***Занятие 9***

Приобретенный (специфический) иммунитет, его виды. Антигены, их виды. Антигенная структура микробной клетки. Понятие об иммунной системе. Иммунокомпетентные клетки. Реакция иммунного ответа. Антитела. Серологические реакции.

**Специфический иммунитет**

* Специфический иммунитет формируется у человека при контакте иммунной системы с возбудителем или антигеном
* Специфическая защита, сформированная против какого-либо антигена, не может защитить организм от других антигенов.

**Антигены.** Наибольшей антигенностью обладают биополимеры белковой природы. Способностью в достаточной мере активировать иммунную сис­тему помимо белков обладают и полисахариды, ЛПС, гликопротеиды, липопротеиды, и их сополимеры.

**Свойства антигенов**.

* **Чужеродность** является обязательным усло­вием. Чем дальше в филогенетическом раз­витии организмы отстоят друг от друга, тем большей чужеродностью обладают их антигены по отношению друг к другу.
* Вместе с тем антигенные детерминанты даже генетически неродственных животных или структурно различных биополимеров могут иметь определенное подобие. В этом случае их антигены оказываются способными специфически взаимодействовать с одними и теми же факторами иммунитета. Такие антигены получили название ***перекрестно реагирующих***.
* Явление, когда один микроб маскируется антигенами другого микроба или макроорганизма для «защиты» от факторов иммунитета, получило название ***антигенная мимикрия.***

**По степени чужеродности различают: ксено-, ал­ло- и изоантигены**.

* ***Ксеногенные антигены (гетерологичные)*** – общие для организмов, относящихся к разным родам и видам. ***Аллогенные антигены (групповые)*** – общие для генетически неродственных орга­низмов, но относящихся к одному виду. На основании аллоантигенов общую популяцию организмов можно подразделить на отдельные группы. Аллогенные ткани при трансплантации иммунологически несов­местимы – они отторгаются или лизируются реципиентом.
* ***Изогенные антигены (индивидуаль­ные)*** – общие только для генетически иден­тичных организмов, н-р для однояйцевых близнецов, инбредных линий животных. Примером таких антигенов в популяции лю­дей являются антигены гистосовместимости, а у бактерий – типовые антигены.

**Свойства антигенов.**

* **Антигенностъ** характеризует потенциаль­ную способность молекулы антигена акти­вировать компоненты иммунной системы и специфически взаимодействовать с фактора­ми иммунитета (антитела, клон эффекторных лимфоцитов).
* Компоненты иммунной системы взаимодействуют не со всей молекулой антигена одновременно, а только с ее не­большим участком, который получил название *«антигенная детерминанта»,* или *«эпитоп».* Антигены индуцируют синтез антител, способных связаться с ними
* В струк­туре большинства антигенов определяется множество антигенных де­терминант, которые распознаются разными по специфичности антителами и клонами лимфоцитов (такие антигены являются мультивалентными).

**Свойства антигенов.**

* **Иммуногенность** – потенциальная способность антигена вызывать по отношению к себе в макроорганизме специфическую защитную реакцию. Степень иммуногенности зависит от ряда факторов - молекулярных особенностей антигена и реактивности макроорганизма. Существуют некоторые различия между понятиями антигенности и иммуногенности. Например, возбудители бактериальной дизентерии обладают высокой антигенностью, но формируемый после заболевания иммунитет не достаточно активен, иными словами, они обладают слабой иммуногенностью.

**Гаптены.** *Гаптены* или неполные антигены, не способны индуцировать в организме иммунный ответ, так как обладают крайне низкой иммуногенностью. Однако свойство антигенности они не утратили, что позволяет им специфически взаимодейс­твовать с уже готовыми факторами иммунитета (антителами, лимфоцитами). Чаще всего гаптенами являются низкомолекулярные соединения. Гаптены вызывают иммунный ответ только после соединения с белком или с другим полимером-носителем

* **Специфичностью** называют способность антигена индуцировать иммунный ответ к строго определенному эпитопу. Взаимодействие антител и антигенов отличает высокая специфичность, основанная на способности антител связываться со строго определенной антигенной детерминантой. Это свойство обусловлено комплементарностью рецепторного аппарата иммунокомпетентных клеток к конкретной антигенной детерминанте. Поэтому специфичность антигена во многом определяется свойствами составляющих его эпитопов. Сила специфического взаимодействия антитела с антигеном (или энергия их связи) называется *аффинностью*

***Иммуногены*** при попадании в организм спо­собны индуцировать продуктивную реакцию иммунной системы, которая заканчивается выработкой факторов иммунитета (антите­л, антигенреактивных клонов лимфоци­тов).

* *- Т-зависимые*
* *- Т-независимые*

***Толероген*** является полной противополож­ностью иммуногену. Толерогену присуща мономер­ность, низкая молекулярная масса, высокая эпитопная плотность и высокая дисперсность (безагрегатность) коллоидных растворов.

***Аллерген* -** формирует патологическую реакцию организ­ма в виде гиперчувствительности немедлен­ного или замедленного типа.

***Суперантигены -*** вещества, в основном, микробного происхождения, которые могут неспецифически вызывать поликлональную реак­цию. Молекула суперантигена самостоятельно связы­вается с межклеточным комплексом «антиген гистосовместимости II класса – Т-клеточный рецептор» и формирует ложный сигнал распоз­навания чужеродной субстанции.

**Антигены. *Антиген* –** высокомолекулярное соединение, несущее признаки генетической чужеродности, которое при попадании в организм способно вызвать развитие иммунных реакций.Антигенами являются компоненты и продукты жизнедеятельности микробов, организмов животных и растений. Антигены могут образовываться в собственном организме при структурных изменениях молекул, их можно получить искусственно.

**Антигены микроорганизмов.**

**Антигены бактерий**

* *Жгутиковый, или Н-антиген,*
* *Соматический, или О- антиген,*
* *Капсульный* , или *К- антиген,*
* *Антиген вирулентнос­ти, или Vi-антиген,*
* *Экзотоксины, ферменты*

**Антигены вирусов**

* *вирусоспе­цифические*

**Антигены организма человека.**

* *Эритроцитарные антигены*
* *антигены системы АBО*
* *резус-антигены*
* *Главный ком­плекс гистосовместимости, или МНС (аббр. от англ. Маin Hystocompatibility Complex, Humаn Lеuкоcytе Аntigеn* - HLА)
* Различают два основных класса молекул МНС.
* МНС I класса экспрессируются на поверхности практически всех клеток, кроме эритроцитов (в безъядерных клетках отсутс­твует биосинтез) и клеток ворсинчатого трофобласта («профилактика» отторжения пло­да).
* МНС II класса экспрессируются на цитоплазматичес­кой мембране особой группы клеток, которая получила название антигенпрезентирующих клеток (АПК).

**Антигены гистосовместимости.** Антигены гистосовместимости обнаружива­ются на цитоплазматических мембранах практи­чески всех клеток макроорганизма. Большая часть из них относится к системе главного ком­плекса гистосовместимости, или МНС (аббр. от англ. *Маin Hystocompatibility Complex*).

**MHC.**

* У человека МНС был ассоциирован с лейкоци­тами, поэтому его обозначи­ли как HLА (аббр. от англ. *Human Leukocyte Antigen).* Биосинтез HLA определяется генами, локализованными сразу в нескольких локусах короткого плеча 6-й хромосомы.
* Гены HLА-А, HLА-B и HLА-C кодируют белки **MHC I класса** Некоторые HLА-D локусы кодируют белки **MHC II класса** (DP, DQ DR)
* Между локусами I и II классов располагается III локус. К **МНС ΙΙΙ** класса относят­ся некоторые компоненты комплемента (С2, С4), белки теплового шока, факторы некроза опухоли и др.
* Каждый человек строго уникален по набору антигенов гистосовместимости, исключение составляют только однояйцевые близнецы, которые абсолютно похожи по набору генов.
* Антигены гистосовместимости играют ключевую роль в осуществлении специфичес­кого распознавания «свой-чужой» и индук­ции приобретенного иммунного ответа. Они определяют совместимость органов и тканей при трансплантации в пределах одного вида, генетическую рестрикцию (ограничение) им­мунного реагирования и другие эффекты.
* МНС I класса индуцирует преиму­щественно клеточный иммунный ответ, а МНС II класса – гуморальный.

**Особенности строения и функции MHC.**

* МНС имеет сложную структуру и высокую полиморфность. По химической природе анти­гены гистосовместимости представляют собой гликопротеиды, прочно связанные с цитоплаз­матической мембраной клеток.
* Их отдельные фрагменты имеют структурную гомологию с молекулами иммуноглобулинов и поэтому от­носятся к единому суперсемейству.

**MHC II класса.**

***МНС ΙΙ класса*** экспресси­руется на поверхности ограниченного числа клеток: дендритных, В-лимфоцитах, Т-хелперах, активированных макрофагах, тучных, эпителиальных и эндотелиальных клетках.

**В структуре и функции МНС II класса есть ряд принципиальных отличий от МНС I класса**

* МНС II участвует в индукции приобретенного им­мунного ответа. Фрагменты молекулы анти­гена экспрессируются на цитоплазматичес­кой мембране особой группы клеток, которая получила название антигенпрезентирующих клеток (АПК).
* МНС II класса включает в себя пептид, захваченный из внеклеточной среды путем эндоцитоза, а не синтезированный са­мой клеткой(н-р, внутриклеточные вирусы)

**Участие MHC II класса в индукции приобретенного им­мунного ответа п**роисходит следующим образом:

* Фрагменты молекулы анти­гена экспрессируются на цитоплазматичес­кой мембране антигенпрезентирующих клеток в виде комплекса ***молекула MHC II +антиген***
* МНС II класса с включенным в него пептидом вос­принимается и анализируется Т-хелперами (CD4+-лимфоциты).
* В случае принятия ре­шения о чужеродности включенного в МНС II класса пептида Т-хелпер начинает синтез соответствующих иммуноцитокинов, и вклю­чается механизм специфического иммунного реагирования.

**CD- антигены.**

* На мембране клеток обнаруживаются груп­повые антигены, объединяющие клетки, име­ющие сходные морфофункциональные харак­теристики или находящиеся на определенной стадии развития
* Эти маркерные молекулы получили название антигенов кластеров дифференцировки клетки, или ***CD-антигенов*** (аббр. от англ. **Cell Differentiation Antigens, или Claster Definition).** По структуре они пред­ставляют собой гликопротеиды, многие из которых относятся к суперсемейству имму­ноглобулинов.
* На­иболее широкое распространение получи­ли маркеры иммунокомпетентных клеток.

**Иммунная система организма**

Для защиты от чужеродных веществ и поддержания гомеостаза в организме существует сложная система защиты, получившая название ***иммунной системы*** - совокупности органов, лимфоидной ткани, а также отдельных клеток. Иммунная система эго специализирован­ная, анатомически обособленная ткань разбросанная по всему организму в виде различных лимфоидных образований и отдельных клеток. Наиболее важная функция иммунной системы – иммунитет: защита организма от генетически чужеродных веществ экзогенного и эндогенного происхождения. К свойствам иммунной системы также относятся специфичность, чувствительность, толерантность.

**Органы иммунной системы.**

* **Центральные органы иммунной системы** принимают участие в процессах антигеннезависимой дифференцировки и созревания клеток иммунной системы-костный мозг, тимус
* **Периферические органы иммунной системы** участвуют в антигензависимой дифференцировке лимфоцитов, презентации антигена и иммуногенезе Т- и В-лимфоцитов-селезенка, лимфатические узлы, лимфоидные фолликулы.

**Лимфоциты.**

В зависимости от места созревания в орга­низме, эти клетки подразделяются на две ге­терогенные популяции

* **B -** лимфоциты
* **Т –** лимфоциты
* Клетки без отличительных признаков Т- и В-лимфоцитов получили название нулевых клеток.
* **0 –** лимфоциты

**B-лимфоциты и плазмоциты.** Основой гуморального адаптивного иммунного ответа служит активация В-лимфоцитов и их дифференцировка в антителообразующие плазматические клетки. В-лимфоцит играет роль *антигенпредставляющей и антителообразующей клетки.* Участвуют в формировании иммунологической памяти. Участвуют в развитии реакций гиперчувствительности.

**T-лимфоциты.**

* Т- хелперы(CD4) распознают антиген, передают информацию от антигенпрезентирующих клеток иммунокомпетентным клеткам
* **Т-киллеры (CD8)** лизируют клетки-мишени, несущие чужеродные или видоизмененные аутоантигены
* **Т-супрессоры** регулируют интенсивность иммунного ответа, предотвращают развитие аутоиммунных реакций

**NК-клетки *(англ. «natural killer»- естественные киллеры).***

* Специализируются на уничтожении вирусинфицированных, опухолевых клеток, а также клеток с внутриклеточными паразитами
* Уничтожают клетки-мишени антителозависимой и антителонезависимой цитотоксичностью

**Иммуноглобулины, антитела.**

Синтез антител происходит в результате кооперации трех клеток - макрофагов, Th- и B-лимфоцитов. После процессинга фрагменты антигена выставляются на поверхности макрофагов в комплексе с белками MHC II класса. Эти молекулы связываются со специфическими рецепторами Th-клеток. Т-лимфоциты синтезируют цитокины - IL2 (фактор роста T-клеток), IL4 (фактор роста B-лимфоцитов) и IL5 (фактор дифференцировки B-лимфоцитов). Эти цитокины активируют антиген-специфические В-лимфоциты. Активированные В-лимфоциты размножаются, дифференцируются и превращаются в плазматические клетки, которые синтезируют иммуноглобулины (антитела).

Антитела относятся к g-глобулиновой фракции белков сыворотки крови. Молекула Ig состоит из 2 пар полипептидных цепей: двух ***Н-*** (от англ. *heavy* – тяжелый) и двух  ***L-*** (от англ. *light* – легкий) цепей, связанных между собой попарно дисульфидными связями (-S-S-). Молекулярный вес тяжелых цепей 50-70 кДа, молекулярный вес легких составляет 20-25 кДа. В составе легких и тяжелых цепей есть ***постоянные или С-домены***, и ***V-домены с переменной структурой.***

**Строение молекулы иммуноглобулина.** В составе легкой цепи есть по одному V- и С-домену, а в тяжелой – один V- и 3-4 С-домена. Примечательно, что не весь вариабельный домен изменчив по своему аминокислотному составу, а лишь его незначительная часть – *гипервариабельная область,* на долю которой приходится около 25 %. Вариабельные домены легкой и тяжелой цепи совместно образуют участок, который специфически связывается с антигеном. Это антигенсвязывающий центр молекулы Ig, или паратоп, который локализован в Fab-фрагменте *(от англ. «фрагмент, связывающийся с антигеном»)* молекулы Ig. Связь антигена с антителом осуществляется за счет слабых взаимодействий (ван-дер-ваальсовы силы, водородные связи, электростатические взаимодействия) в пределах антигенсвязывающего центра.

Фрагмент иммуноглобулинов, состоящий из С-доменов тяжелой и легкой цепи получил название ***Fc – фрагмента (от англ. «фрагмент кристаллизующийся»),*** так как способен образовывать кристаллы. Он ответственнен за связывание с рецепторами на мембране клеток макроорганизма (Fc-рецепторы) и некоторыми микробными суперантигенами. Получение отдельных фрагментов молекулы Ig возможно после их обработки протеолитическими ферментами.

**Класс иммуноглобулинов.** В зависимости от особенностей молекулярного строения тяжелой цепи различают *5 классов, или изотипов Ig.* Молекулы, содержащие тяжелую цепь α-типа, относят к изотипу А (сокращенно IgA); IgD обладает δ-цепью, IgE– ε-цепью, IgG– γ-цепью и IgM – μ-цепью. Соответственно особенностям строения подтипов тяжелых цепей различают и подклассы Ig. Некоторые иммуноглобулины могут иметь 4 подтипа: н-р, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4; IgА, IgM və IgD – имеют 2 подтипа.

**Разнообразие антител**.

* Нормальные или естественные антитела.
* Рецепторные иммуноглобулины
* Поликлональные антитела
* Моноклональные антитела получены Д. Келлером и Ц. Мильштейном (1975) путем слияния иммунных В-лимфоцитов с миеломной (опухолевой) клеткой. Полученные гибриды обладали специфическими свойствами антителопродуцента и «бессмертием» раковотрансформированной клетки.
* Неполные, или блокирующие антитела.

**Неполные, или блокирующие антитела.** Неполные АТ содержат один активный центр и поэтому одновалентны. Второй антигенсвязывающий центр у них экранирован различными структурами либо обладает низкой авидностью. Неполные антитела функционально дефектны, так как не способны агрегировать антигены. В связи с этим их еще называют *непреципитирующими* или *блокирующими* *антителами*. Выявить неполные антитела можно при помощи реакции Кумбса – путем использования «вторых», антииммуноглобулиновых антител.

**Динамика образования антител.**

* ***Первичный иммунный ответ***развивается после первичного попадания антигена. Через 4-5 дн. (иногда 7-10 дн.) в сыворотке крови обнаруживаются IgM, а затем – IgG, формируются Т-лимфоциты памяти.
* ***Вторичный иммунный ответ*** развивается при повторном введении антигена. Благодаря ранее образовавшимся лимфоцитам памяти практически отсутствует латентный период антителообразования. При вторичном иммунном ответе за счет лимфоцитов памяти значительно возрастает скорость образования, количество и сродство к антигену (аффиность).

**Получение гипериммунных сывороток.** Явление интенсивного антителообразования при повторном контакте с антигеном широко используется в практических целях, например при вакцинопрофилактике. Эффект иммунной памяти составляет основу вакцинопрофилактики многих инфекционных болезней. Для этого человека вакцинируют а затем (через определенный интервал времени) *ревакцинируют.*  Этот же феномен используют при получении высокоактивных лечебных и диагности­ческих иммунных сывороток *(гипериммунных).* Для этого животным или донорам производят многократные введения препаратов антигена по специальной схеме.

**Иммунодиагностика.** Особенности взаимодействия антитела с антигеном являются основой диагностических реакций в лабораториях. При попадании в организм антигенов, в сыворотке крови образуются специфические антитела. Эти антитела обладают способностью специфически связываться с антигенами не только в организме *(in vivo*), но и вне организма *(in vitro).* Специфичность взаимодействия между антителами и антигенами обуславливает возможность идентифицировать неизвестное антитело на основе известного антигена или наоборот. Иммунные реакции используют при диа­гностических и иммунологических исследованиях у больных и здоровых людей. С этой целью применяют *серологические методы* (от лат. *serum* – сыворотка и *logos –* учение), т. е. методы изучения антител и антигенов с помощью реакций антиген – антитело, определяемых в сыворотке крови и других жидкостях, а также тканях организма.

**Применение серологических реакций.**

* Серологические реакции можно проводить в двух направлениях:
* Для *идентификации антигенов микробов*, различных биологически активных веществ, групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, иммунных комплексов, рецепторов клеток и др.
* При выделении микроба от больного проводят идентификацию возбудителя путем изучения его антигенных свойств с помощью *иммунных диагностических сывороток*, т. е. сывороток крови гипериммунизированных животных, содержащих специфические антитела. Это так называемая *серологическая идентификация* микроорганизмов.

**Применение серологических реакций.** Для идентификации неизвестных антител в серологических реакциях используются известные антигены или микроорганизмы, т.е. *диагностикумы*. В качестве диагностикумов используются эталонные штаммы микроорганизмов или их антигены. Обнаружение в сыворотке крови больного антител против антигенов возбудителя позволяет поставить диагноз болезни (*серологическая диагностика*).

**Типы серологических реакций.**

Оценка результатов серологических реакций проводится на основании образования комплекса антиген-антитело. Реакции различаются по регистрируемому эффекту и технике постановки, однако, все они основаны на реакции взаимодействия антигена с антителом и применяются для выявления как антител, так и антигенов. Различают :

 - простые серологические реакции (с участием двух компонентов)

 - сложные серологические реакции (с участием трех и более компонентов).

* С целью иммунодиагностики широко применяются реакции *агглютинации*, *преципитации*, *нейтрализации*, *реакции* с *участием* *комплемента*, с *использованием* *меченых* *антител* и *антигенов* (радиоиммунологический, иммуноферментный, иммунофлюоресцентный методы).
* Реакции иммунитета характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью.

**Фазы серологических реакций.**

* Реакция *in vitro* между антигеном и антителом состоит из специфической и неспецифической фазы.
* В *специфическую фазу* происходит быстрое специфическое связывание активного центра антитела с детерминантой антигена.
* *Неспецифическая фаза* – более медленная, которая проявляется видимыми физическими явлениями, например образованием хлопьев (феномен агглютинации) или преципитата в виде помутнения. Эта фаза требует наличия определенных условий (электролитов, опти­мального pH среды).

Связывание детерминанты антигена (эпитопа) с активным центром Fab-фрагмента антител обусловлено вандерваальсовыми силами, водородными связями и гидрофобным взаимо­действием. Прочность и количество связавшегося антигена антителами зависят от аффинности, авидности и валентности антител.

**Реакция агглютинации и ее варианты (развернутая и ориентировочная). Реакция гемагглютинации (РГА). Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА). Реакция Кумбса.**

**Реакция иммобилизации подвижных бактерий. Реакция преципитации и ее варианты (кольцепреципитация, иммунодиффузия в геле, иммуноэлектрофорез). Реакция нейтрализации токсина (РНТ). Реакция радиальной иммунодиффузии (РИД).**

***Реакция агглютинации.*** Реакция агглютинации – РА (от лат. ***agglutinatio –*** склеивание) –связывание антителами корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов или других клеток, нерастворимых частиц с адсорбированными на них антигенами, а также макромолекулярных агрегатов). Антитела, способствующие связыванию антигенов называют агглютининами, клетки микробов участвующих в РА – агглютиногенами.

Реакции агглютинации используют для определения антител в сыворотке крови больных при помощи известных антигенов и определения возбудителя при помощи известных антител.

* ***Серологическая идентификация микроорганизмов*** выделенных от больного проводится с помощью иммунных диагностических сывороток, содержащих специфические антитела.
* С целью обнаружения ***в сыворотке крови специфических антител*** используются реакции Райта, Хеддельсона, Видаля и пр.

**Варианты реакций агглютинации.**

Существует несколько вариантов реакции агглютинации:

* **ориентировочная,**
* **развернутая,**
* **непрямая и др.**

**Ориентировочная реакция агглютинации.** Обычно проводится с целью серологической идентификации микробов. На предметном стекле смешивают каплю диагностической агглютинирующей сыворотки и каплю исследуемого микроба. При положительной реакции через несколько минут в капле с сывороткой и микробом появляются хлопья

**О- и H-агглютинация.** В зависимости от антигенных свойств бактерий существуют несколько видов агглютинации:

* **О-агглютинация -** бактерии агглютинируются посредством соматического антигена, при этом образуются мелкие компактные зерна
* **Н-агглютинация –** бактерии склеиваются друг с другом через жгутики (Н-антиген), при этом образуются рыхлые хлопья

**Получение адсорбированных агглютинирующих сывороток.**

Разные родственные бактерии могут агглютинироваться одной и той же диагностической агглютинирующей сывороткой, что затрудняет их идентификацию. Поэтому пользуются *адсорбированными агглютинирующими сыворотками,* из которых удалены перекрестно реагирующие антитела путем адсорбции их родственными бактериями. В таких сыво­ротках сохраняются антитела, специфичные только к данной бактерии. Получение таким способом *монорецепторных диагностических агглютинирующих сывороток* было предло­жено А. Кастелляни (1902).

Ориентировочная реакция агглютинации используется также для получения ориентировочных результатов в серологической диагностике. Для этого сыворотку пациента смешивают на предметном стекле с соответствующим диагностикумом. При положительной агглютинации, проводится развернутая реакция для определения титра антител.

**Развернутая реакция агглютинации.** Проводится для определения титра антител в сыворотке больного. Для этого готовят двухкратные серийные разведения сыворотки больного - 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, затем в каждую пробирку вносят суспензию диагностикума, и культивируют при 370C в течение 2 часов, далее при комнатной температуре 16-18ч

**Ингредиенты и оборудование, необходимые для постановки развернутой реакции агглютинации.**

* Исследуемая сыворотка крови
* Культура микроба или диагностикум (корпускулярный антиген)
* Физиологический раствор
* Пипетки
* Пробирки в штативе

**Получение сыворотки для реакции агглютинации.** Для проведения теста обычно берут кровь взятую стерильно из локтевой вены или из пальца 1-2 мл или пальце. Для отделения сыворотки кровь выдерживают в пробирках в термостате в течение 1 часа 10-15 минут, чтобы она хорошо свернулась. Свернувшуюся кровь отделяют от стенки пробирки острым концом пастеровской пипетки, затем флаконы выдерживают в холодильнике до полного отделения сыворотки от крови, сыворотку отсасывают стерильной пипеткой и переливают в еще одну пробирку. Если сыворотка мутная, ее следует центрифугировать.

**Приготовление диагностикума.** Микробную эмульсию (антиген) для реакции агглютинации получают промыванием 18-24-часовой агаровой культуры физиологическим раствором. Чаще для РА используют ***готовые диагностикумы.***Для промывания культуры в пробирку стерильной пипеткой добавляют физиологический раствор в количестве, достаточном для покрытия боковой поверхности агара. После замачивания культуры пробирку вращают между двумя руками, чтобы промыть культуру.
Пробирку выдерживают некоторое время, затем эмульсию пипеткой переносят в чистую пробирку.

**Разведение сыворотки крови.** Перед постановкой реакции готовят исходное разведение испытуемой сыворотки. В отдельной пробирке смешивают 0,2 мл сыворотки с 1,8 мл физиологического раствора, таким образом получают рабочее разведение сыворотки в соотношении 1:10.

**Проведение развернутой реакции агглютинации.** Реакцию проводят в пробирках или в планшетах. В каждую из пробирок добавляют 1 мл физиологического раствора. Затем 1 мл рабочего разведения сыворотки добавляют в 1-ю пробирку, смешивают, берут 1 мл и переносят во 2-ю пробирку, со 2-ой в 3-ю, с 3-ей в 4-ую и т. д. Из последней же пробирки удаляется 1 мл. Таким образом, получают 1:20, 1:40, 1:80, 1: 160, 1: 320 и т.д. разведения сыворотки крови. В качестве контроля сыворотки в предпоследнюю пробирку вносят только 1 мл исходного разведения сыворотки. В последнюю пробирку помещают контроль антигена – к раствору хлорида натрия добавляют суспензию микробов

**Учет результатов.** При постановке реакции агглютинации в пробирке учет результатов проводят по 4-крестовой системе:

* **(++++) - полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями;**
* **(+++) - почти полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями;**
* **(++) - агглютинат неотчетливо выражен на фоне мутной жидкости;**
* **(+) - незначительное количество агглютината на фоне мутной жидкости**
* **Отсутствие агглютината соответствует отрицательному результату**

**Титр реакции агглютинации.** Если в опытных пробирках наблюдается явная (++) агглютинация при отсутствии агглютинации в контрольных пробирках, реакция считается положительной. Наибольшее разведение сыворотки крови, дающее агглютинацию считают *титром реакции агглютинации*Определение титра реакции имеет важное значение при диагностике. Из за того, что нормальные антитела сыворотки могут вызывать реакцию агглютинации даже в небольших разведениях, необходимо определение «диагностического титра» реакции для каждой болезни. Таким образом *диагностический титр* – это наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается положительная реакция

**Реакция пассивной гемагглютинации.** Основана на использовании эритроцитов или латекса с адсорбированными на их поверхности антигенами или антителами, взаимодействие которых с соответствующими антителами или антигенами вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка («зонтика»). При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговки». Обычно в РНГА выявляют антитела с помощью антигенного эритроцитарного диагностикума, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами.

**Техника реакции пассивной гемагглютинации.** Обычно в РНГА выявляют антитела с помощью антигенного *эритроцитарного диагностикума*, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенамию. В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных разведений сыворотки больного. В предпоследнюю лунку планшета добавляют 0,5 мл положительной сыворотки, в последнюю - 0,5 мл физиологического раствора (контроль). Затем во все лунки добавляют 0,1 мл эритроцитарного диагностикума, перемешивают и выдерживают смесь в термостате в течение 2 часов. *При положительном результате* эритроциты агглютинируются и выпадают в осадок в виде перевернутого зонтика, *при отрицательном результате*  эритроциты скапливаются в центре лунки, образуя пуговку.

**Реакция гемагглютинации.** Реакция гемагглютинации– реакция склеивания эритроцитов, бывает серологической и не серологической.

* *Серологическая реакция гемагглютинации* – основана на взаимодействии антигенов эритроцитов (гемагглютиногенов) с антителами в сыворотке крови (гемагглютининами) и используется для определения групп крови.
* *Не серологическая реакция гемагглютинации* основана на способности антигенов некоторых вирусов (гемагглютининов) агглютинировать эритроциты различных животных и используется при индикации (обнаружении) вирусов.

**Техника несерологической реакции гемагглютинации.** Реакцию ставят в лунках плексигласового планшета. В лунки вносят двухкратные разведения вируссодержащего материала (аллантоисная жидкость куриного эмбриона). В качестве контроля в отдельную лунку добавляют 0,5 мл аллантоисной жидкости, взятой из неинфицированного куриного эмбриона. Затем к каждому разведению добавляют 0,5 мл 1% суспензии куриных эритроцитов. Результат реакции регистрируют через 40 минут после оседания эритроцитов в контрольной лунке.

* *При положительной реакции* осадок эритроцитов зернистый и располагается на дне лунки в виде зонтика, *при отрицательной реакции* осадок плотный, округлой формы в виде пуговки.
* В контрольной лунке гемагглютинация отсутствует

**Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).** РТГА применяют для диагностики многих вирусных болезней, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита и др.) могут агглютинировать эритроциты различных животных. Для определения вида и типа вирусов в исследуемом материале, добавляют сыворотки, содержащие антитела к определенным вирусам. При подавлении ан­тигенов вирусов антителами иммунной сыворотки, вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты, происходит реакция *реакция торможения гемагглютинации*

**Реакция Кумбса.** Определение *неполных антител* в сыворотке крови имеет диагностическое значение при некоторых инфекциях . Неполные антитела имеют один активный центр, и при связывании их с антигеном, образованный иммунный комплекс невозможно наблюдать. Причиной этого явления может быть экранирование одного из антигенсвязывающих центров мономерной молекулы Ig, а также недостаточное число или малая доступность антигенных детерминант на молекуле антигена. В связи с этим их еще называют непреципитирующими или блокирующими антителами. Выявить неполные антитела можно при помощи *реакции Кумбса* – путем использования «вторых», антииммуноглобулиновых антител. Для постановки реакции необходима антиглобулиновая сыворотка, содержащая полные АТ. Неполные антитела предварительно инкубируют с корпускулярным антигеном и вносят антиглобулиновую сыворотку. При наличии в исследуемой сыворотке крови соответствующих антител, они связываются с диагностикумом, образуя при этом комплекс антиген-антитело. Одна молекула полных антител связывается с двумя молекулами неполных АТ, связавших антиген, в результате происходит видимая агглютинация.

Реакция Кумбса также применяется при **диагностике резус-конфликта,** так как против резус-антигенов образуются неполные антитела

* Резус-конфликт — это гуморальный иммунный ответ резус-отрицательной   матери на эритроцитарные антигены резус-положительного плода, при котором у матери образуются антирезусные антитела. При попадании в кровь ребёнка через плаценту эти антитела матери вызывают гемолиз эритроцитов плода, что приводит к развитию гемолитической болезни
* Для обнаружения антирезусных антител к сыворотке матери добавляют резус-положительные эритроциты и антиглобулиновую сыворотку (антитела к человеческим иммуноглобулинам). Если реакция положительная, наблюдается агглютинация эритроцитов

**Реакция иммобилизации подвижных бактерий.** Способность иммунных сывороток вызывать иммобилизацию подвижных бактерий связано с наличием специфических антител, которые проявляют свое действие в присутствии комплемента. Иммобилизирующие антитела обнаружены при сифилисе, холере и некоторых других инфекционных заболеваниях. Это послужило основанием для разработки реакции иммобилизации трепонем, которая по своей чувствительности и специфичности превосходит другие серологические реакции, используемые при лабораторной диагностике сифилиса.

**Реакция иммобилизации возбудителя сифилиса**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ингредиенты** **(ml)** | **опыт** | **Контроль ингредиентов** |
| Номер пробирок |
| 1опыт | 2 контроль | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| **Инактивированная исследуемая сыворотка** | 0,05 | 0,05 |   |   |   |   |   |   |   |
| **Активированный комплемент** | 0,15 |   | 0,15 |   | 0,15 |   | 0,15 |   |   |
| **Инактивированный комплемент** |   | 0,15 |   | 0,15 |   | 0,15 |   | 0,15 |   |
| **Антиген**  | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 |
| **Инактивированная положительная сыворотка** |   |   | 0,05 | 0,05 |   |   |   |   |   |
| **Инактивированная отрицательная сыворотка** |   |   |   |   | 0,05 | 0,05 |   |   |   |

**Реакция преципитации.** При связывании корпускулярных антигенов с антителами происходит агглютинация. При связывании растворимых антигенов (*преципитиногенов*) со специфическими антителами (*преципитинами*) наблюдается *реакция преципитации.*

*Реакция преципитации* – РП (от лат. *praecipito* – осаждать) – это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого преципитатом. Он образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах; избыток одного из них снижает уровень образования иммунного комплекса.

Реакции преципитации которые ставят ***в жидких средах*** проявляются в виде мути, ***в плотных средах*** (в гелях, пита­тельных средах) реакция проявляется в виде полос преципитации. В соответствии с этим существуют разные варианты реакции

Реакцию про­водят в узких преципитационных пробирках с иммунной сывороткой, на которую наслаивают растворимый антиген. При положительном результате на границе этих двух растворов образуется непрозрачное ***кольцо преципитата.*** Для образования реакции преципитации главным условием является то, что антиген и иммунная сыворотка не должны смешиваться. В противном случае возникает диффузное помутнение. В качестве примера кольцепреципитации проводят реакцию термопреципитации ***по Асколи*** (при сибирской язве).

**Постановка реакции кольцепреципитации.** При постановке реакции в пробирку с малым диаметром наливают 0,2 мл преципитирующей сыворотки, затем пастеровской пипеткой осторожно наслаивают на сыворотку 0,2 мл растворенного антигена так, чтобы он не смешивался с сывороткой. К иммунной сыворотке в контрольной пробирке добавляют соответствующее количество физраствора. Пробирки аккуратно помещают в штатив в вертикальном положении, не смешивая при этом жидкости. В зависимости от типов антигенов и антител, результаты реакции учитываются через 5-10 минут, 1-2 часа или 20-24 часа. При положительной реакции на границе сыворотки и исследуемого антигена в пробирке образуется белое кольцо преципитата.

**Реакция преципитации в агаре (геле).** Реакцию проводят в твердой фазе, представляющей собой агар или гель. Антиген и антитело диффундируют в плотную среду навстречу друг к другу, и на месте их встречи образуются полосы преципитата. Широкое распространение получили разновидности реакции преци­питации в геле агара или агарозе: *двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез* и др.

**Двойная иммунодиффузия по Оухтерлони.** Реакцию ставят в геле на стеклах или чашках Петри. В слое геля вырезают лунки, в которые раздельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу. В месте встречи компонентов реакции в эквива­лентных соотношениях образуется преципитат в виде белой полосы

**Определение токсигенности возбудителя дифтерии с помощью реакции преципитации в геле.** Токсигенность штаммов возбудителей дифтерии, выделенных от больных, определяют с помощью *метода Элека.* Для этого полоску стерильной фильтровальной бумаги, пропитанную противодифтерийной антитоксической сывороткой, помещают на поверхность питательной среды в чашке Петри. Исследуемые культуры инокулируют на расстоянии 1 см от края бумажной полоски. Таким способом можно инокулировать от 3 до 10 культур в одной чашке. В качестве контроля используется нетоксигенная культура. Чашки инкубируют в термостате при 37 ° С в течение 24-48-72 часов. Если культура выделяет токсин, вокруг нее на некотором расстоянии от бумажной полоски образуются специфические линии преципитации

**Реакция радиальной иммунодиффузии.** Иммунную сыворотку смешивают с расплавленным и охлажденным до 40 ° С агаром. Агар наливают на стеклянную пластинку, и после затвердевания в нем вырезают лунки, в которые добавляют различные разведения антигена. Во время инкубации антиген диффундирует в агар и связывается с антителами, что приводит к образованию зон преципитации в виде колец. Диаметр колец преципитации соответствует концентрации антигена. Эта реакция используется для определения концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови (метод Манчини).

**Иммуноэлектрофорез.** *Иммуноэлектрофорез* – сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации; смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза. Затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой, диффундируя в гель, образуют в месте «встречи» с антигеном линии преципитации

**Встречный иммуноэлектрофорез.** Этот метод основан на образовании линий преципитации в результате встречной диффузии антигенов и антител под воздействием электрического поля в агаровом геле. В слое агара на определенных расстояниях друг от друга вырезают лунки для антигена и сыворотки. Исследуемый антиген помещают со стороны катода, а со стороны анода помещают сыворотку. Пластинку с агаром ставят в камеру для электрофореза. Положительная реакция проявляется в образовании линий преципитации между лунками, в которые добавлены антиген и сыворотка.

**Реакция нейтрализации.** Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие микробов или их токсинов на чувствительные клетки и ткани, что связано с блокадой микробных антигенов антителами, т. е. их *нейтрализацией.* Реакцию нейтрализации (PH) проводят путем введения смеси антиген- антитело животным или в чувствительные тест-объекты (культуру клеток, эмбрионы).

* *Реакция нейтрализации вирусов.* Наличие антител, нейтрализующих вирусы выявляют смешиванием культуры возбудителя с сывороткой и последующим введением смеси лабораторному животному или заражением культуры клеток. На эффективность нейтрализации указывает выживание животного либо отсутствие гибели клеток в культурах.
* *Реакция нейтрализации токсина* антитоксином основана на способности антитоксических антител связывать токсин и блокировать его действие. Для идентификации токсина и определения титра антитоксических антител их смесь вводят лабораторным животным. При соответствии типа токсина и антител в сыворотке животное не погибает.

**Реакция флоккуляции.** *Реакция флоккуляции* (от лат. *floccus* — хлопья шерсти) — появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммунопреципитации) в пробирке (*in vitrо*) при реакции токсин–антитоксин или анатоксин–антитоксин. Реакция позволяет определить активность антитоксической сыворотки, анатоксина и токсина. В пробирке, где анатоксин и антитоксическая сыворотка находятся в эквивиалентном соотношении, наблюдают помутнение. Таким образом, зная концентрацию антитоксической сыворотки, можно рассчитать концентрацию анатоксина

**Реакция связывания комплемента (РСК). Реакция иммунофлюоресценции (РИФ). Иммуноферментный анализ (ИФА). Радиоиммунный метод (РИМ). Иммуноблотинг (ИБ). Применение генетических методов в микробиологической диагностике. Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Секвенирование**

**Реакции лизиса.** *Реакции лизиса* происходят с участием трех компонентов: клетки (антигена), специфических антител и комплемента. Иммунная сыворотка совместно с комплементом обладает способностью лизировать микроорганизмы или другие клетки. В зависимости от антигена реакции лизиса называют:

* *Реакции бактериолиза*  основываются на лизисе (разрушении) бактерий (вибрионов, спирохет и др.) соответствующими антителами- бактериолизинами при участии комплемента.
* *Реакция гемолиза* - при взаимодействии эритроцитов, антител к ним и комплемента наблюдается их лизис. Реакцию гемолиза используют в качестве индикатора связывания комплемента при постановке РСК

**Реакция связывания комплемента (РСК).** Реакцияоснована на *активации комплемента* при образовании комплекса антиген–антитело. При соответствии друг другу антигены и антитела образуют иммун­ный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (С), т. е. происходит связывание комплемента. Если же комплекс антиген–антитело не образуется, то комп­лемент остается свободным. Таким образом учет результата реакции основывается на том, связался ли комплемент или остался свободным.

**РСК (принцип реакции).** РСК представляет собой сложную реакцию состоящую из 2-ух серологических реакций. Одна из этих реакций является основной, а другая – индикаторной реакцией. К инактивированной и разбавленной сыворотке пациента добавляются соответствующий антиген и комплемент. После инкубации к смеси добавляют гемолитическую систему для обнаружения свободного комплемента. Гемолитическая система состоит из эритроцитов барана и антител к этим эритроцитам. При добавлении комплемента к этой системе происходит гемолиз. Если реакция положительная, образованный комплекс антиген-антитело связывает комплемент, что приводит к отсутствию гемолиза в гемолитической системе из-за отсутствия комплемента в смеси. Если реакция отрицательная, антиген и антитело не соответствуют друг другу комплемент остается свободным и присоединяется к комплексу эритроцит–антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз ( феномен лаковой крови).

**РСК (применение).** РСК применяют для диагностики многих инфекционных болезней, в частности сифилиса, токсоплазмоза, вирусных инфекций. РСК отличается высокой специфичностью и чувствительностью. При постановке реакции необходимо определять относительное количество всех ингредиентов реакции.

**РСК (ингредиенты).**

* ***Суспензию эритроцитов барана*** получают дефибринированием эритроцитов путем встряхивания в течение 10-15 мин и фильтрованием для удаления фибрина. Отмывают 3 раза изотоническим раствором натрия хлорида, доливая его к осадку эритроцитов до первоначального объема крови. Эритроциты можно хранить 5-6 дней при температуре 4-6ºС.
* ***Гемолитическую сыворотку*** для РСК получают путем иммунизации кроликов путем введения им 50% взвеси отмытых эритроцитов барана (по 1 мл 4-6 раз через день). Полученную через 7 дней после последней инъекции сыворотку прогревают 30 мин при температуре 56ºС ( для инактивации содержащегося в ней комплемента). Для предупреждения бактериального пророста в гемолитическую сыворотку добавляют консервант. Выпускают во флаконах в лиофилизированном виде, указывают титр (наибольшее разведение, вызывающее полный гемолиз 3% суспензии эритроцитов барана в присутствии комплемента при 370C в течение часа.
* ***Гемолитическая система*** состоит из смешанных в равных объемах гемолитической сыворотки (взятой в тройном титре) и 3% взвеси эритроцитов барана. Для сенсибилизации эритроцитов гемолизинами смесь выдерживают в термостате при температуре 37ºС в течение 30 мин.
* В качестве комплемента используют сыворотку морской свинки, взятую непосредственно перед опытом; можно также применять сухой комплемент. Чтобы получить основной раствор для последующего титрования, комплемент разводят 1:10 изотоническим раствором натрия хлорида. Перед проведением опыта основной раствор комплемента (1:10) разливают в ряд пробирок от 0,05 до 0,5 мл и добавляют в каждую изотонический раствор натрия хлорида, доводя объем жидкости до 1,5 мл. Пробирки помещают в термостат при температуре 37ºС на 45 мин, затем добавляют в них гемолитическую систему и выдерживают в термостате в течение 30 мин, после чего определяют *титр комплемента*. Для опыта берут рабочую дозу комплемента (содержащуюся в объеме 0,5 мл), которая выше титра на 20-30%. Например, если титр комплемента составляет 0,3 мл, то рабочая доза для РСК будет равна 0,4 мл.
* ***Антигеном*** для РСК могут быть культуры различных убитых микроорганизмов, их лизаты, компоненты бактерий, патологически измененных и нормальных органов, вирусы и вируссодержащие материалы. Многие антигены из микроорганизмов получают производственным путем.
* ***Сыворотку*** (больного или диагностическую) накануне проведения реакции прогревают на водяной бане при температуре 56ºС в течение 30 мин для инактивации ее собственного комплемента.

**РСК (техника)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Фазы реакции  | Компоненты реакции | Количество компонентов добавляемое в пробирки (в мл) |
| Опыт  | Контроль сыворотки | Контроль антигена |
|  I | 1 Исследуемая сыворотка (1:10, 1:20, 1:40 и др. разведения) | 0,5 | 0,5 | - |
| 2. Антиген, мл | 0.5 | - | 0,5 |
| 3. Комплемент, мл | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 4. Изотонический раствор (мл) | - | 0,5 | 0.5 |
| Инкубация 30 мин, при 37°С |
| II | 5. Гемолитическая система (мл) | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Инкубация 30 мин, при 37°С |
|  | Гемолиза нет | **Гемолиз**  | **Гемолиз**  |

**РСК (учет результатов).** Отсутствие гемолиза в пробирках расценивают как положительный результат реакции (жидкость в пробирке бесцветная, все эритроциты оседают на дно)

* При отрицательной реакции (–) наблюдается полный гемолиз, жидкость в пробирке имеет интенсивно розовую окраску (лаковая кровь).
* При окончательном учете интенсивность реакции выражают плюсами: (++++; +++;++;+)
* Разведение сыворотки в последней пробирке где не произошло гемолиза принимается *за титр реакции связывания комплемента.*

**Реакция радиального гемолиза (РРГ).** *Реакцию радиального гемолиза (РРГ)* ставят в лунках геля из агара, содержащего эритроциты барана и комплемент. После внесе­ния в лунки геля гемолитической сыворотки (антител против эритроцитов барана) вокруг них (в результате радиальной диффузии антител) образуется зона гемолиза. Таким образом, можно определить активность комплемента и гемолитической сыворотки, а также антитела в сыворотке крови у больных гриппом, краснухой, клещевым энцефалитом. Для этого на эритроцитах адсорбируют соответствующие антигены вируса, а в лунки геля, содержащего данные эритроциты, добавляют сыворотку крови больного. Противовирусные антитела взаимодействуют с вирусными антигенами, адсорбированными на эритроцитах, после чего к этому комплексу присоединяются компоненты комплемента, вызывая гемолиз.

**Реакции с использованием меченых антител или антигенов.** Реакции с использованием меченых антител или антигенов составляют основу методов экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, так как выявляют минимальное содержание антигенов и антител в исследуемых образцах. Для этих реакций используют специальные компоненты конъюгированные («сшитые») с меткой (конъюгат). В качестве меток могут быть использованы различные ферменты, красители- флюорохромы и изотопы.

**Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).** Реакция Кунса основана на применении антител, меченных флюорохромными красителями. Такие антитела связывая различные антигены, вызывают свечение иммунных комплексов в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Реакция Кунса является методом экспресс-диагностики для выявления антиге­нов микробов или определения антител. На практике применяют несколько вариантов РИФ.

**РИФ (прямой метод).** *Прямой метод* РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, меченными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. После химической фиксации приготовленного мазка к нему добавляют флюоресцирующую сыворотку и после инкубации тщательно отмывают. *При положительном результате* бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета. *При отрицательной реакции* под микроскопом виден темный препарат, так как меченые антитела не комплементарные исследуемому антигену не фиксируются и смываются при отмывке

**Непрямой метод (РНИФ).** *Непрямой метод РИФ* заключается в выявлении комплекса антиген–антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся с антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела +антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Метод ИФА позволяет обнаруживать антигены с помощью меченых ферментами антител. Наиболее часто для этого используют пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и ß-галактозидазу. Специфические антитела связываются с антигеном в результате образуется комплекс антиген-антитело который выявляют посредством фермента. Для индикации фермента добавляют субстрат который расщепляется ферментом и хромоген. При положительной реакции субстрат разрушается, хромоген меняет свой цвет. Результат анализа регистрируют визуально или считывают с помощью спектрофотометра. При *твердофазном варианте РИА* один из компонентов реакции (антиген или антитела) сорбирован на твердом носителе, например в лунках микропанелей из полистирола.

**Твердофазный ИФА.** При определении антител в лунки планшеток с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больного, антиглобулиновую (противочеловеческую) сыворотку, меченную ферментом, и субстрат (хромоген) для фермента. Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют несвязавшиеся реагенты путем тщательного промывания. При положительном результате изменяется цвет раствора хромогена. Твердофазный носитель можно сенсибилизировать не только антигеном, но и антителами. Тогда в лунки с сорбированными антителами вносят искомый антиген, добавляют иммунную сыворотку против

**Твердофазный ИФА (сэндвич-метод).** На дно лунок адсорбируют известные антитела. *Сэндвич метод* используют для определения антигена, в лунки последовательно добавляют материал больного (антиген), меченые ферментом антитела к антигену и субстрат хромоген. В случае положительной реакции в лунке находится фермент, наличие которого регистрируют по изменению цвета хромогена.

**Техника иммуноферментного анализа. В** настоящее время в продаже имеются наборы оборудования и реагентов, используемых для диагностики каждого заболевания

В специальном буферном растворе готовят определенные разведения исследуемого материала готовят. Материал из каждого разведения вносят в две лунки планшета (известный антиген или известное антитело сорбированы в лунку этого планшета) и инкубируют в термостате при 37°С в течение 1-3 часов.

После инкубации лунки планшета тщательно промывают специальным буферным раствором для удаления не связавшегося антигена или антител. Затем в лунки вносят по 0,1 мл рабочего разведения меченого ферментом антитела или меченного ферментом антиглобулина в буферном растворе против искомого антигена, инкубируют в термостате при 37°С в течение 2 часов, промывают 3 раза буферным раствором для удаления несвязанных конъюгаты.

После этого в лунки вносят смесь субстрата (H202) и хромогена (например, ортофенилдиамина) в объеме 0,1 мл, выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. В процессе инкубации фермент (пероксидаза), связанный со стенкой лунок, разлагает субстрат (H202) на атомарный кислород, который окисляет хромоген и меняет его цвет (образуется желтая окраска). Стоп-реагент (0,1 мл 1 н. H2S04, или 1 н. NaOH) добавляют в лунки для остановки реакции разложения субстрата.

**ИФА (оценка результатов).** Оценку реакции можно провести невооруженным глазом. Для этого достаточно сравнить изменение цвета реакции с контролем. Отмечают наибольшее разведение материала, интенсивность цвета при котором более выражена чем интенсивность в соответствующем разведении контроля. Для более точной оценки реакции используется фотоколори-метрический метод. За положительный результат принимается максимальное разведение исследуемого материала, уровень экстинкции которого в 2 раза превышает таковой в контрольном разведении.

В настоящее время широко используются микропланшетные фотомеры (ридеры), которые позволяют автоматически оценивать результат

**Радиоиммунологический метод (РИМ).** Высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген–антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом (125I, 14С, 3Н и др.). После их взаимодействия отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (ß- или γ-излучение): интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

При ***твердофазном варианте радиоиммунного анализа (РИА)*** один из компонентов реакции (антиген или антитела) сорбирован на твердом носителе, например в лунках микропанелей из полистирола.

Другой вариант метода — ***конкурентный*** ***РИА***: искомый антиген и меченный радионуклидом антиген конкурируют друг с другом за связывание ограниченного количества антител иммунной сыворотки. Этот вариант используют для определения количества антигена в исследуемом материале.

**Иммуноблотинг.** *ИБ, вестернблоттинг —* высокочувствительный метод, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА. Антигены разделяют по молекулярной массе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем осуществляют блоттинг (от англ. *blot* — пятно), т.е. перенос антигенов из геля на нитроцеллюлозную мембрану, и проявляют невидимые «блоты» антигенов с помощью антител, меченных ферментами (ИФА). Фирмы выпускают такие полоски с «блотами» антигенов. На эти полоски наносят сыворотку больного. Затем после инкубации отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом. Образовавшийся на полоске комплекс (антиген + антитело больного + антитело против Ig человека) выявляют добавлением субстрата/хромогена, изменяющего окраску под действием фермента.

**Генная инженерия.** В основе *генной инженерии* лежит перенос ДНК в прокариотические и эукариотические клетки после ее расщепления на нуклеотидные последовательности. В результате такие клетки-*гибриды*, имеющие фрагменты чужеродного гена, обеспечивают экспрессию переносимого гена. Одной из конечных целей генной инженерии является получение продукта или сигнала, кодируемого определенным геном в организме реципиента.

**Генная инженерия (получение гена).** Для этого сначала получают или синтезируют ген (молекулу ДНК), кодирующий продукт или свойство. После этого молекула ДНК расщепляется на фрагменты с помощью ферментов, называемых рестриктазами. Этот фермент относится к эндонуклеазам и обладает способностью расщеплять молекулу ДНК только в определенных местах. Фрагменты молекулы ДНК, полученные под действием ферментов рестрикции, называются рестриктами. При необходимости возможно также соединение концов рестриктов с помощью ДНК-лигаз.

**Генная инженерия (трансфер генов).** Фрагменты ДНК присоединяют к вектору. Вектор — это агент, который переносит фрагмент чужеродной ДНК в клетку-реципиент. В качестве векторов чаще всего используются плазмиды, фаги или их комбинации - космиды и фазмиды. Для переноса рекомбинантной ДНК (рДНК) в клетку-реципиент используются методы трансформации, трансфекции и микроинъекции.

**Генная инженерия (трансфер генов).** Путем *естественной* *трансформации* рДНК может быть перенесена в некоторые штаммы *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* и *E.coli*. Перенос рДНК в прокариотические и эукариотические клетки с помощью фага называется трансфекцией. В некоторых случаях они заражают эукариотические клетки векторным вирусом. При этом в качестве векторов чаще всего используются вирусы полиомы и SV-40. Методом *микроинъекций* переносится молекула ДНК, а также рДНК в культивируемые клетки животных и растений с помощью стеклянных микроигол. рДНК также может быть перенесена в клетки-реципиенты с помощью *липосом*. Липосомы готовят на основе равной смеси фосфатидилсерина и холестерина. Для этого смесь рДНК и липосом обрабатывают ультразвуком, а затем инкубируют ее с реципиентной клеткой.

**Генная инженерия (получение конечного продукта).**

* рДНК переносится в клетки-реципиенты, называемые *пермиссивными* *клетками*. Эти клетки представляют собой такие клетки, в которых перенесенная рДНК остается в составе этой клетки без расщепления и возможна репликация вектора, другими словами, наблюдается экспрессия рДНК.
* Из прокариотов часто используются E.coli и B.subtilis а из эукариотов - Saccharomyces cerevisiae.
* В настоящее время для синтеза инсулина, соматотропного гормона, интерферонов, интерлейкинов и др. на основе экспрессии соответствующих генов в рДНК получены и используются в биотехнологии суперпродуценты бактерии и дрожжи.

**Современные возможности генной инженерии.** Удалось получение *трансгенных животных* путем микроинъекции рДНК в половые клетки (или яйцеклетки). Благодаря наличию в геноме таких организмов определенных генов донора они приобретают новые характеристики. Таким же путем были получены *трансгенные растения*, устойчивые к фитопатогеннм микроорганизмам, холоду и т. д. Сорта фруктов и моркови, содержащие определенные «вакцины», были получены путем переноса в растения генов иммунодоминантных антигенов некоторых микроорганизмов. Одним из последних успехов генетики является создание *генетических* *клонов*, то есть *генетических копий*. Генетическое клонирование впервые было создано в конце прошлого века шотландскими учеными Яном Велмутом и Кеном Кэмпбеллом.

**Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней.**

* **Полимеразная цепная реакция**
* **Метод молекулярной гибридизации**
* **Рестрикционный анализ**
* **Секвенирование**

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** ПЦР позволяет обнаружить ДНК или РНК микробов в исследуемом материале путем их накопления. Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью, позволяющей определить наличие в изучаемой пробе молекулы ДНК или РНК. ПЦР проводят в специальных программированных аппаратах. Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают при 92-96  °C (в случае применения термостабильной *Tag*-полимеразы прогревают до 98°C). Тепловая денатурация приводит к разведению двух цепей двойной спирали. С целью полной денатурации компонентов прогревание проводят в течение 2-5 минут. Затем добавляют праймеры и полимеразу, и при наличии в смеси ДНК искомого гена, праймеры связываются с его комплементарными участками. В результате синтезируются две копии гена, после чего цикл повторяется снова, при этом количество ДНК гена будет увеличиваться каждый раз вдвое ( амплификация). Специфический продукт ПЦР идентифицируется электрофорезом.

***ПЦР в реальном времени.*** ПЦР в реальном времени (real time PCR) ускоренный метод, при котором амплификация и определение продукта амплификации проводятся одновременно. Позволяет проводить мониторинг и количественный анализ накопленных продуктов ПЦР, и регистрировать и интерпретировать полученный результат в автоматическом режиме. Метод позволяет обнаружить даже одну молекулу ДНК или РНК. Полученную информацию можно использовать для контроля эффективности лечения

**Метод молекулярной гибридизации.** Позволяет обнаружить нуклеиновые кислоты в исследуемом материале при помощи зондов, меченных радиоактивными изотопами или ферментами. В качестве зонда используют одноцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, меченную радиоактивными нуклидами с которой сравнивают исследуемую ДНК. В случае наличия комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют между собой двойную спираль ( гибридизация). Локализацию молекулярных гибридов определяют иммуноферментным или радиоиммунным методом.

**Рестрикционный анализ.**

* *Рестрикционный анализ* в основном используется при идентификации микроорганизмов.
* Принцип метода заключается в идентификации расщепленных рестриктазами

 фрагментов ДНК с помощью электрофореза.

* *Рестриктазы* - это эндонуклеазы расщепляющие молекулы ДНК путем разрыва фосфатных связей в определенных последовательностях нуклеотидов.
* Размер рестрикционных фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Мелкие и крупные фрагменты ДНК перемещаются в геле с разной скоростью, что таким образом можно получить рестрикционную карту определённого вида микробов

**Секвенирование.** Секвени́рование позволяет определить нуклеотидную последовательность ДНК (от англ, *sequence* – последовательность). Наиболее распространенным является *метод Сэнгера.* Вначале исследования молекулу исследуемой ДНК расщепляют щелочным гидролизом на цепочки различной длины. К полученной смеси присоединяют меченые дидезоксинуклеотиды (аденин, тимин, гуанин и цитозин), которые присоединяются к комплементарным нуклеотидам на 3I-конце фрагмента ДНК. Таким образом, образуется набор фрагментов ДНК разной длины, которые заканчиваются соответственным дидезоксинуклеотидом. Полученные меченые фрагменты ДНК разделяют в полиакриламидном геле (с точностью до одного нуклеотида), проводят радиоавтографию и по картине распределения фрагментов в четырех пробах устанавливают нуклеотидную последовательность ДНК. Проводят сравнение полученных результатов секвенирования с помощью специальных программ с результатами, имеющимися в базе данных.