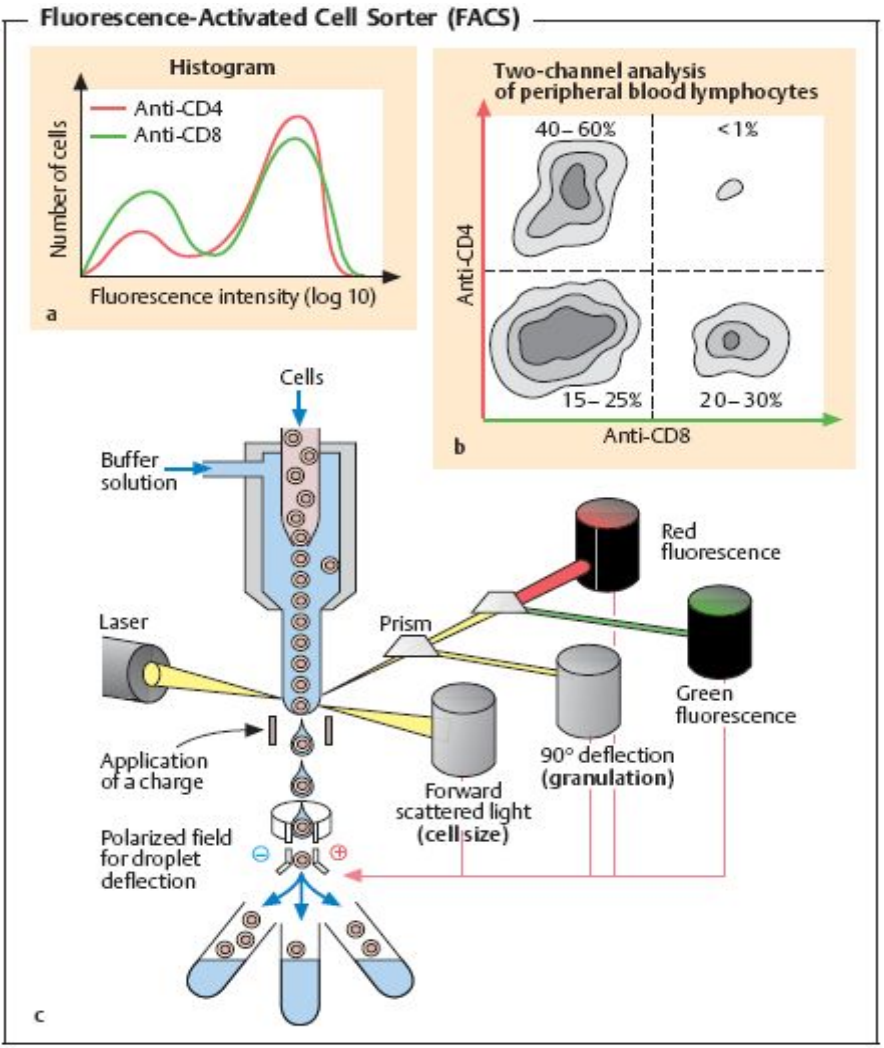
- **Многоцветный анализ – одновременное использование нескольких флуоресцентных меток разного цвета. Преимущества:**
- **Экономия времени, расходных материалов и исследуемых клеток**
- **Повышение чувствительности и информативности анализа**
- **Снижение цены реактивов**

Измерение клеток - методы



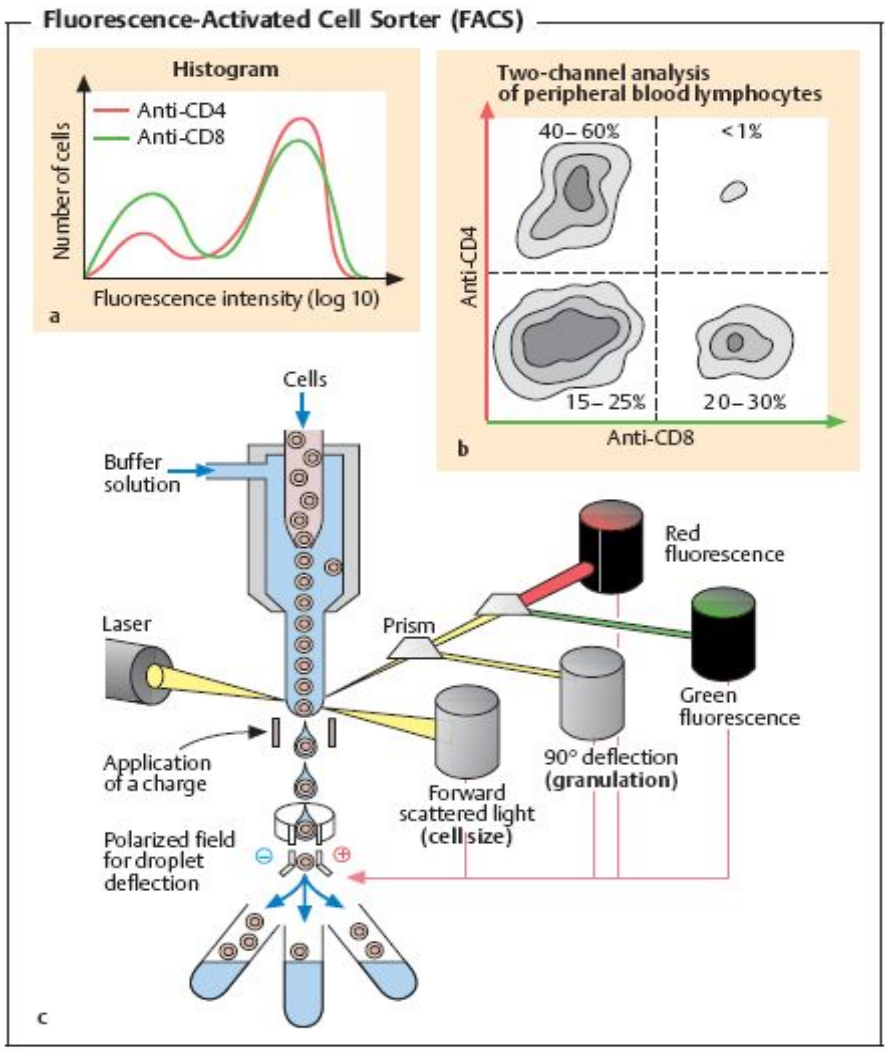
- **Изучение поляризации флуоресценции позволяет охарактеризовать вязкость или текучесть мембран, которое отражает функциональное состояние клетки.**
- **При поляризации лазерного излучения флуоресцирующие молекулы излучают поляризованный свет.**

Измерение клеток - методы



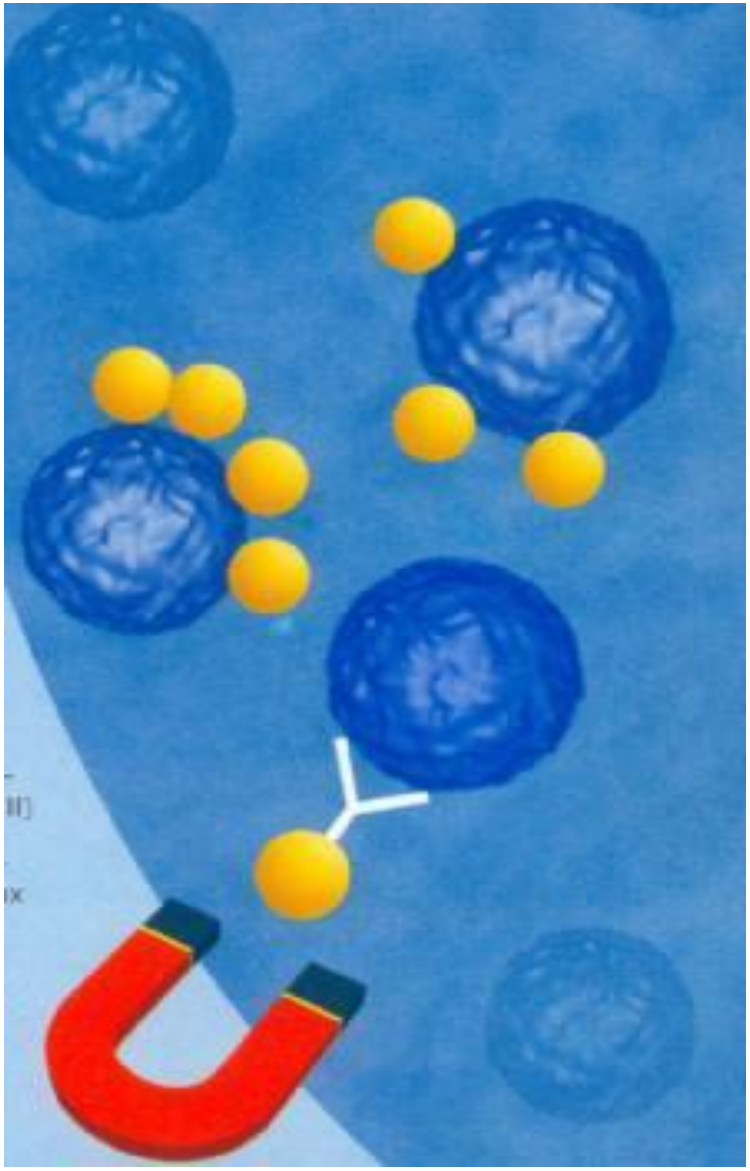
- **Анализ сигнала волновой формы (анализ формы сигнала) можно использовать для измерения ядерного и цитоплазматического диаметра. Применяется «щелевой анализ» - лазерный луч фокусируют до 1 мкм, а измеряемые клетки пересекают его с постоянной скоростью.**

Измерение клеток - методы



- **Сортировка клеток** служит для клонирования клеток а также для получения чистых суспензий клеток для последующего анализа при помощи других методов (морфологических, электронно-микроскопических, генно-инженерных и др.).

Иммуномагнитная сепарация клеток



- Негативное и позитивное выделение Т-, В-, NK– клеток и моноцитов
- Выделение CD34 стволовых клеток
- Системы снятия частиц/антител с выделенных клеток
- Чистота выделенных фракций до 99% при выходе целевых клеток >95%
- Выделение клеточных популяций из цельной крови, костного мозга, других биологических жидкостей
- Сохранение жизнеспособности и функциональных свойств клеток
- Выделение HLA-клеток для серологического типирования (класс I, класс II)
- Выделение миелоидных (CD15), эндотелиальных (CD30), пролиферирующих (CD71) клеток