

## **ТЕМА 9.**

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

# Специфический иммунитет

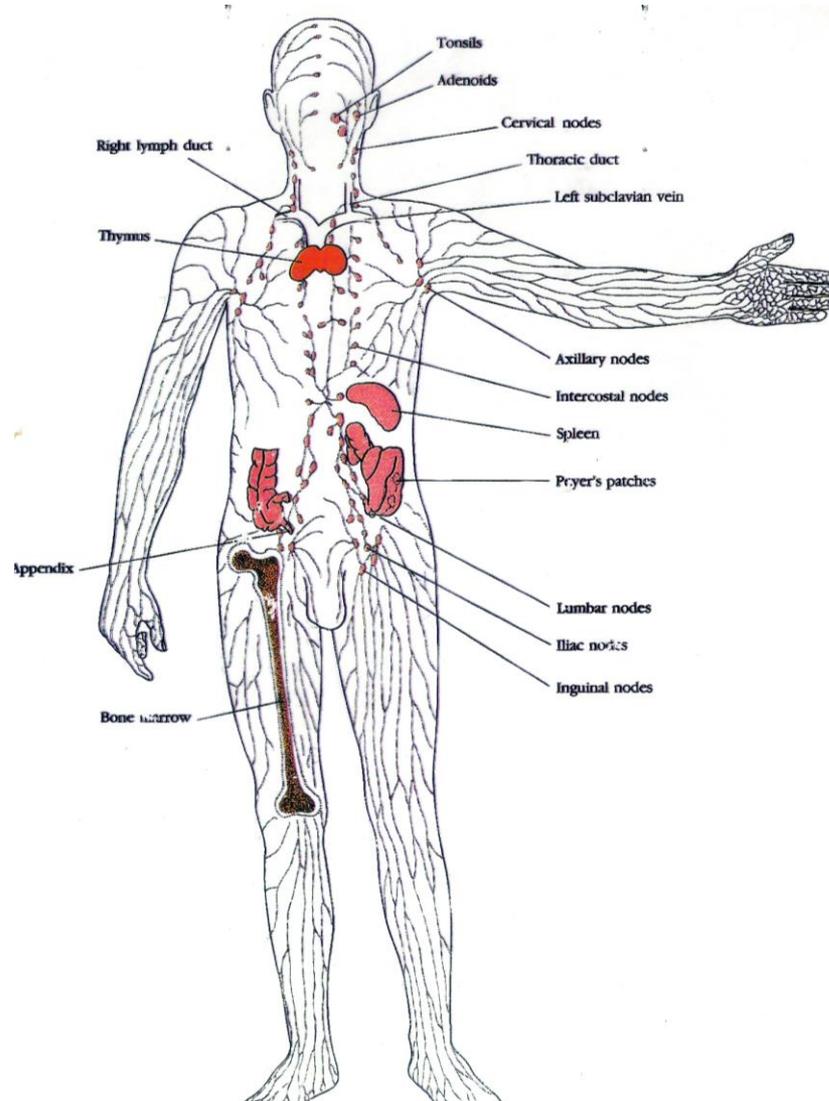
- Специфический иммунитет формируется у человека при контакте иммунной системы с возбудителем или антигеном
- Специфическая защита, сформированная против какого-либо антигена, не может защитить организм от других антигенов.

# 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 это 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

# Иммунная система организма



# Органы иммунной системы

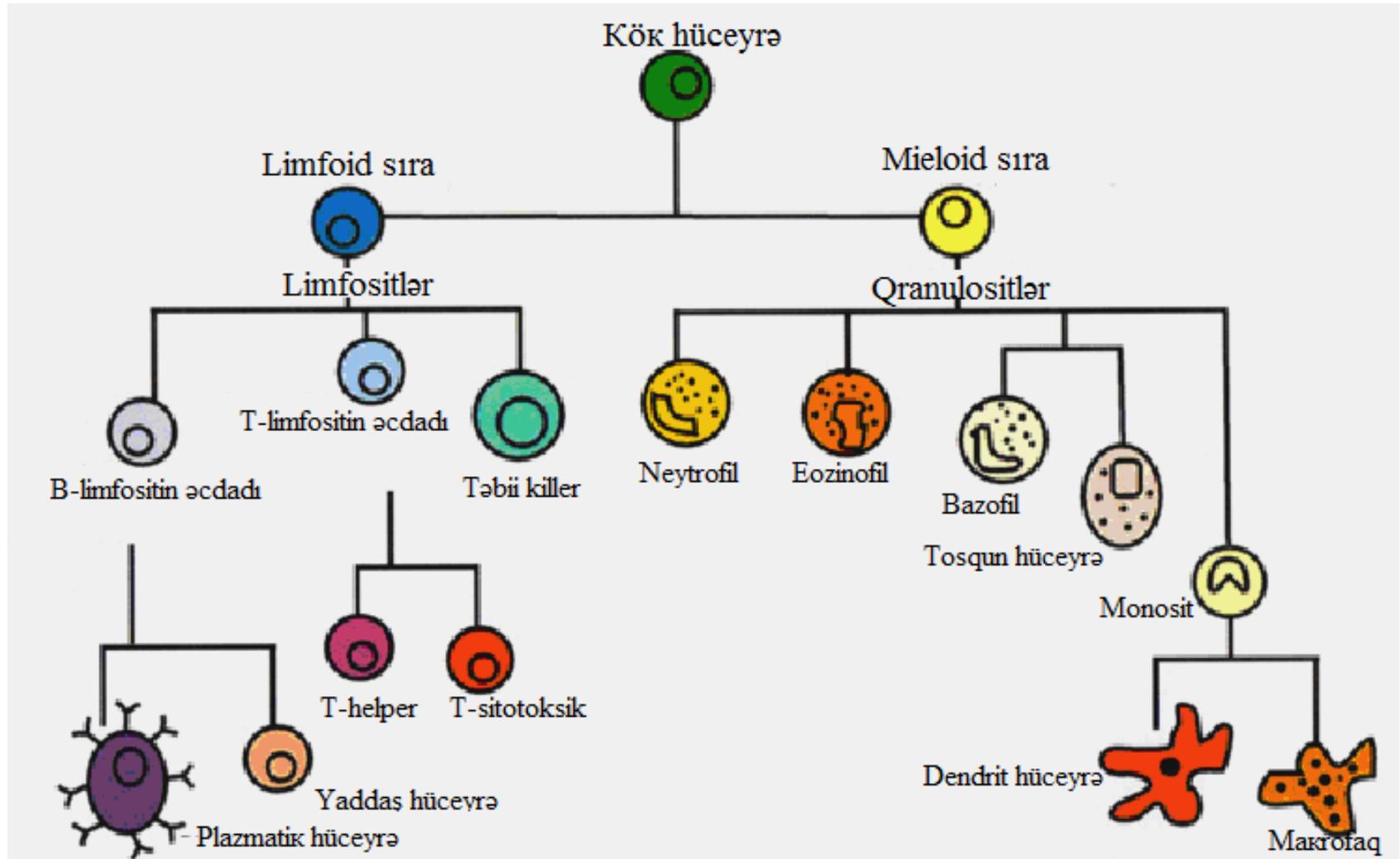
- **Центральные органы иммунной системы** принимают участие в процессах антигеннезависимой дифференцировки и созревания клеток иммунной системы

Костный мозг, тимус

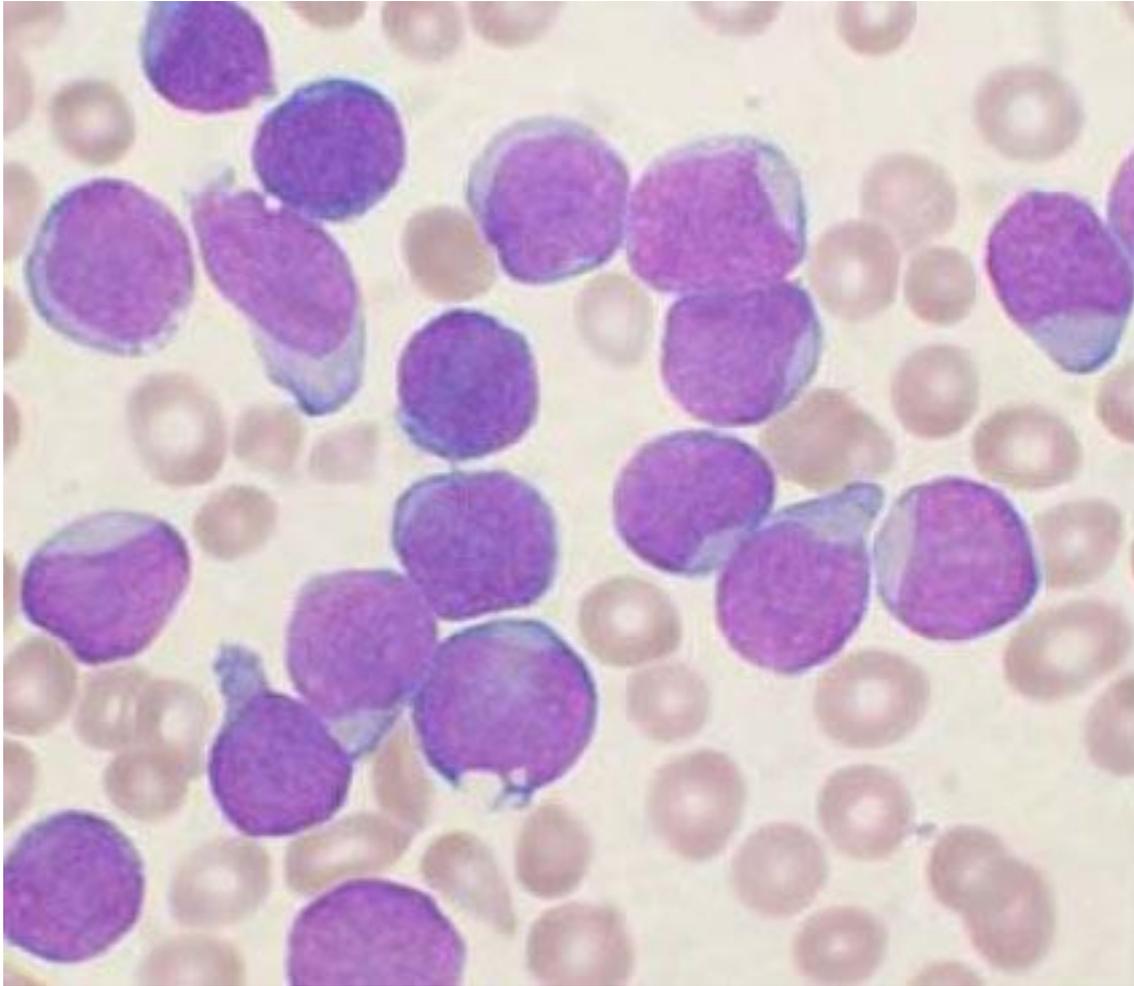
- **Периферические органы иммунной системы** участвуют в антигензависимой дифференцировке лимфоцитов, презентации антигена и иммуногенезе Т- и В-лимфоцитов

Селезенка, лимфатические узлы, лимфоидные фолликулы

# Созревание клеток иммунной системы



# Клетки иммунной системы - лимфоциты



# Лимфоциты

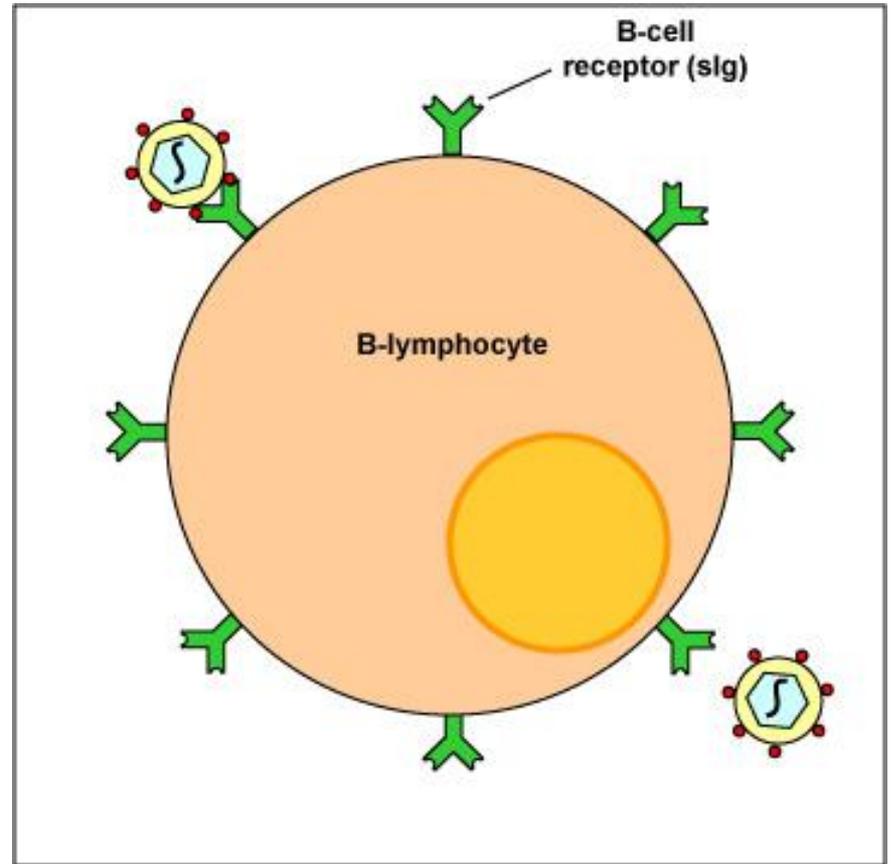
В зависимости от места созревания в организме, эти клетки подразделяются на две гетерогенные популяции

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

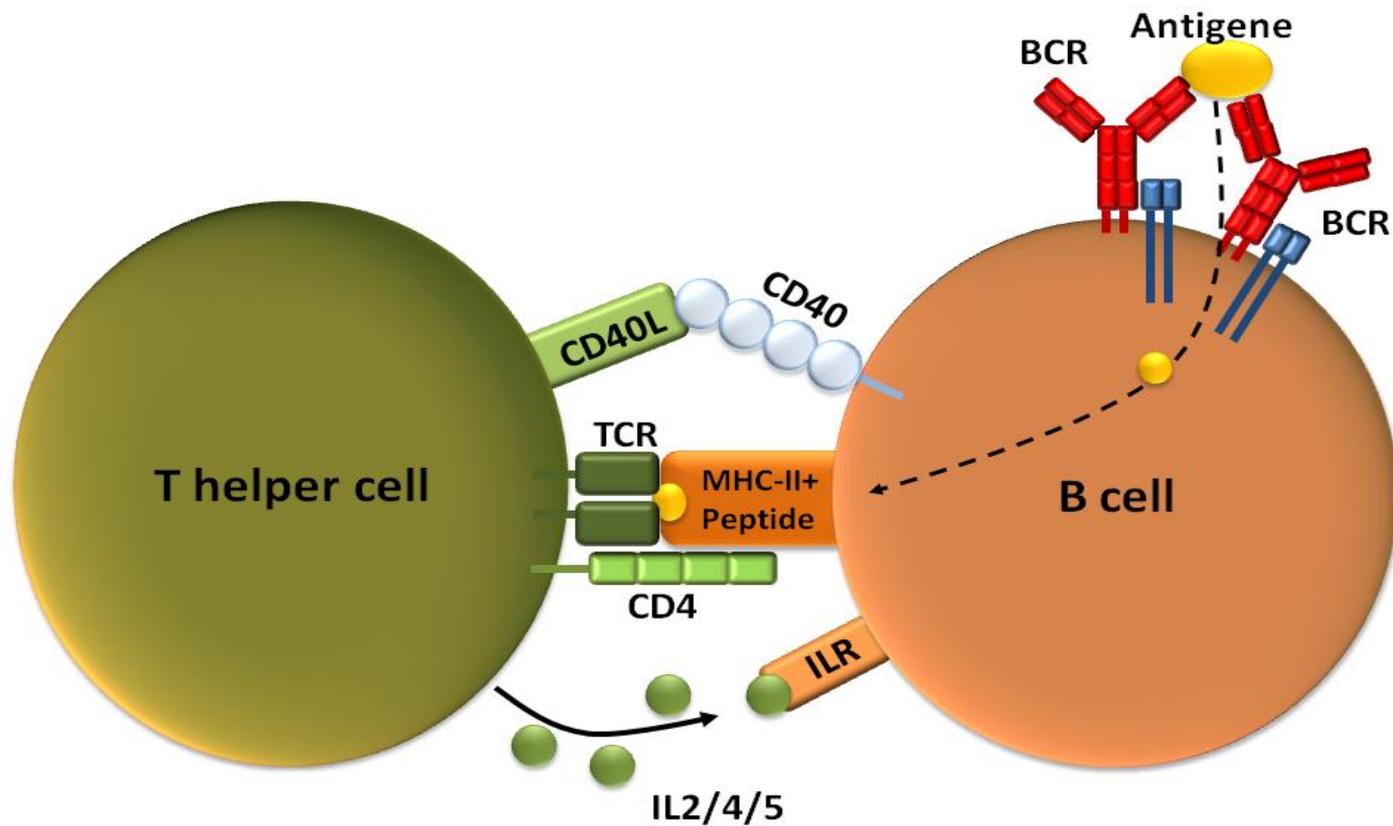
# В-лимфоциты и плазмоциты

- 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.**

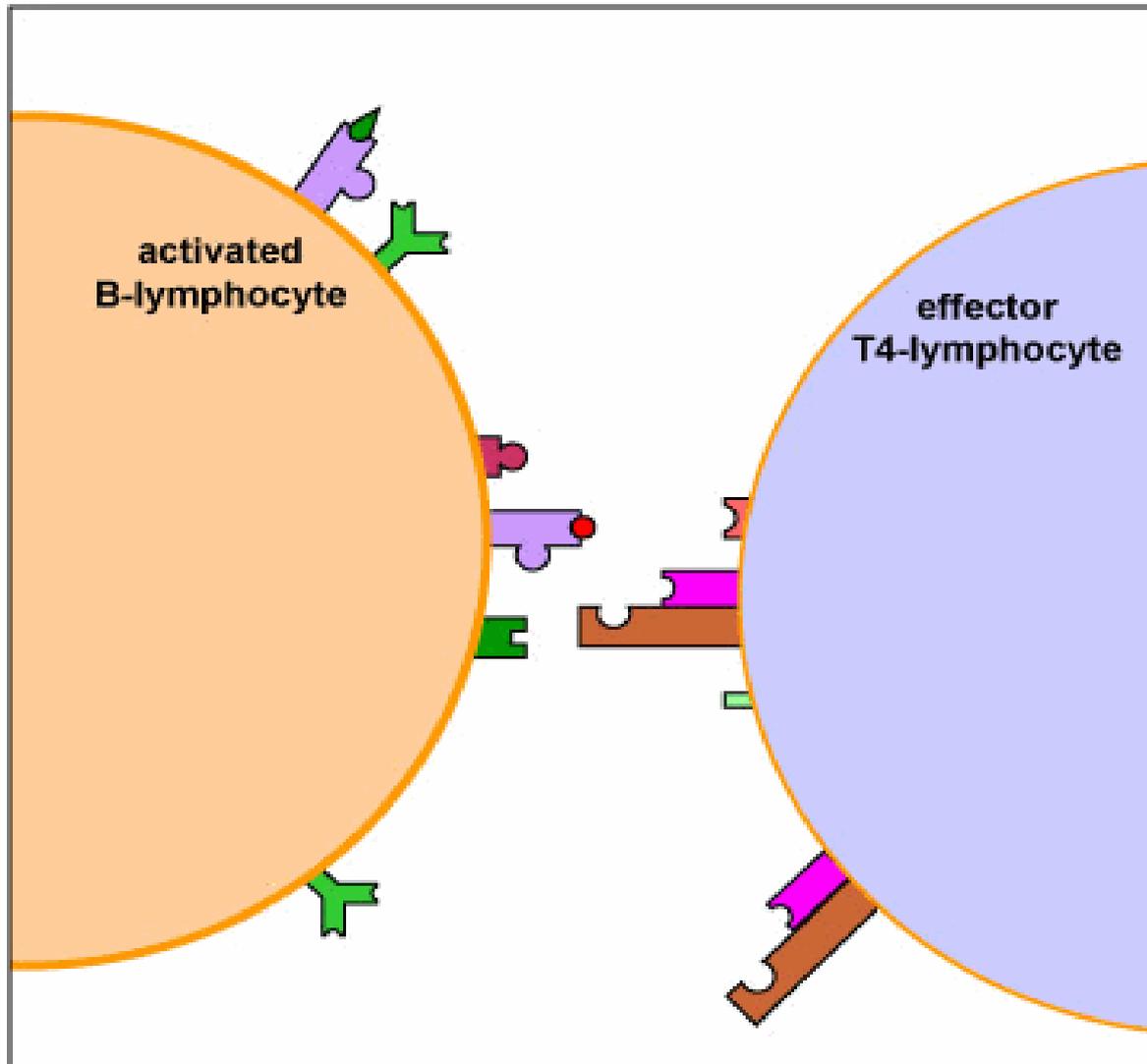
# В-лимфоциты



# Передача информации об антигене от Т-хелпера к В-лимфоциту



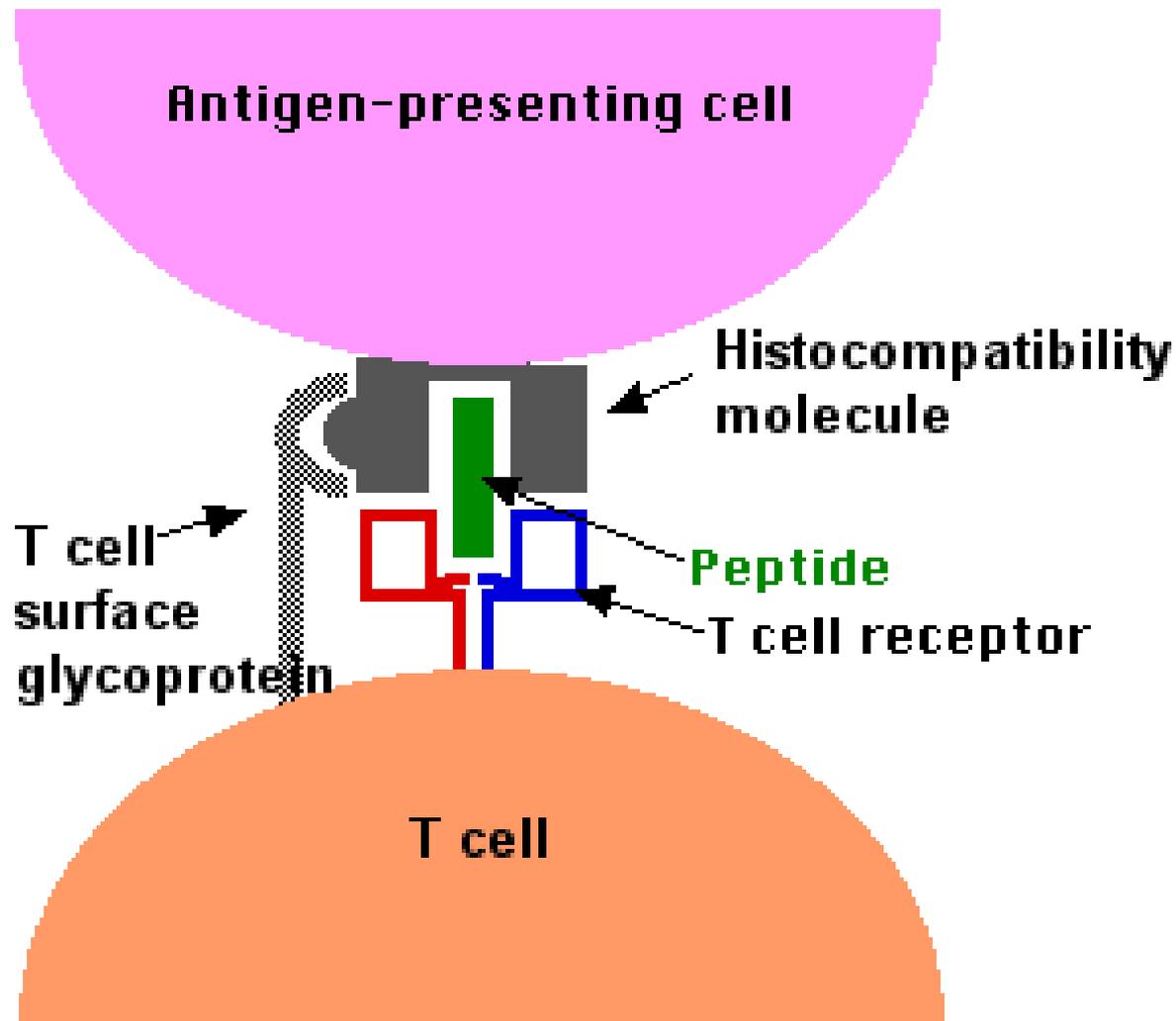
# В-лимфоцит принимает информацию об антигене от Т-хелпера



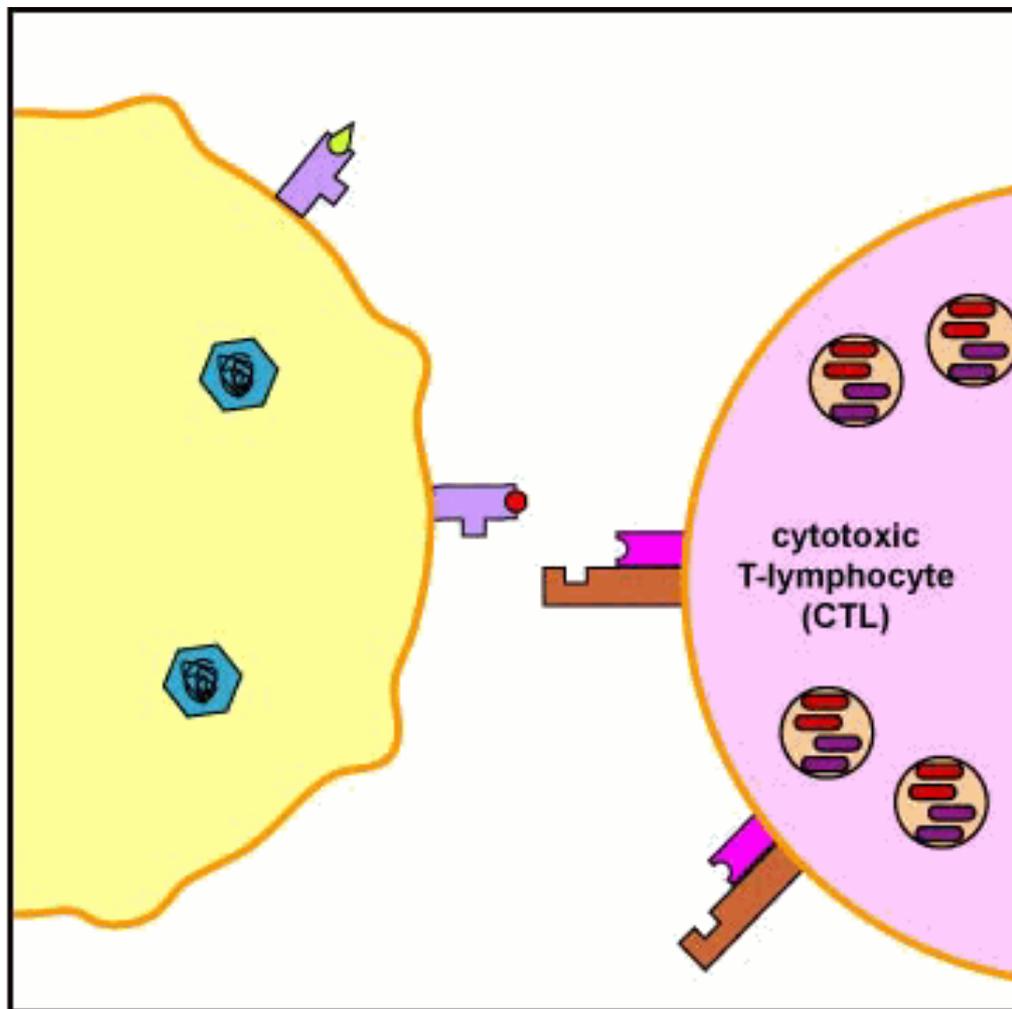
# Т-лимфоциты

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

# Передача информации об антигене от макрофага Т-лимфоциту



# Т-киллеры уничтожают клетки-мишени антителонезависимой цитотоксичностью



## НК-клетки

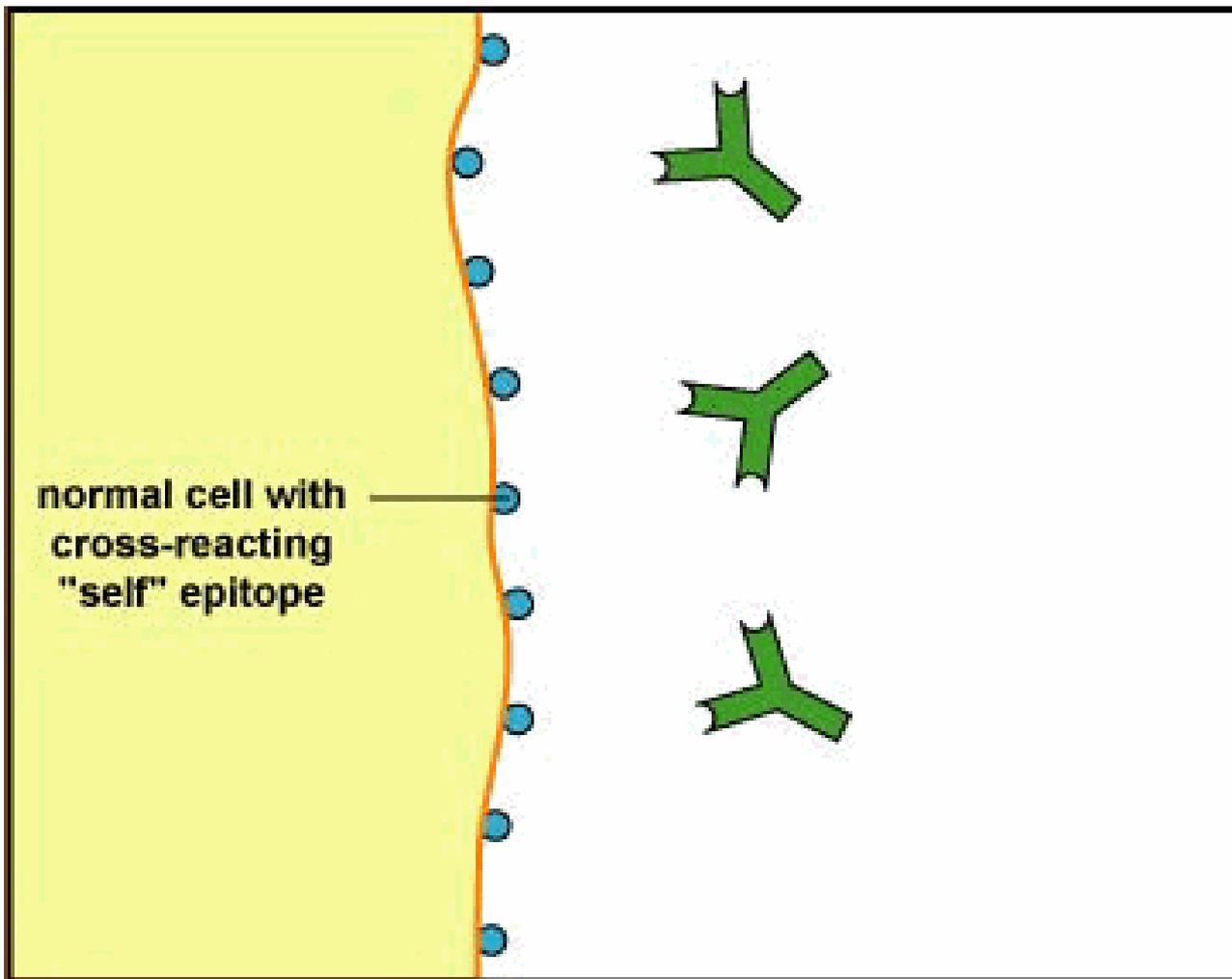
*(англ. «natural killer»- естественные киллеры)*

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

# «нападение» НК- клетки на опухолевую клетку

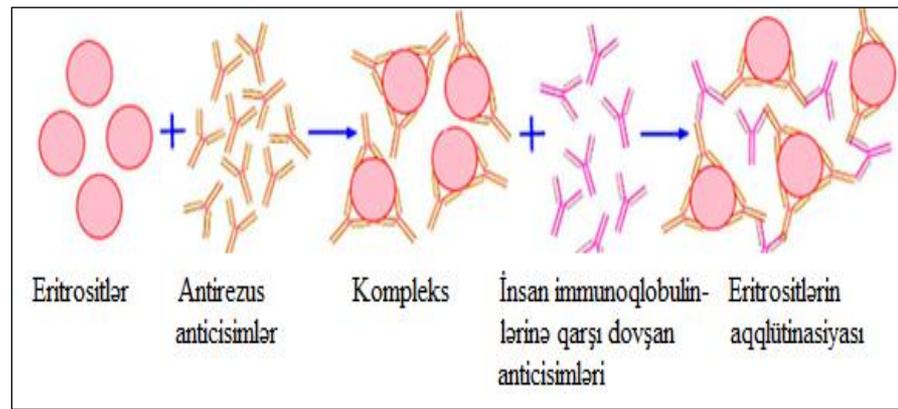


# Действие НК-клетки на клетку-мишень



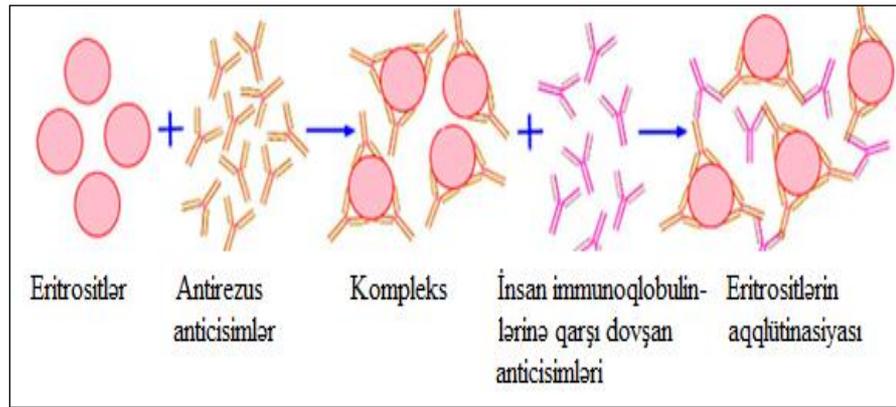
# Реакция Кумбса

- 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

- 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.



# 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

- 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

- **Антигенность** 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

# Свойства антигенов

- **Специфичностью** называют способность антигена индуцировать иммунный ответ к строго определенному эпитопу.
- Взаимодействие антител и антигенов отличается высокой специфичностью, 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***

## 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 однойцовых близнецов, инбредных линий животных. Примером таких антигенов в популяции людей являются антигены гистосовместимости, а у бактерий – типовые антигены.

# Суперантигены

- **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 микроорганизмов

- Антигены бактерий
  - Жгутиковый, или H-антиген,
  - Соматический, или O- антиген,
  - Капсульный , или K- антиген,
  - Антиген вирулентности, или Vi-антиген,
  - Экзотоксины, ферменты
- Антигены вирусов
  - вирусоспецифические

# Антигены организма человека

- *Эритроцитарные антигены*
- *антигены системы ABO*
- *резус-антигены*
- *Главный комплекс гистосовместимости, или МНС (аббр. от англ. Main Hystocompatibility Complex, Human Leukocyte Antigen - HLA)*
- 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).

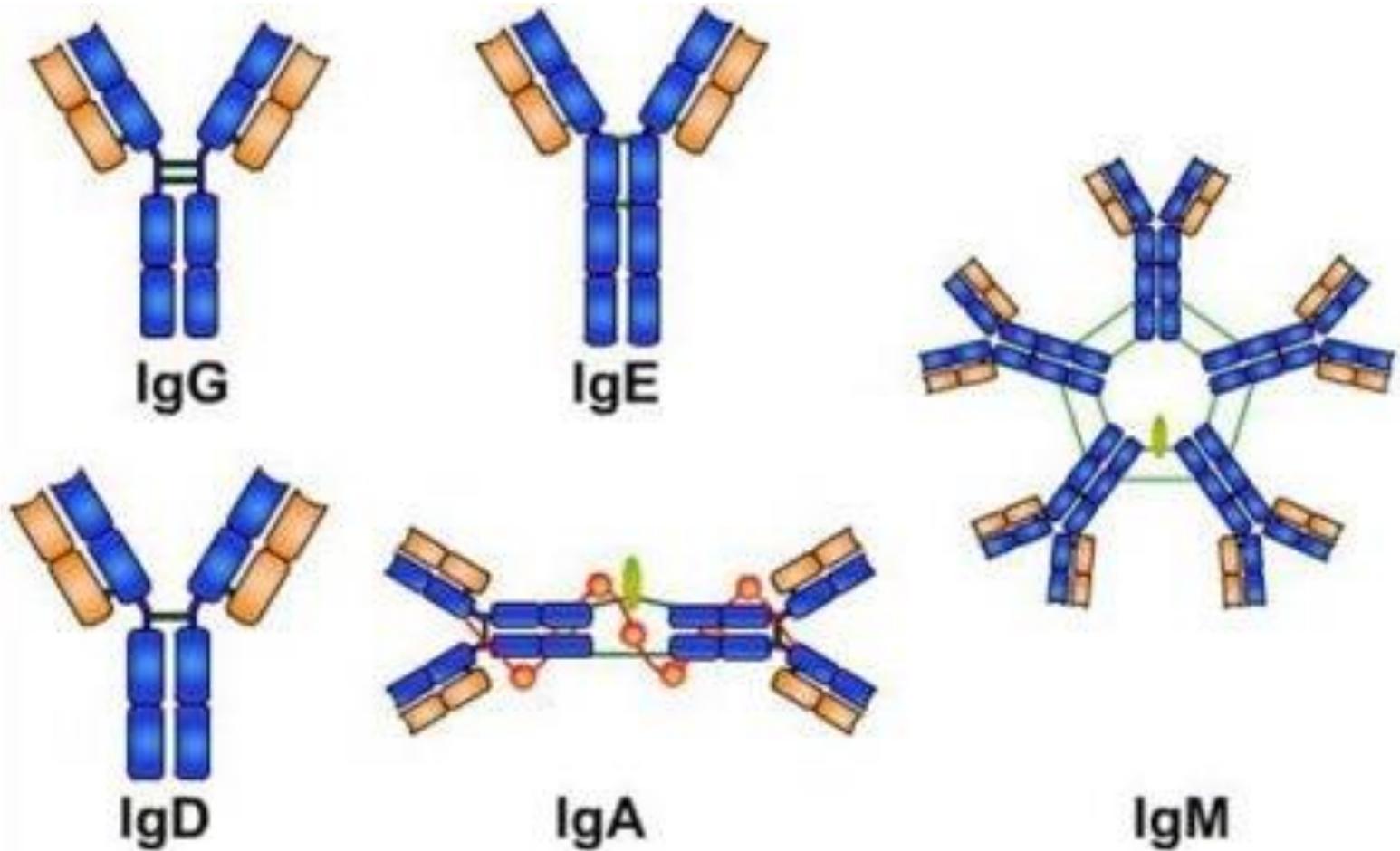
# Иммуноглобулины, антитела

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

# Иммуноглобулины

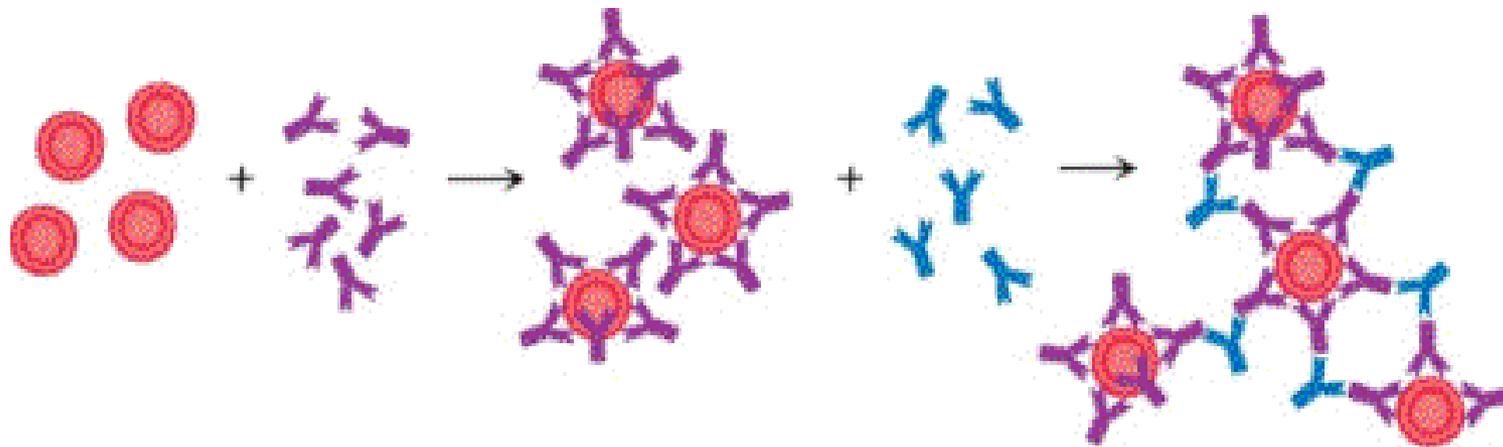
- Антитела относятся к  $\gamma$ -глобулиновой фракции белков сыворотки крови.
- Молекула Ig состоит из 2 пар полипептидных цепей: двух **H-** (от англ. *heavy* – тяжелый) и двух **L-** (от англ. *light* – легкий) цепей, связанных между собой попарно дисульфидными связями (-S-S-).
- Молекулярный вес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

# Классы иммуноглобулинов



# 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



# Применение серологических реакций

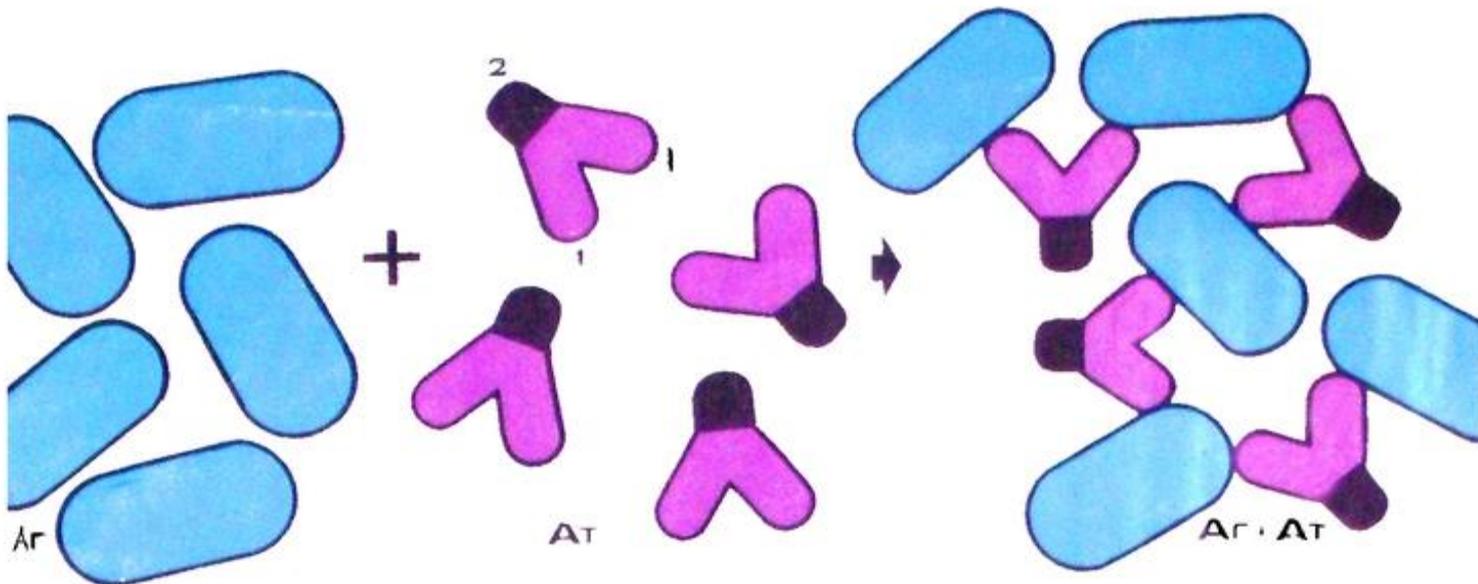
- Серологические реакции можно проводить в двух направлениях:
- Для **идентификации антигенов микробов**, различных биологически активных веществ, групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, иммунных комплексов, рецепторов клеток и др.
- При выделении микроба от больного проводят идентификацию возбудителя 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**).

# РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (механизм)

• **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 агглютинидами, клетки микробов участвующих в РА – агглютиногенами.



## РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (применение )

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

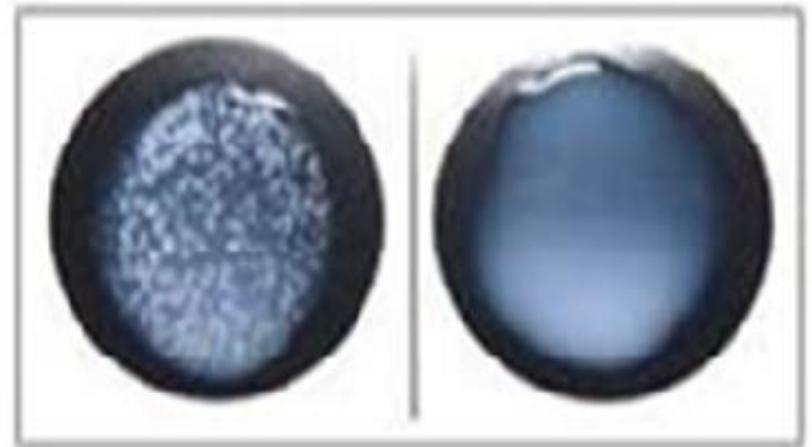
Существует несколько вариантов реакции агглютинации:

- **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



## **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 37<sup>0</sup>С в течение 2 часов, далее при комнатной температуре 16-18ч

## Проведение развернутой реакции агглютинации

Реакцию проводят в пробирках или в планшетах

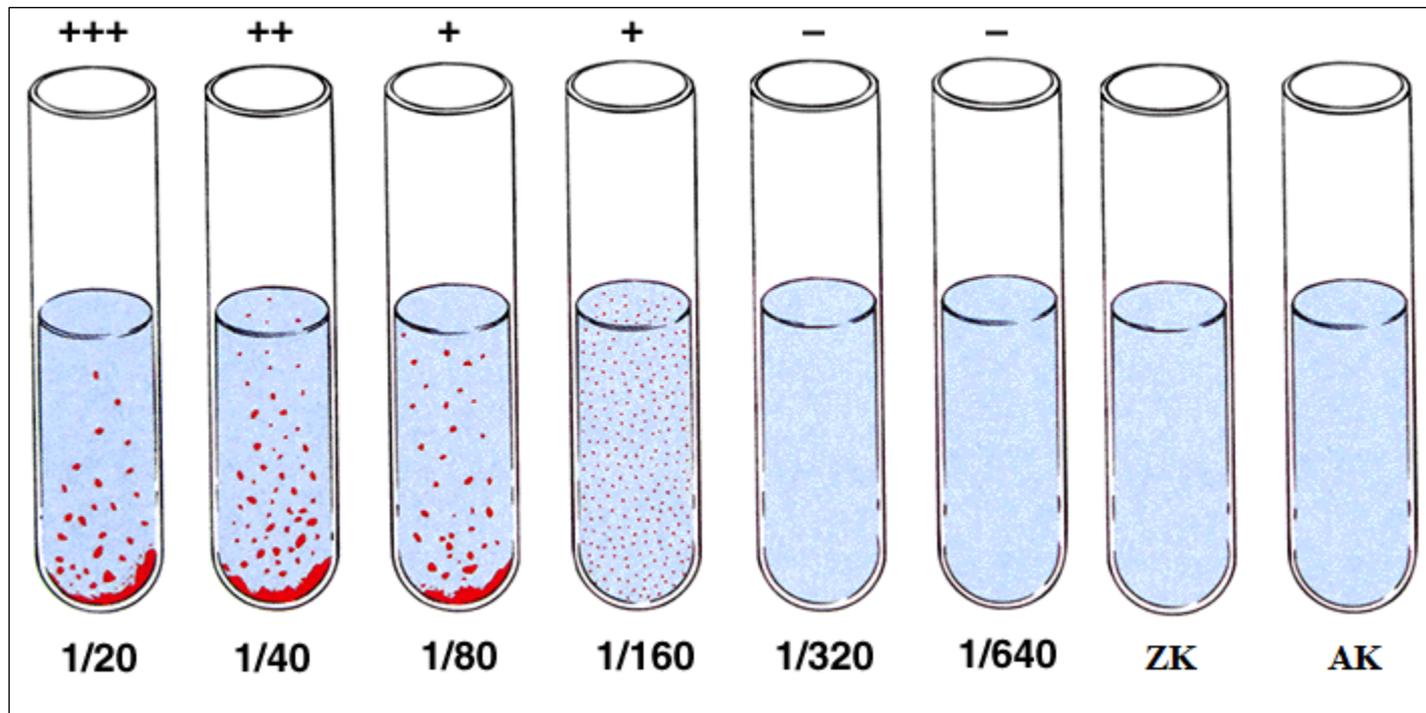
- В каждую из пробирок добавляют 1 мл физиологического раствора
- Затем 1 мл рабочего разведения сыворотки добавляют в 1-ю пробирку, смешивают, берут 1 мл и переносят во 2-ю пробирку, со 2-ой в 3-ю, с 3-ей в 4-ую и т. д. из последней же пробирки удаляется 1 мл. Таким образом, получают 1:20, 1:40, 1:80, 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:

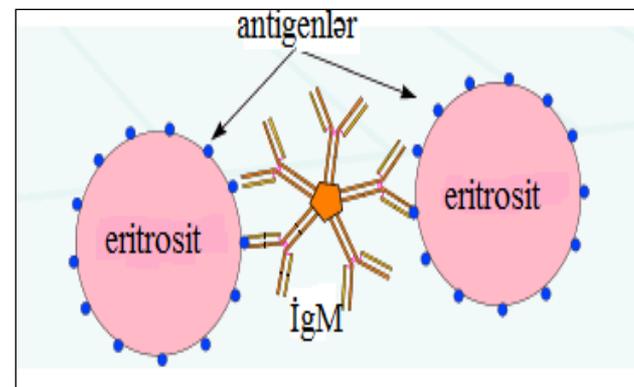
- (++++) - полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями;
- (++++) - почти полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями;
- (++) - агглютинат неотчетливо выражен на фоне мутной жидкости;
- (+) - незначительное количество агглютината на фоне мутной жидкости
- Отсутствие агглютината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

# Развернутая реакция агглютинации (КС -контроль сыворотки, КА-контроль антигена)



# 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.



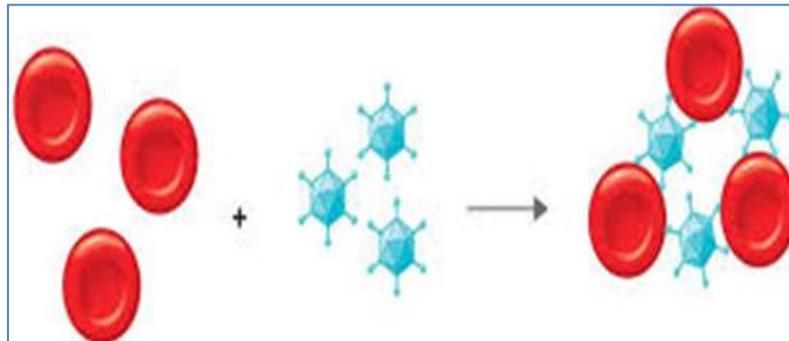
# Реакция гемагглютинации

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

- ***Серологическая реакция гемагглютинации*** – основана на взаимодействии антигенов эритроцитов (гемагглютиногенов) с антителами в сыворотке крови (гемагглютинидами) 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.

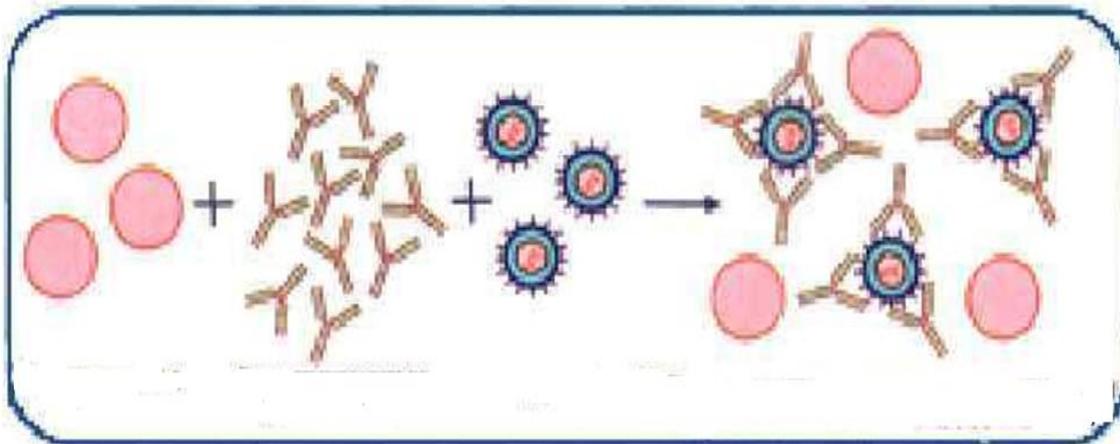
# Техника не серологической реакции гемагглютинации

- Реакцию ставят в лунках плексигласового планшета
- В лунки вносят двухкратные разведения вирусосодержащего 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



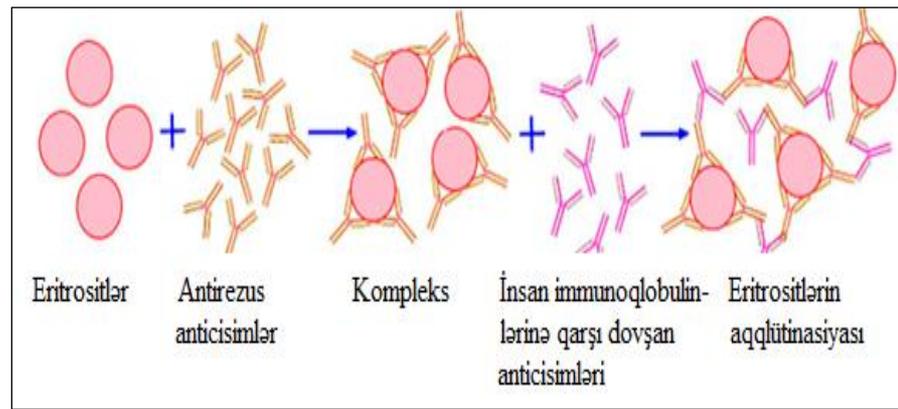
# Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

- 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 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.

# Реакция преципитации

- 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

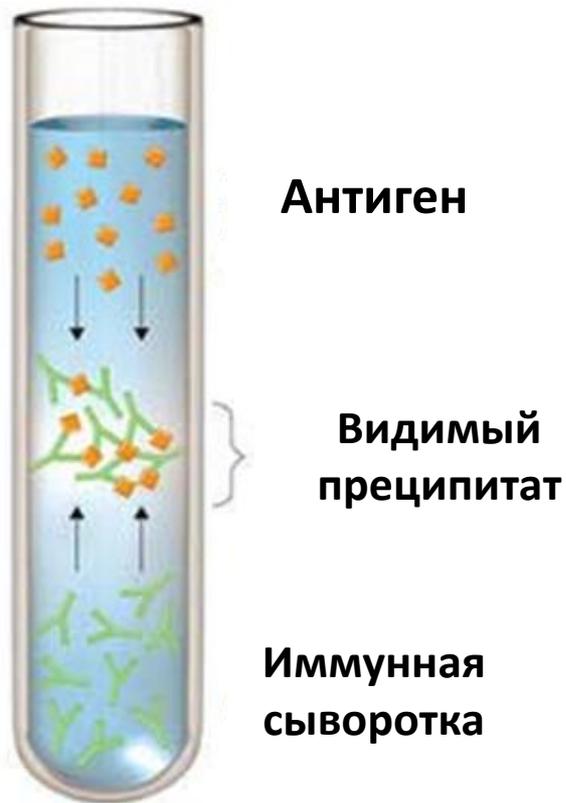
# Реакция кольцепреципитации

- 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 кольцепреципитации



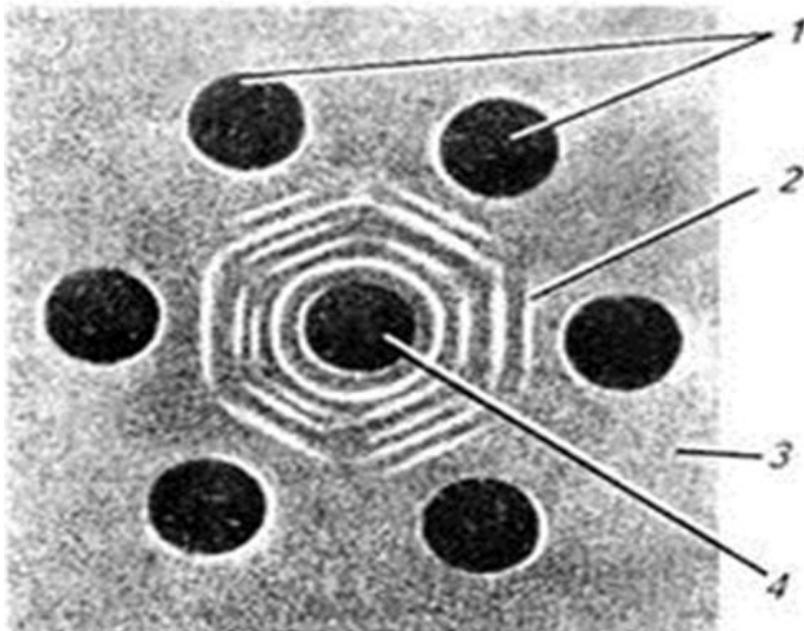
# Реакция преципитации в агаре (геле)

- 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

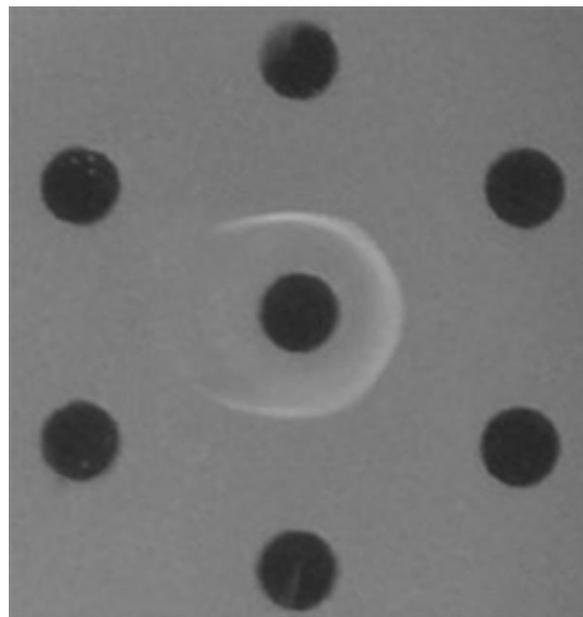
- Реакцию ставят в геле на стеклах или чашках Петри
- В слое геля вырезают лунки, в которые отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу.
- В месте встречи компонентов реакции в эквивалентных соотношениях образуется преципитат в виде белой полосы.

# Двойная иммунодиффузия по Оухтерлони



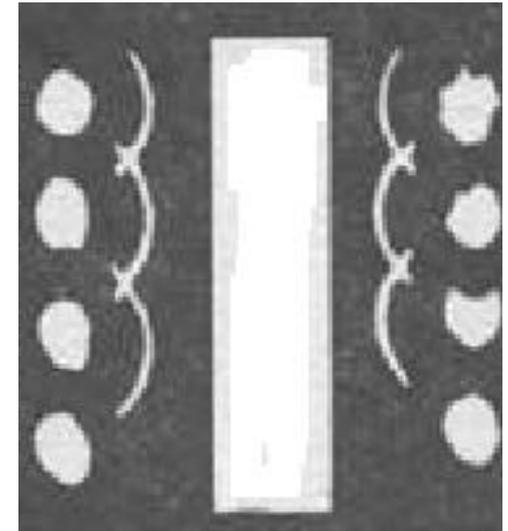
1. Лунки с искомым антигеном
2. Линии преципитата
3. Слой агарозного геля
4. Лунка с иммунной сывороткой

# Двойная иммунодиффузия по Оухтерлони



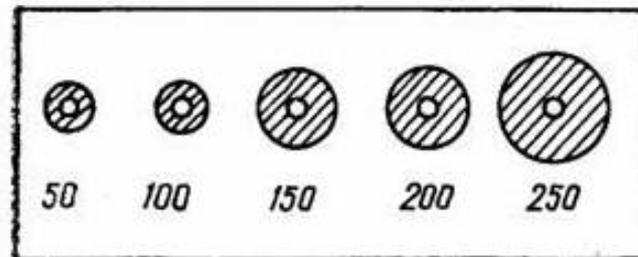
# Определение токсигенности возбудителя дифтерии с помощью реакции преципитации в геле

- Токсигенность штаммов возбудителей дифтерии, выделенных от больных, определяют с помощью **метода Элека**.
- Для этого полосу 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

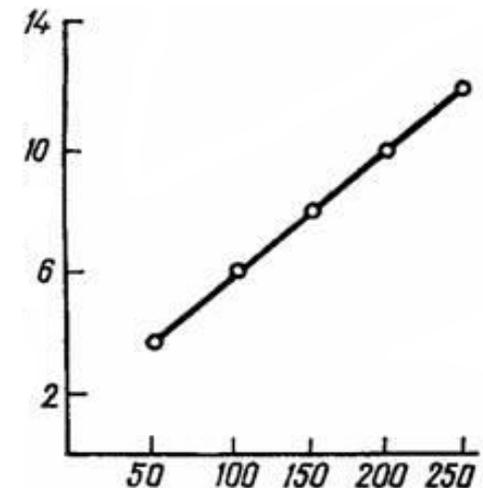


# Реакция радиальной иммунодиффузии

- Иммунную сыворотку смешивают с расплавленным и охлажденным до  $40^{\circ}\text{C}$  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).



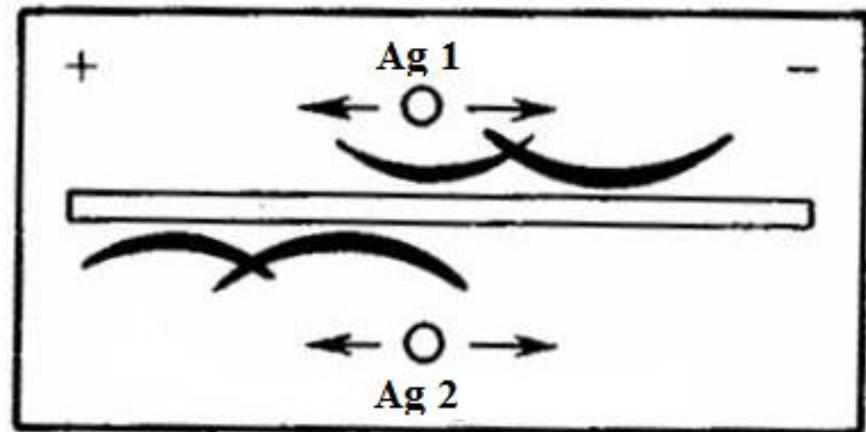
А



В

# Иммуноэлектрофорез

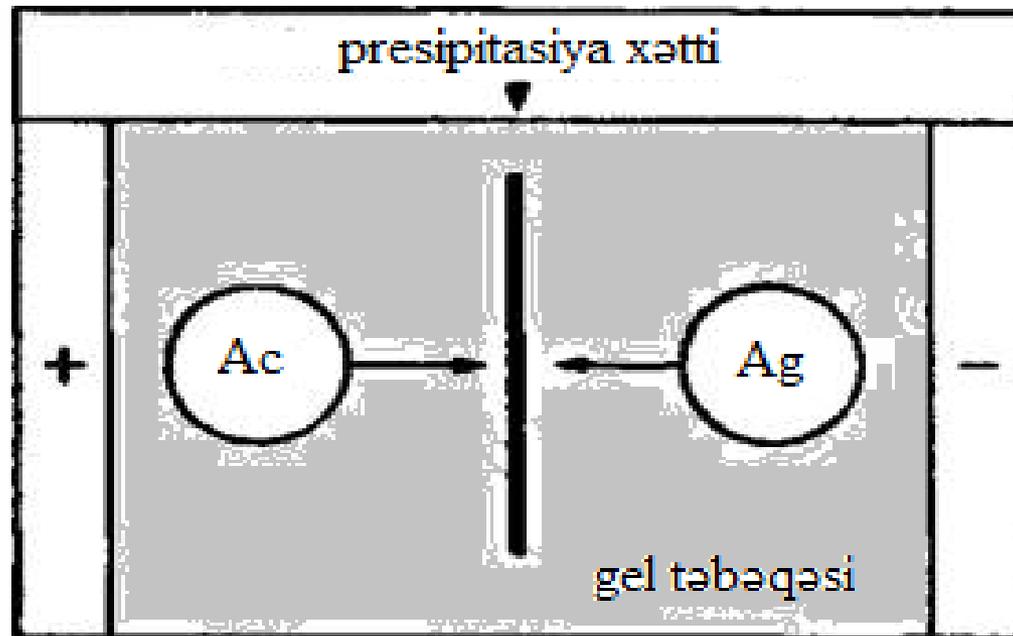
- **Иммуноэлектрофорез** – сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации; смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза.
- Затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой, диффундируя в гель, образуют в месте «встречи»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

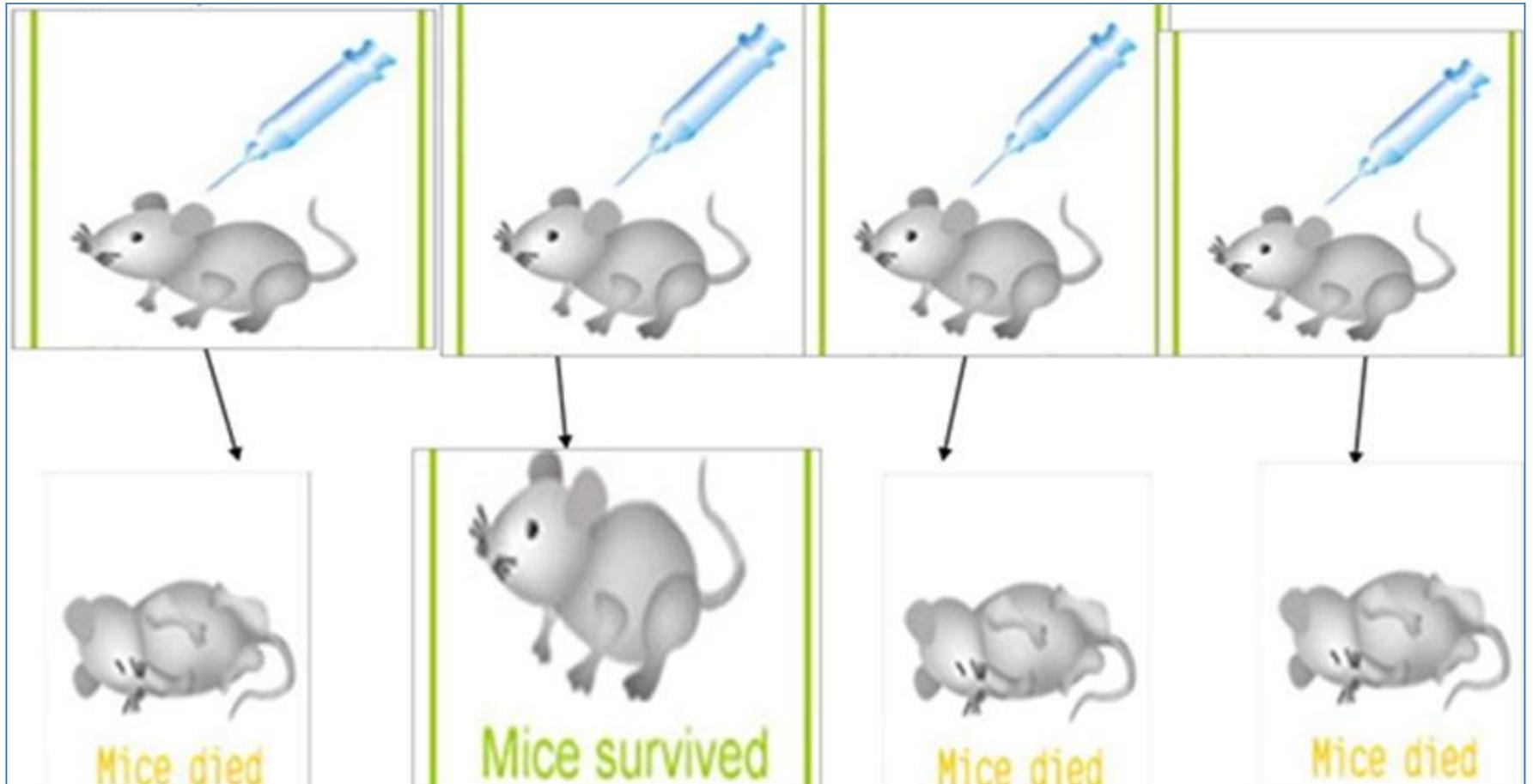
# Встречный иммуноэлектрофорез



# Реакция нейтрализации

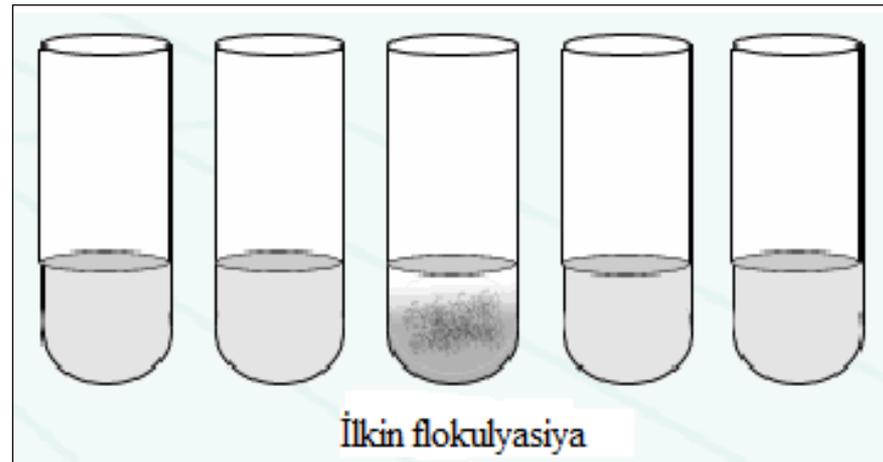
- Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие микробов или их токсинов на чувствительные клетки и ткани, что связано с блокадой микробных антигенов антителами, т. е. их **нейтрализацией**. Реакцию нейтрализации (РН) проводят путем введения смеси антиген-антитело животным 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 нейтрализации токсина антитоксином *in vivo*



# Реакция флокуляции

- **Реакция флокуляции** (от лат. *floccus* — хлопья шерсти) — появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммунопреципитации) в пробирке (*in vitro*) 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 эквивалентном соотношении, наблюдают помутнение. Таким образом, зная концентрацию антитоксической сыворотки, можно рассчитать концентрацию анатоксина



# 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)

- Реакция основана 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 (C), 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)

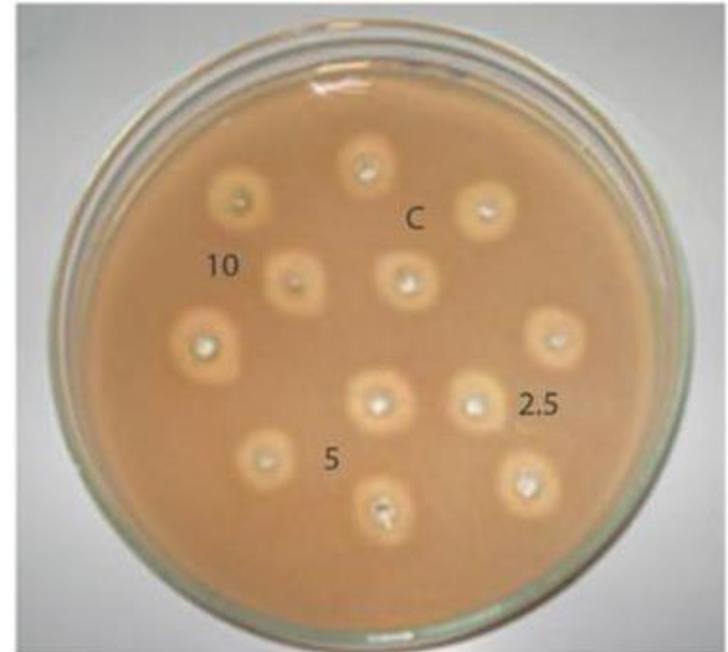
- РСК представляет собой сложную реакцию состоящую из 2-ух серологических реакций. Одна из этих реакций является основной, а другая – индикаторной реакцией.
- К инактивированной и разбавленной сыворотке пациента добавляются соответствующий антиген и комплемент.
- После инкубации к смеси добавляют гемолитическую 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

# 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.

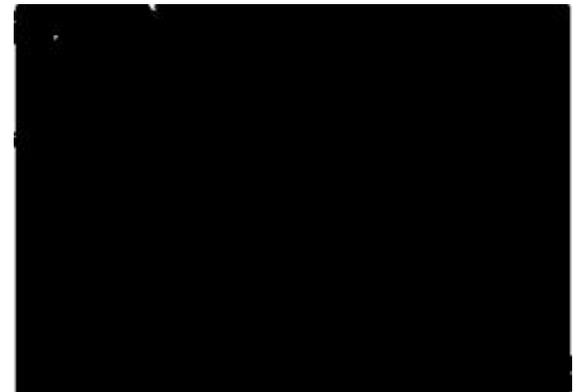
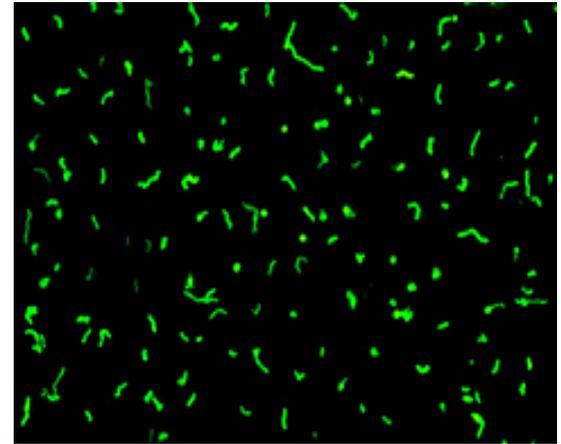


# Реакции с использованием меченых антител или антигенов

- 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.

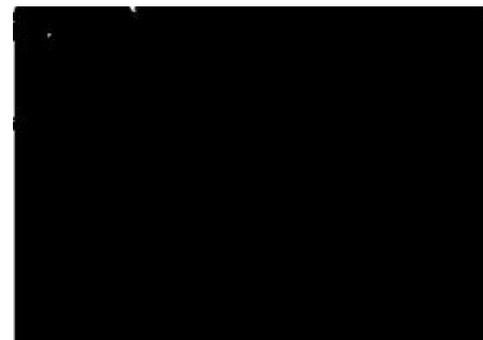
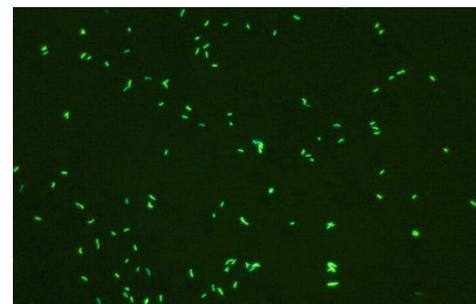
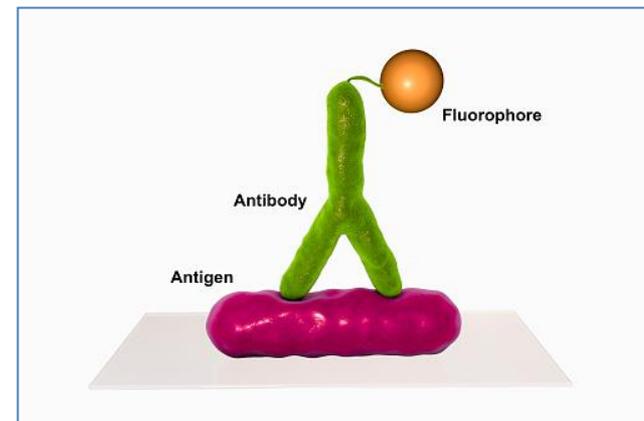
# Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

- 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.



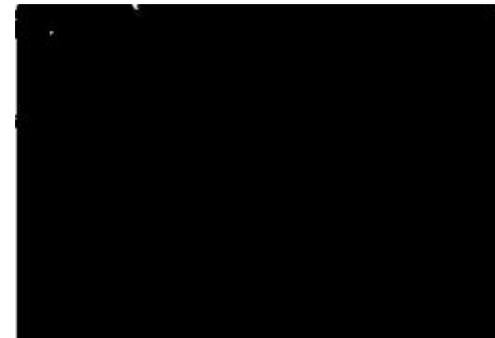
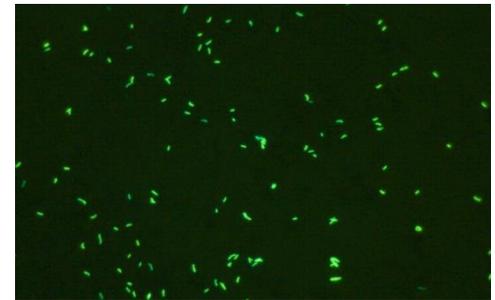
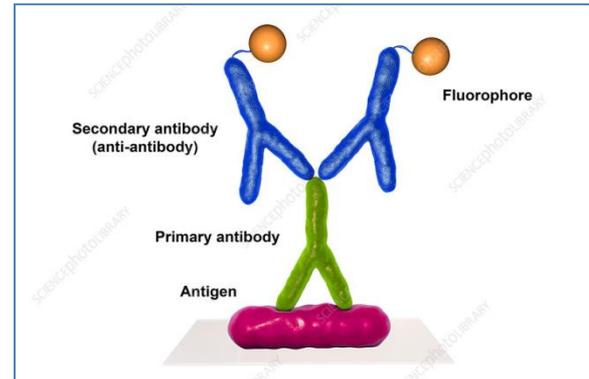
# РИФ (прямой метод)

- **Прямой метод** РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными 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



# Иммуноферментный анализ (ИФА)

- Метод ИФА позволяет обнаруживать антигены с помощью меченых ферментами антител. Наиболее часто для этого используют пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и  $\beta$ -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 сенсibilизировать не только антигеном, но и антителами. Тогда в лунки с сорбированными антителами вносят искомый антиген, добавляют иммунную сыворотку против

# Радиоиммунологический метод (РИМ)

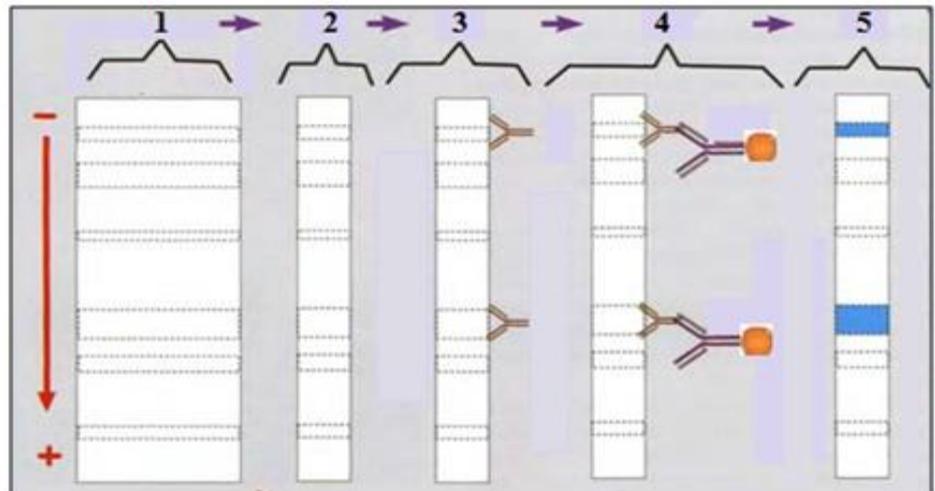
- Высококочувствительный метод, основанный на реакции антиген–антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  и др.). После их взаимодействия отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике ( $\beta$ - или  $\gamma$ -излучение): интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

# Радиоиммунологический метод (РИМ)

- 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.

# Иммуноблоттинг

**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.



# 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 °С (в случае применения термостабильной *Tag-*

# 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