



*МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ.*

ПРИКЛАДНАЯ ИММУНОЛОГИЯ.

ИММУНОДИАГНОСТИКА

РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- Диагностические методы исследования, основанные на специфическом взаимодействии антигенов и антител
- Широко используются для лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней, определения групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, видовой принадлежности белка, распознавания аллергии и аутоиммунных болезней, беременности, гормональных нарушений, а также в научно-исследовательской работе.
- Включают серологические исследования, или серологические реакции, к которым относят обычно реакции прямого воздействия антигенов и антител сыворотки крови *in vitro*.



Цели и задачи серологического метода. Механизм и фазы реакции «АНТИГЕН-АНТИТЕЛО»



- В микробиологической практике широкое распространение получили иммунологические методы диагностики
- Особое место занимают серологические реакции.



СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

- Serum – сыворотка.
- В этих реакциях участвуют два специфических комплементарных по отношению друг к другу компонента: АГ и соответствующее ему АТ.
- Они составляют одну систему по типу «ключ-замок»
- Серологические реакции протекают в 2 фазы
- Обязательное условие – присутствие электролитов



ФАЗЫ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

1 фаза. Специфическая.

- Происходит взаимодействие АГ-нных детерминантных групп с активными центрами специфических иммуноглобулинов, сформировавшихся под влиянием этого АГ. Последние образуются в ответ на поступление в организм этого АГ. Видимых изменений не происходит.

2 фаза. Неспецифическая.

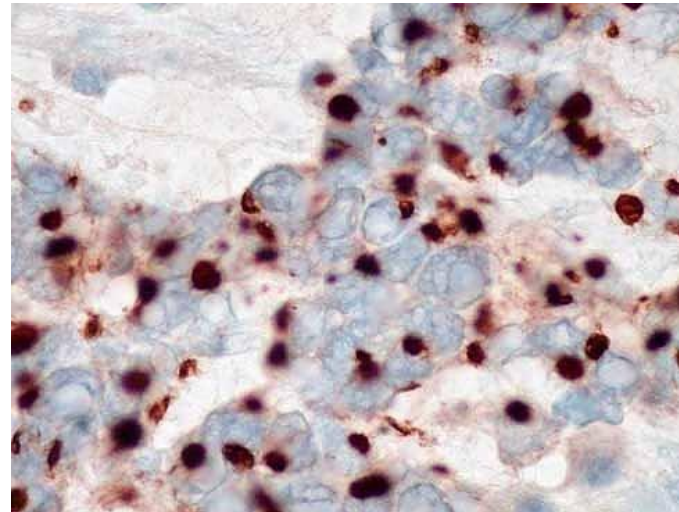
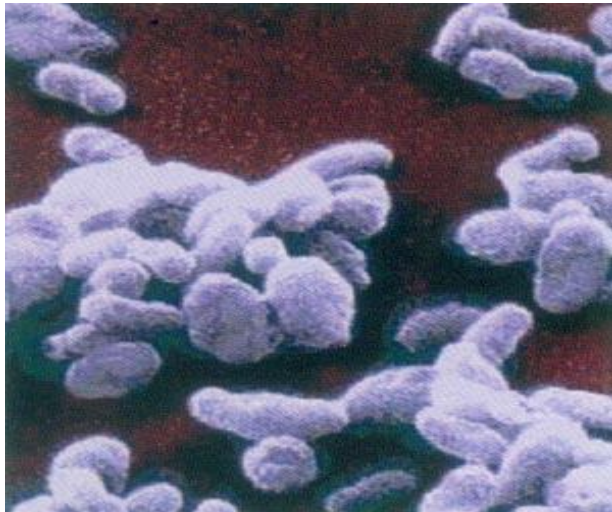
- Комплекс АГ+АТ взаимодействует с неспецифическими факторами среды, в которой происходит укрупнение частиц в результате чего реакция становится видимой. Видимые изменения могут быть разными



ЗАДАЧИ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА

- Поиск неизвестного АГ по известному АТ
- Поиск неизвестного АТ по известному АГ

- Широко используется в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний



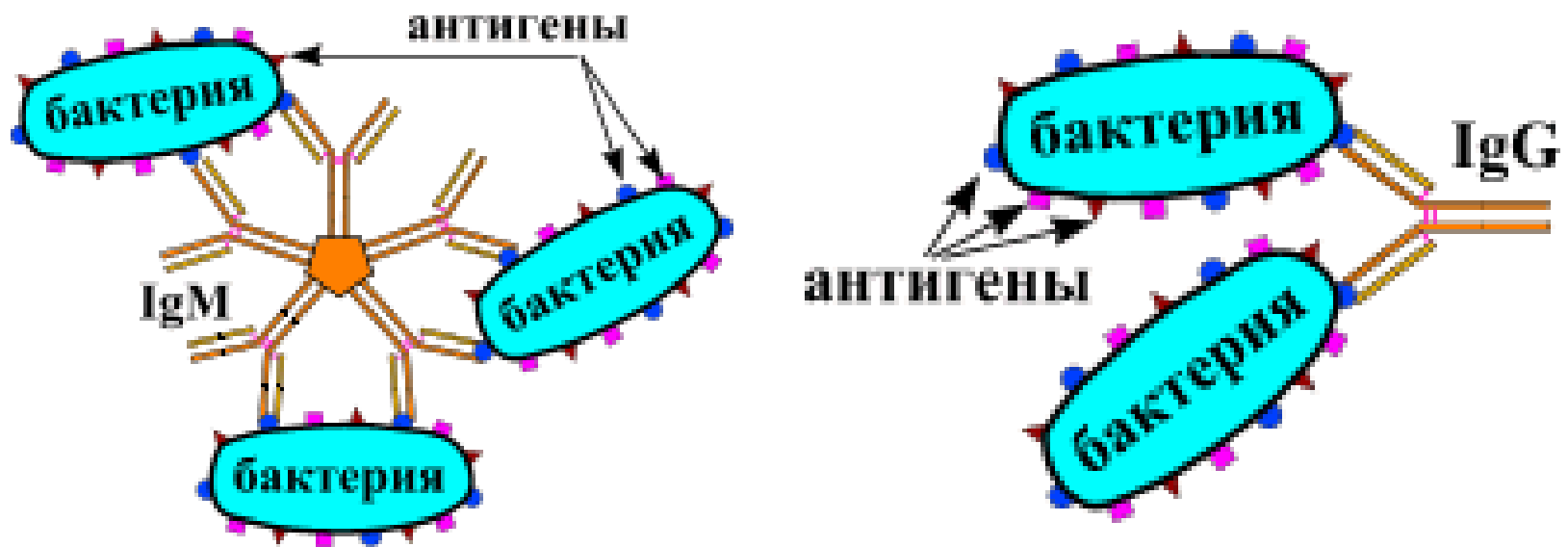
КЛАССИФИКАЦИЯ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УЧАСТВУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ И УСЛОВИЙ СРЕДЫ

Тип реакции	Особенности антигена, его величина	Неспецифические компоненты реакции	
Реакции 1-го порядка – двухкомпонентные: АГ+АТ			
Агглютинация Гемагглютинация	Бактерии Эритроциты	Корпускулы, крупные частицы	Электролиты (изотонический раствор)
Преципитация Нейтрализация	Белки, экстракты органов и тканей, лизаты, гаптены, токсины, вирусы	Молекулы, растворимые в электролите	Электролиты (изотонический раствор)
Реакции 2-го порядка – трехкомпонентные: АГ+АТ+Со			
Реакции иммунного лизиса: бактериолиз, гемолиз, цитолиз	Бактерии, эритроциты, другие клетки	Клетки	Электролиты (изотонический раствор) и комплемент
Реакция связывания комплемента (РСК)	Гаптены, экстракты, лизаты, полные антигены, клетки	Любого размера	Электролиты (изотонический раствор) и комплемент



1. РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА)

Реакция агглютинации (от лат. agglutinatio – склеивание) – склеивание корпускул (бактерий, эритроцитов и др.) антителами в присутствии электролитов – NaCl.



Реакция агглютинации проявляется в виде хлопьев или осадка, состоящих из корпускул (например, бактерий), “склеенных” антителами.

Реакции агглютинации используют для:

- определения возбудителя, выделенного от больного;
- определения антител в сыворотке крови больного;
- определения групп крови

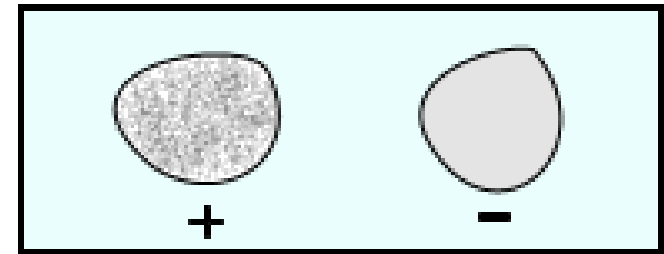
Компоненты реакции агглютинации:

- АГ – исследуемый (неизвестный) материал, содержащий возбудитель болезни, т.е. сам микроб (*при идентификации микробов*) или бактериальный диагностикум (*при серодиагностике*)
- АГ – известная агглютинирующая сыворотка (*при идентификации микробов*) или исследуемая сыворотка, содержащая неизвестные антитела (*при серодиагностике*)
- Физиологический раствор NaCl с pH=7,0-7,4



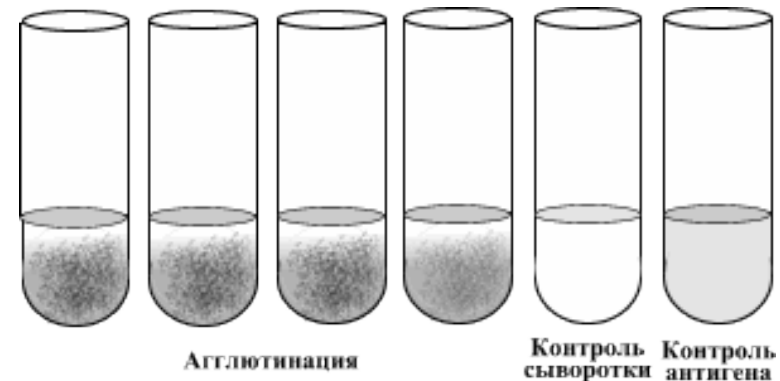
1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ БОЛЬНЫХ

Ориентировочная реакция агглютинации на стекле. К капле агглютинирующей сыворотки (разведение 1:20) добавляют взвесь бактерий, выделенных от больного. Образуется хлопьевидный осадок.



Агглютинация положительная Контроль (нет агглютинации)

Развернутая реакция агглютинации с возбудителем, выделенным от больного. К разведениям агглютинирующей сыворотки добавляют взвесь бактерий, выделенных от больного.

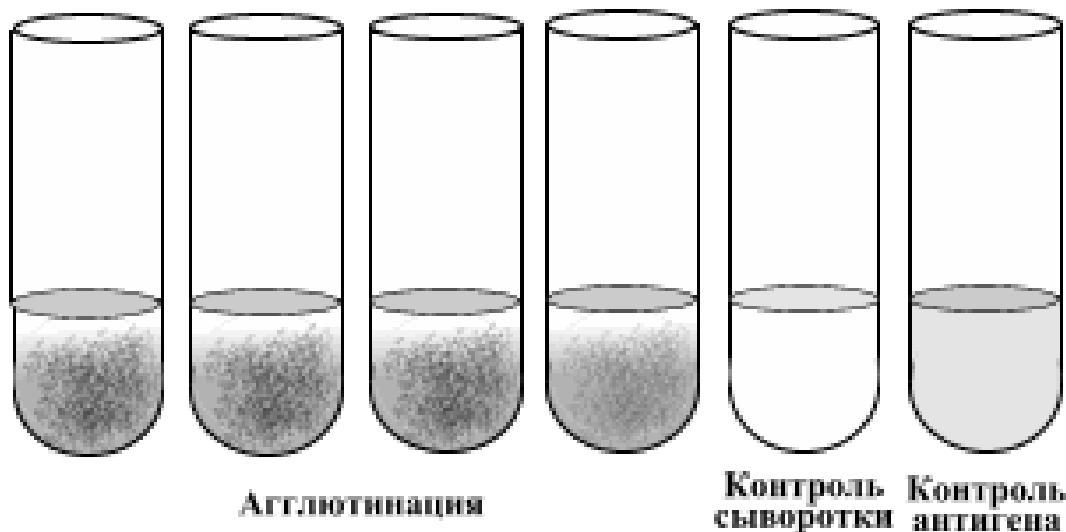


1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНОГО

Развернутая реакция агглютинации с сывороткой крови больного. К разведениям сыворотки больного добавляют диагностикум.

- Агглютинация с **O-диагностикумом** (бактерии, убитые нагреванием, сохранившие O-антиген) происходит в виде мелкозернистой агглютинации.

- Агглютинация с **H-диагностикумом** (бактерии, убитые формалином, сохранившие жгутиковый H-антиген) – крупнохлопчатая и протекает быстрее.



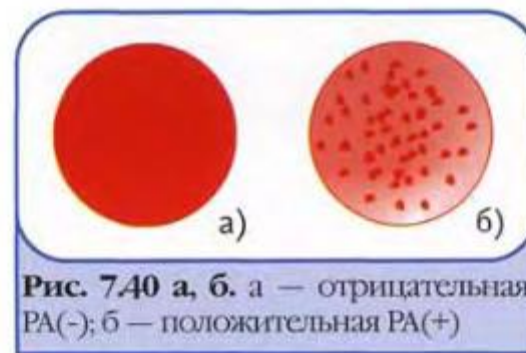
1.3. РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУПП КРОВИ

Реакцию агглютинации для определения групп крови применяют для установления системы АВ₀ с помощью агглютинации эритроцитов антителами иммунной сыворотки против антигенов групп крови А(II), В(III).

Контролем служат:

- сыворотка, не содержащая антител, т.е. сыворотка АВ(IV) группы крови;
- антигены, содержащиеся в эритроцитах групп А(II), В(III).
- Отрицательный контроль не содержит антигенов, т.е. используют эритроциты группы о(I).

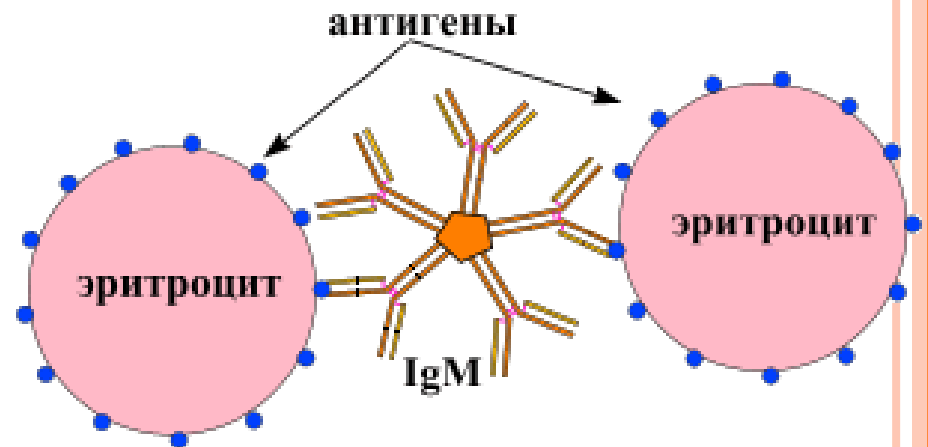
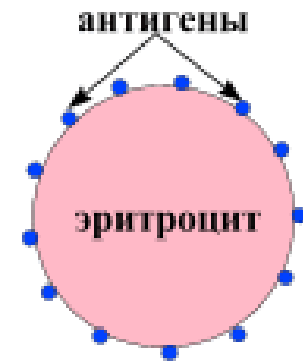
Результаты реакции				Групповая принадлежность исследуемой крови
эритроцитов со стандартными сыворотками		сыворотки (плазмы) со стандартными эритроцитами		
анти-А	анти-В	А (II)	В (III)	
-	-	+	+	О (I)
+	-	-	+	А (II)
-	+	+	-	В (III)
+	+	-	-	АВ (IV)



2. РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ (ПАССИВНОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РНГА, РПГА)

В РНГА выявляют антитела сыворотки крови с помощью **антигенного эритроцитарного диагностикума**, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами.

Эритроциты (или частицы латекса) с адсорбированными на них антигенами взаимодействуют с соответствующими антителами сыворотки крови, что вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде *фестончатого осадка*. При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде пуговки (монетных столбиков).



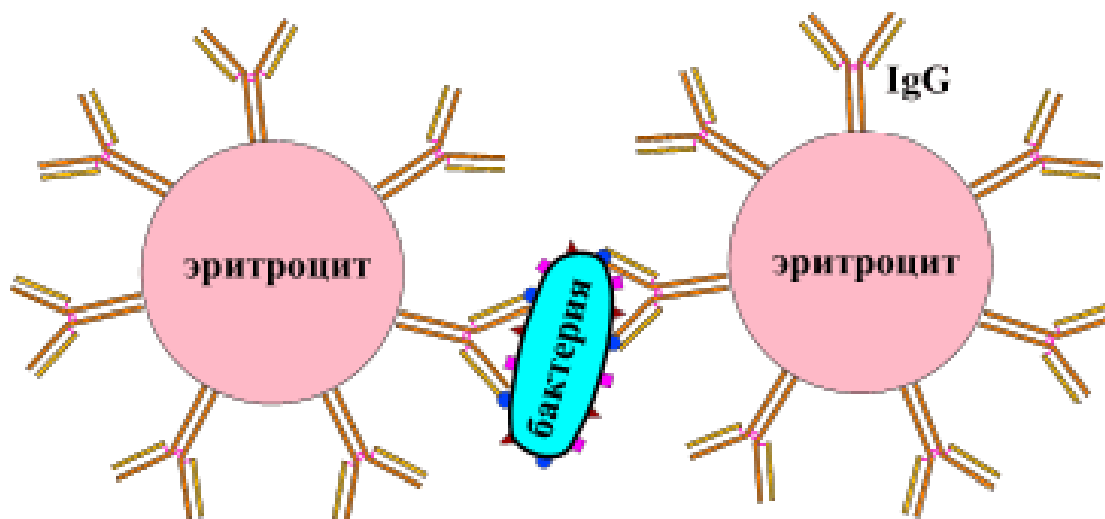
РНГА ставят на **плексигласовых пластинках с лунками** (реже в пробирках). Исследуемую сыворотку предварительно инактивируют при 56С в течение 30 мин., **разводят от 1:20 до 1:2000 и более**, разливают в лунки по 0,5 мл. К каждому разведению добавляют по 0,1 мл эритроцитарного диагностикума. Реакцию выдерживают в течение 2 часов при 37С.



РНГА применяют:

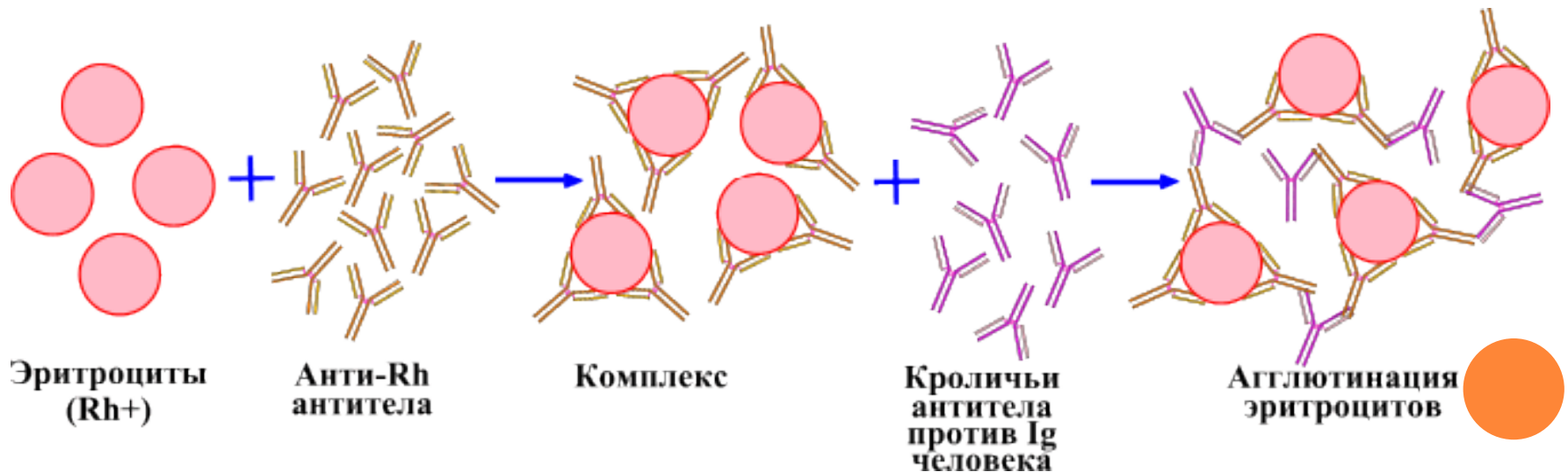
1. Для серодиагностики инфекционных заболеваний, иммунологической идентификации АТ, определения титра иммунных сывороток
2. Для ускорения обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды (возбудителей чумы, туляремии, бруцеллеза, дизентерии и др.)

Иногда применяют **антительный эритроцитарный диагностикум** - эритроциты, на которых адсорбированы антитела. Например, можно обнаружить **ботулинический токсин**, добавляя к нему эритроцитарный антительный ботулинический диагностикум (такую реакцию называют **реакцией обратной непрямой гемагглютинации – РОНГА**).



3. РЕАКЦИЯ КУМБСА (АНТИГЛОБУЛИНОВЫЙ ТЕСТ)

У некоторых больных обнаруживают антирезусные антитела, которые являются **неполными**, одновалентными. Они специфически взаимодействуют с резус-положительными эритроцитами (Rh+), но не вызывают их агглютинации. Наличие таких неполных антител определяют в *непрямой реакции Кумбса*. Для этого в систему антирезусные антитела + резус-положительные эритроциты добавляют *антиглобулиновую сыворотку* (антитела против иммуноглобулинов человека), что вызывает агглютинацию эритроцитов.



ЗНАЧЕНИЕ РЕАКЦИИ КУМБСА

1. С помощью реакции Кумбса диагностируют патологические состояния, связанные с *внутрисосудистым лизисом эритроцитов*, например, *гемолитическую болезнь новорожденных*: эритроциты резус-положительного плода соединяются с циркулирующими в крови неполными антителами к резус-фактору, которые перешли через плаценту от резус-отрицательной матери
2. Можно также выявлять неполные антитела против антигенов микробов (например, при бруцеллезе)



4. РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

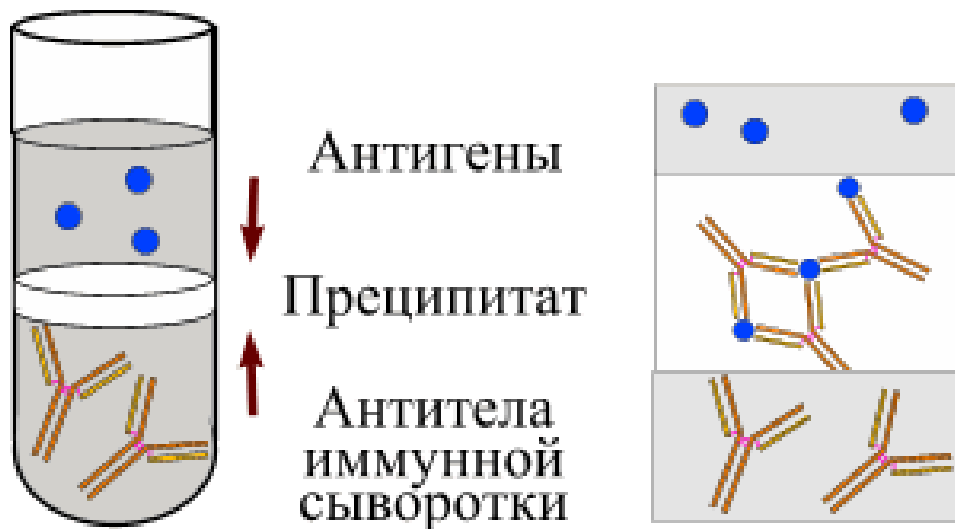
Преципитация – взаимодействие мелкодисперсных, растворимых антигенов (*преципитиногенов*) специфическими антителами (*преципитинами*) в присутствии электролитов с формированием и осаждением комплекса в виде помутнения, называемого *преципитатом*. Он образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах!

В качестве антигенов выступают растворимые белки, ЛПС и др. коллоидные растворы, в отличие от РА, где АГ выступает клетка (бактерии, эритроцит и др.)

Реакция служит для определения АГ по известной преципитирующей сыворотке, полученной путем иммунизации животных соответствующими АГ.

4.1. РЕАКЦИЯ КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ

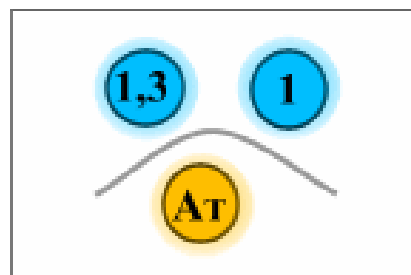
Реакцию проводят в узких *преципитационных пробирках*: на иммунную сыворотку наслаивают растворимый антиген. При оптимальном соотношении антигена и антител на границе этих двух растворов образуется непрозрачное **кольцо преципитата**. Если в качестве антигенов в реакции используют прокипяченные и профильтрованные экстракты тканей, то такая реакция называется *реакцией термопреципитации* (реакция Асколи, при которой выявляют сибиреязвенный гаптен).



4.2. РЕАКЦИЯ ДВОЙНОЙ ИММУНОДИФФУЗИИ ПО ОУХТЕРЛОНИ

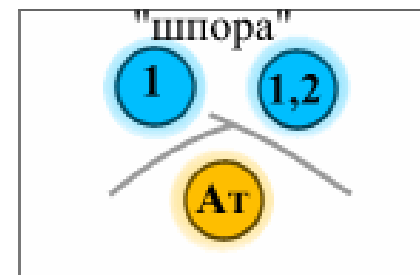
Для постановки реакции растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку и после затвердевания в нем вырезают лунки. В лунки геля отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу. В месте встречи в эквивалентных соотношениях они образуют **преципитат в виде белой полосы**. У многокомпонентных систем между лунками с антигенами и антителами появляется несколько линий преципитата; у идентичных АГ линии преципитата сливаются; у неидентичных АГ - пересекаются.

1. Идентичные эпитопы антигенов



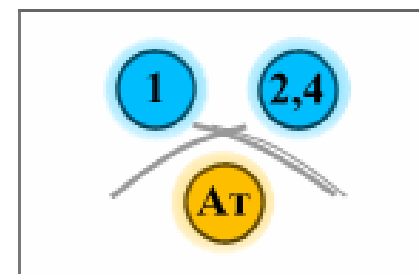
Анти-1

2. Частично идентичные эпитопы антигенов



Анти-1,2

3. Неидентичные антигены



Анти-1,2,4



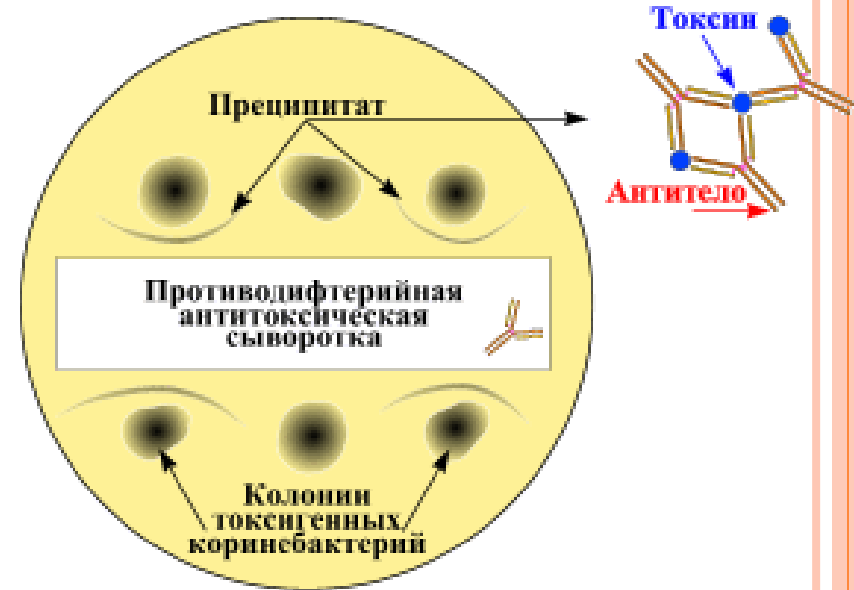
МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИГЕННОСТИ ДИФТЕРИЙНОЙ ПАЛОЧКИ

Штаммы *C.diphtheriae* могут быть токсигенными (продуцирующими экзотоксин) и нетоксигенными.

Образование экзотоксина зависит от наличия в бактериях *профага*, несущего *tox-ген*, кодирующий

образование экзотоксина.

При заболевании все изоляты тестируются на токсигенность - продукцию дифтерийного экзотоксина.

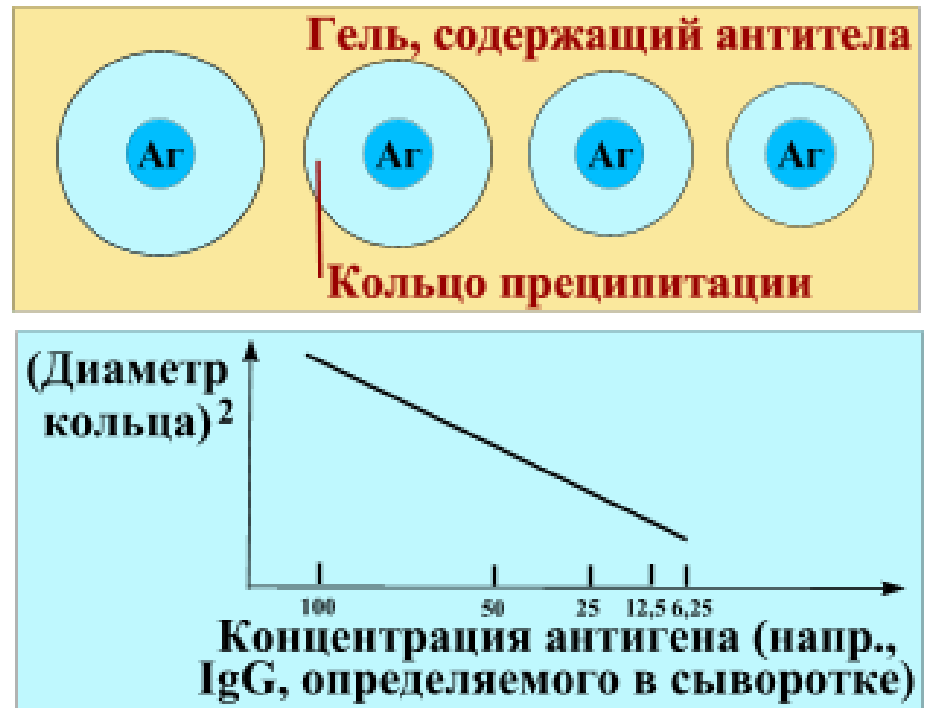


Определение токсигенности дифтерийной палочки (преципитация в агаре).
В центре - колонии нетоксигенного штамма.



4.3. РЕАКЦИЯ РАДИАЛЬНОЙ ИММУНОДИФФУЗИИ

Иммунную сыворотку с расплавленным агаровым гелем равномерно наливают на стекло. После застывания в геле делают лунки, в которые помещают антиген в различных разведениях. Антиген, диффундируя в гель, образует с антителами **кольцевые зоны преципитации** вокруг лунок. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена.



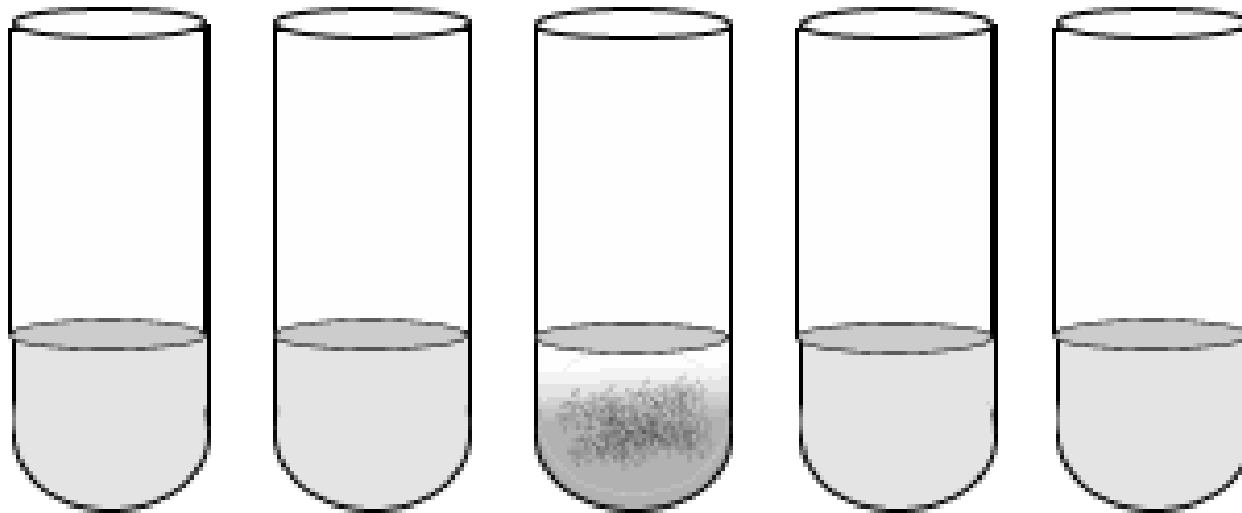
Реакцию используют для определения в сыворотке крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента и др.



4.4. РЕАКЦИЯ ФЛОККУЛЯЦИИ (ПО РАМОНУ)

-появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммунопреципитации) в пробирке при реакции **токсин — антитоксин** или **анатоксин — антитоксин**.

-Ее применяют для определения активности антитоксической сыворотки или анатоксина.



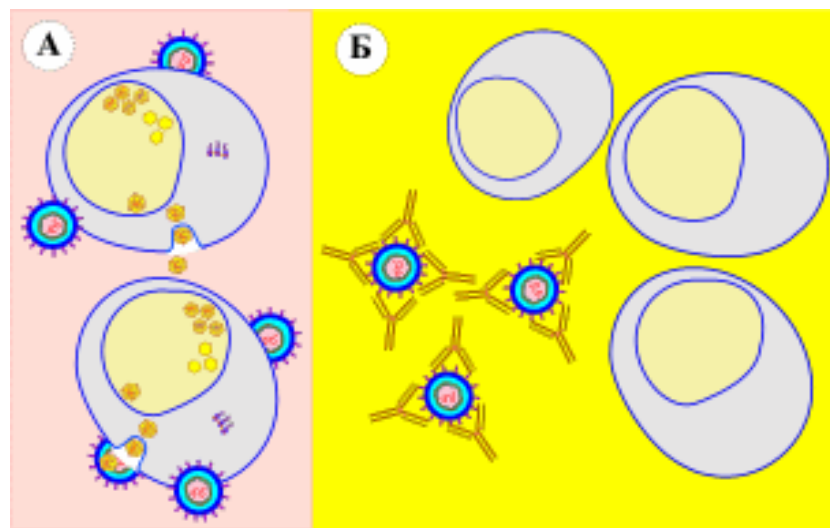
Инициальная
флоккуляция



5. 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). При отсутствии у животных и тест-объектов повреждающего действия микроорганизмов или их антигенов, токсинов говорят о нейтрализующем действии иммунной сыворотки и, следовательно, о специфичности взаимодействия комплекса антиген — антитело



Реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток:

А - цитопатогенный эффект (ЦПЭ) в результате размножения вирусов;
Б - ЦПЭ отсутствует в результате нейтрализации вирусов антителами.

6. РЕАКЦИИ ИММУННОГО ЛИЗИСА

Реакция иммунного лизиса - растворение жизнеспособных клеток (корпускулярных антигенов), соединенных со специфическими антителами, в присутствии комплемента.

В зависимости от участвующих антигенов различают *реакции бактериолиза и гемолиза*

Реакции иммунного лизиса и связывания комплемента протекают при обязательном участии комплемента (дополнительный фактор).


Комплемент - сложная система белков сыворотки крови, относится к неспецифическим факторам резистентности, обладающая ферментативной активностью.

6.1. РЕАКЦИЯ ИММУННОГО ГЕМОЛИЗА

Реакция иммунного гемолиза – растворение эритроцитов в присутствии специфических антител - гемолизинов и комплемента. При образовании комплекса *антиген (эритроциты) + антитело (гемолизины)* происходит присоединение компонентов комплемента (активация по классическому пути).

Сформировавшийся **мембранатакующий комплекс (МАК)** воздействует на мембрану эритроцитов, через образовавшиеся поры содержимое эритроцитов выходит наружу и происходит гемолиз.

Реакция иммунного гемолиза участвует в реакции связывания комплемента в качестве индикаторной системы.



6.2. РЕАКЦИЯ ИММУННОГО БАКТЕРИОЛИЗА

Реакция бактериолиза – растворение бактерий в присутствии специфических антител – *бактериолизин*ов и *комплемента*

Иммунный лизис бактерий можно наблюдать как в организме животного (*in vivo*), так и в пробирке (*in vitro*).

Ингредиенты реакции: живые бактерии, специфические по отношению к ним антитела (иммунная сыворотка или иммунизированное животное), комплемент.

Как защитная реакция бактериолиз наиболее выражен при *холере, сальмонеллезных инфекциях*.

Многие виды бактерий не способны к лизису, поэтому реакция бактериолиза применяется редко.

7. РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

Реакция связывания комплемента (РСК) заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они образуют **иммунный комплекс**, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется **комплемент (С)**, т.е. происходит связывание комплемента комплексом антиген — антитело. Если же комплекс антиген — антитело не образуется, то комплемент остается свободным.

РСК применяют для диагностики многих инфекционных болезней, в частности *сифилиса (реакция Вассермана)*.



РСК проводят в две фазы:

1. **инкубация смеси**, содержащей АГ + АТ + Комплемент;
2. **индикаторная** — выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана, и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним.

В 1-й фазе реакции при образовании комплекса АГ-АТ происходит связывание им комплемента, и тогда во 2-й фазе гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет (*реакция положительная*). Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исследуемом образце нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз (*реакция отрицательная*)

Схема РСК с сывороткой больного

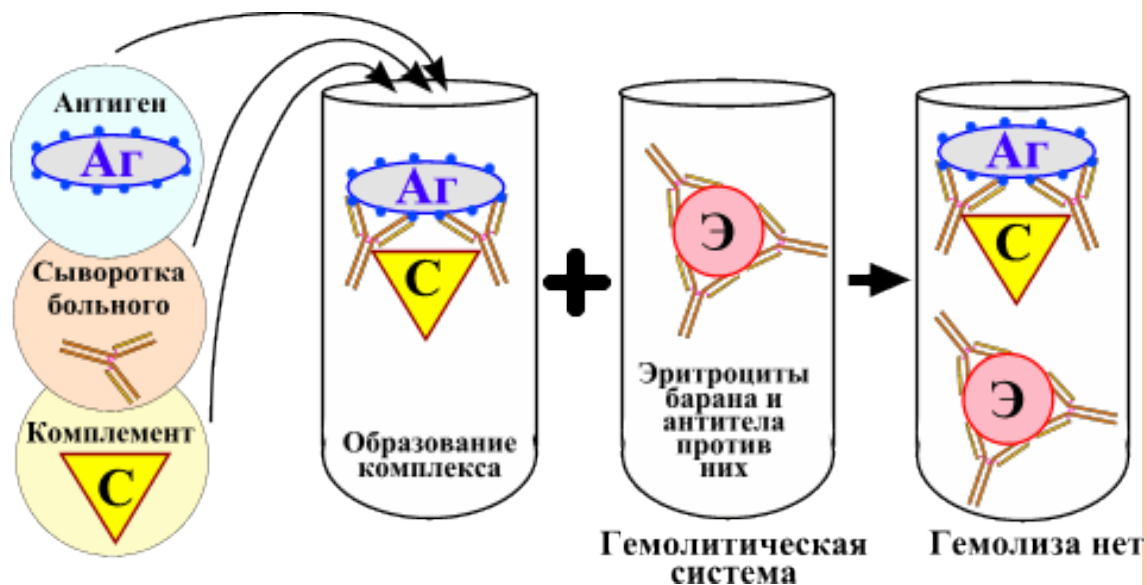
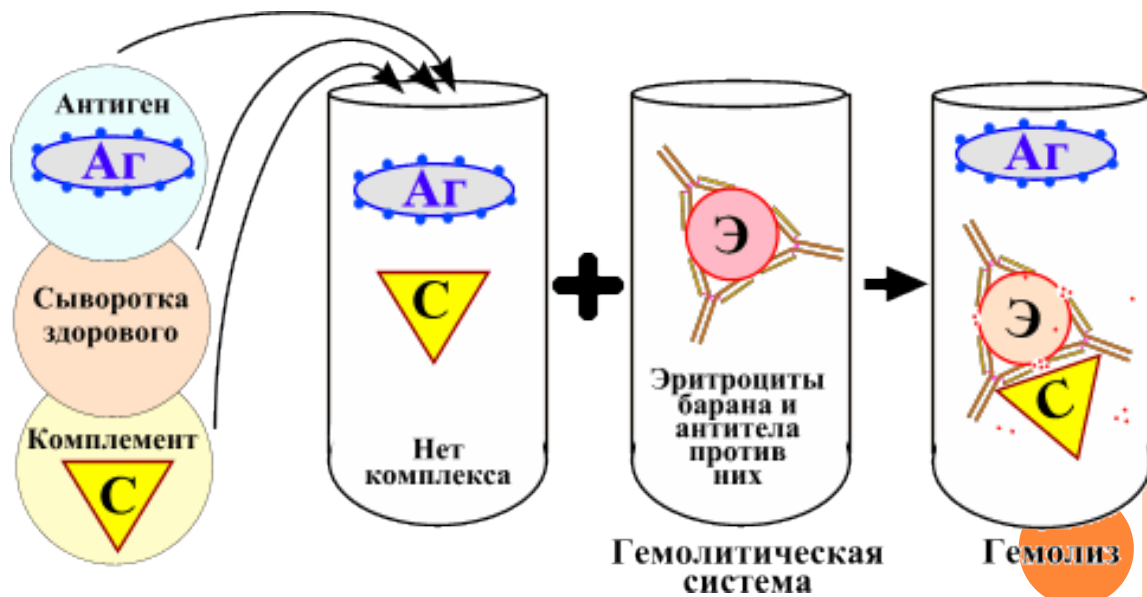


Схема РСК с сывороткой здорового





**СОВРЕМЕННЫЕ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ДИАГНОСТИКИ**

8. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

Метод используется для выявления антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, β -галактозой или щелочной фосфатазой).

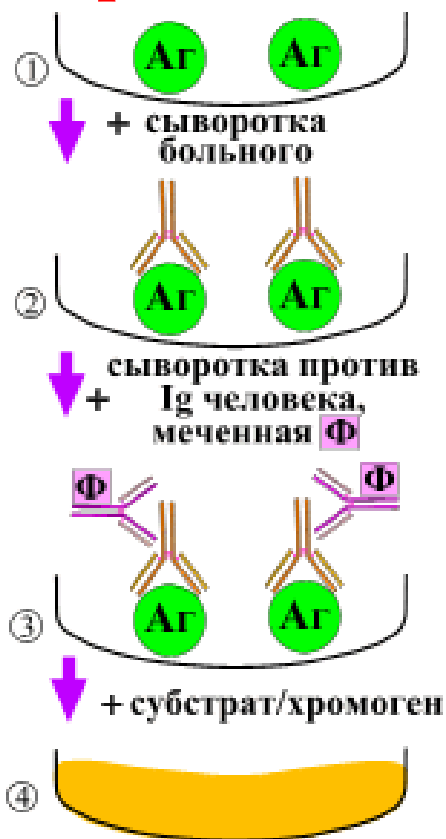
После соединения антигена с меченной ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат и хромоген. Субстрат расщепляется ферментом, а его продукты деградации вызывают химическую модификацию хромогена. При этом хромоген меняет свой цвет – интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител



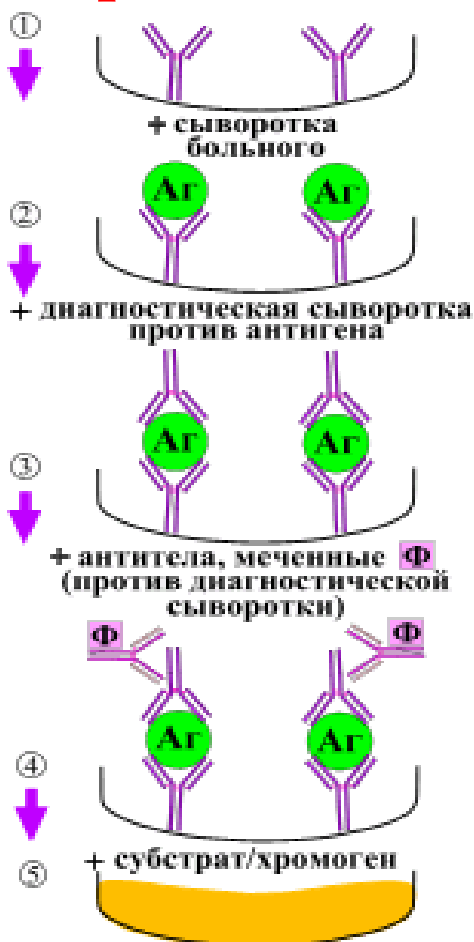
ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИФА

- один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе.

Определение АТ:



Определение Аг:



Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют не связавшиеся реагенты путем тщательного промывания.

При положительном результате изменяется цвет раствора хромогена.



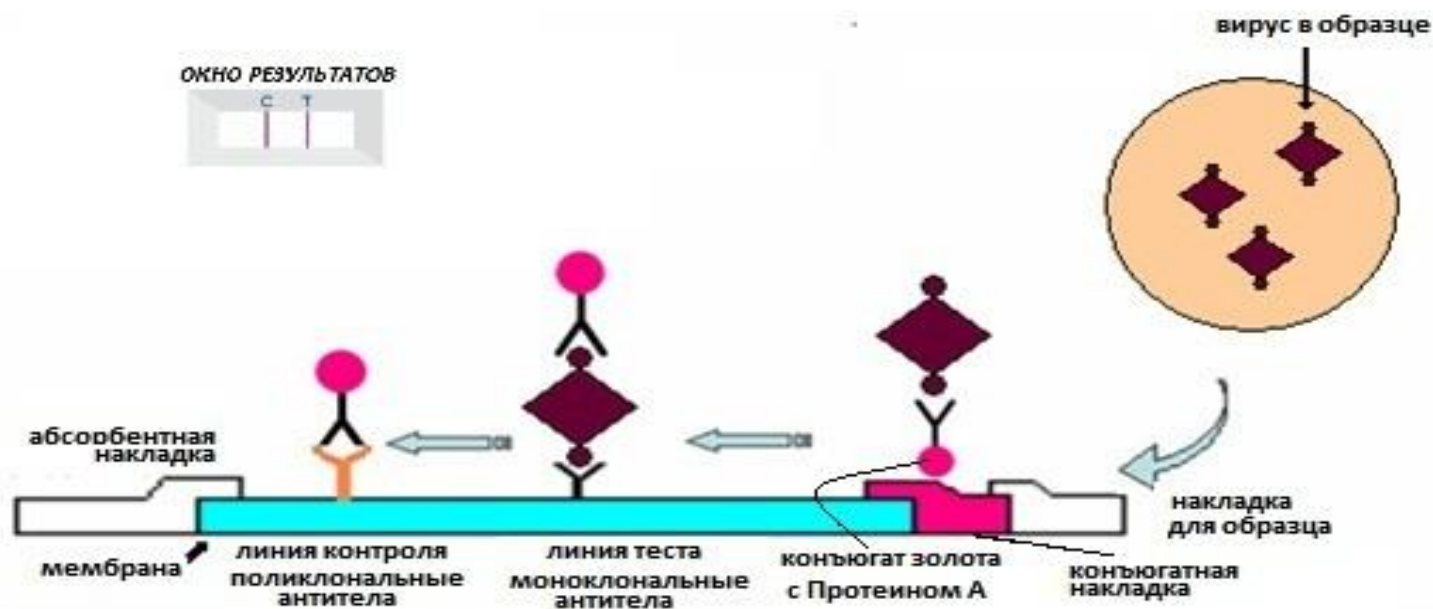
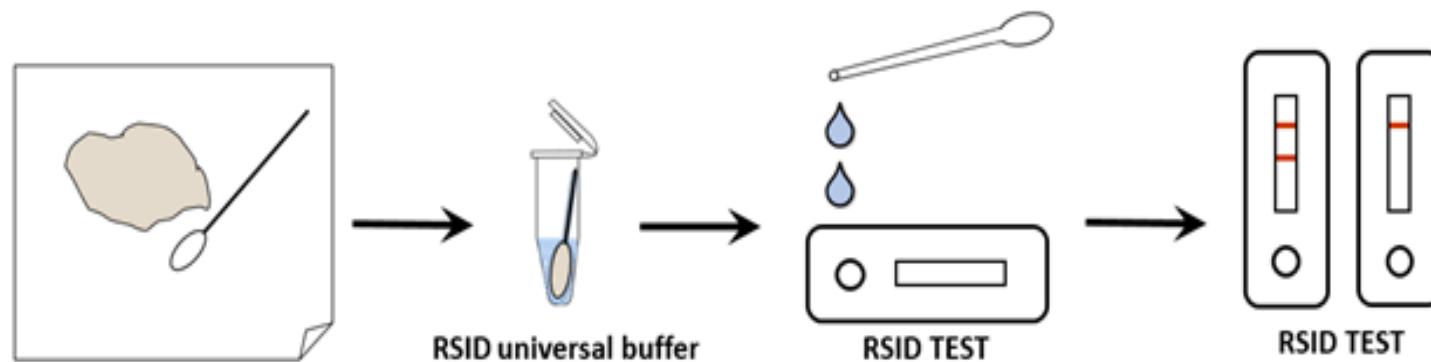
ИФА применяют для:

1. диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней
2. определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях — 10^{10} — 10^{12} г/л.
3. В комплексной оценке иммунного статуса



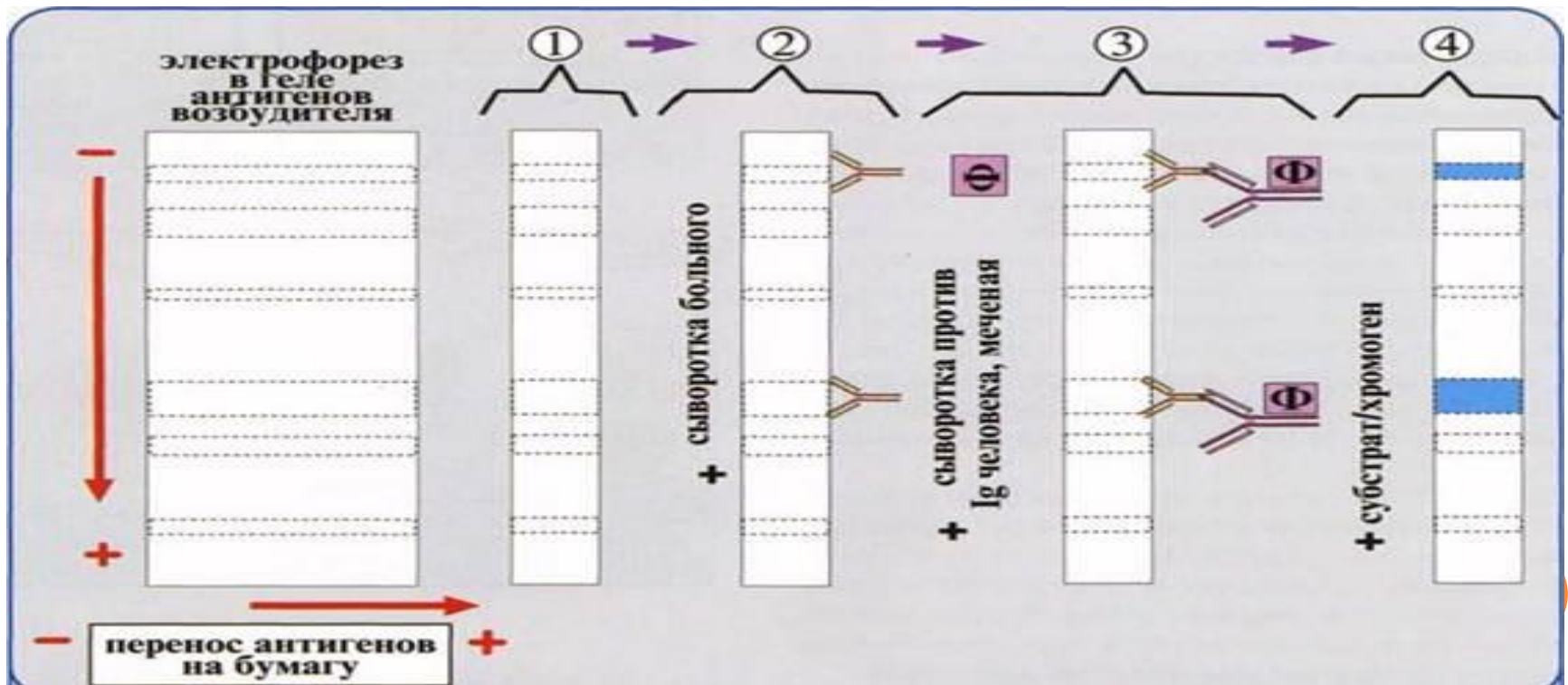
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЯ

- Является разновидностью ИФА

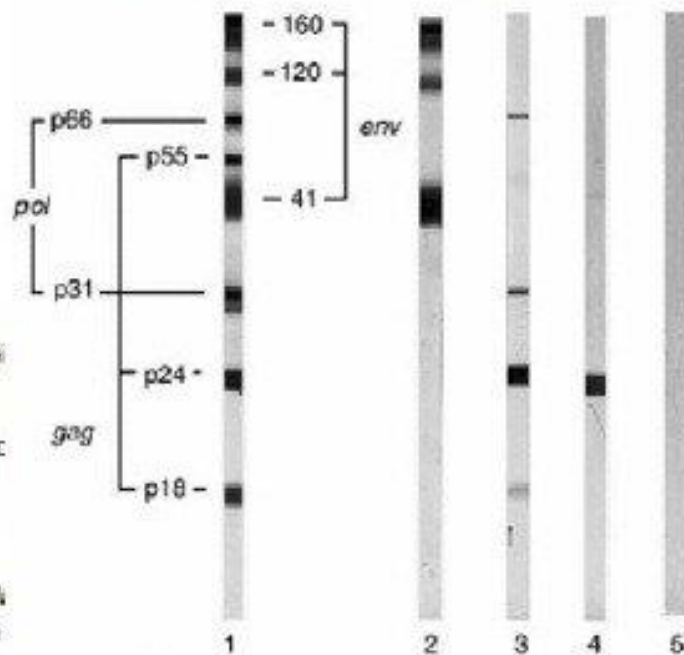
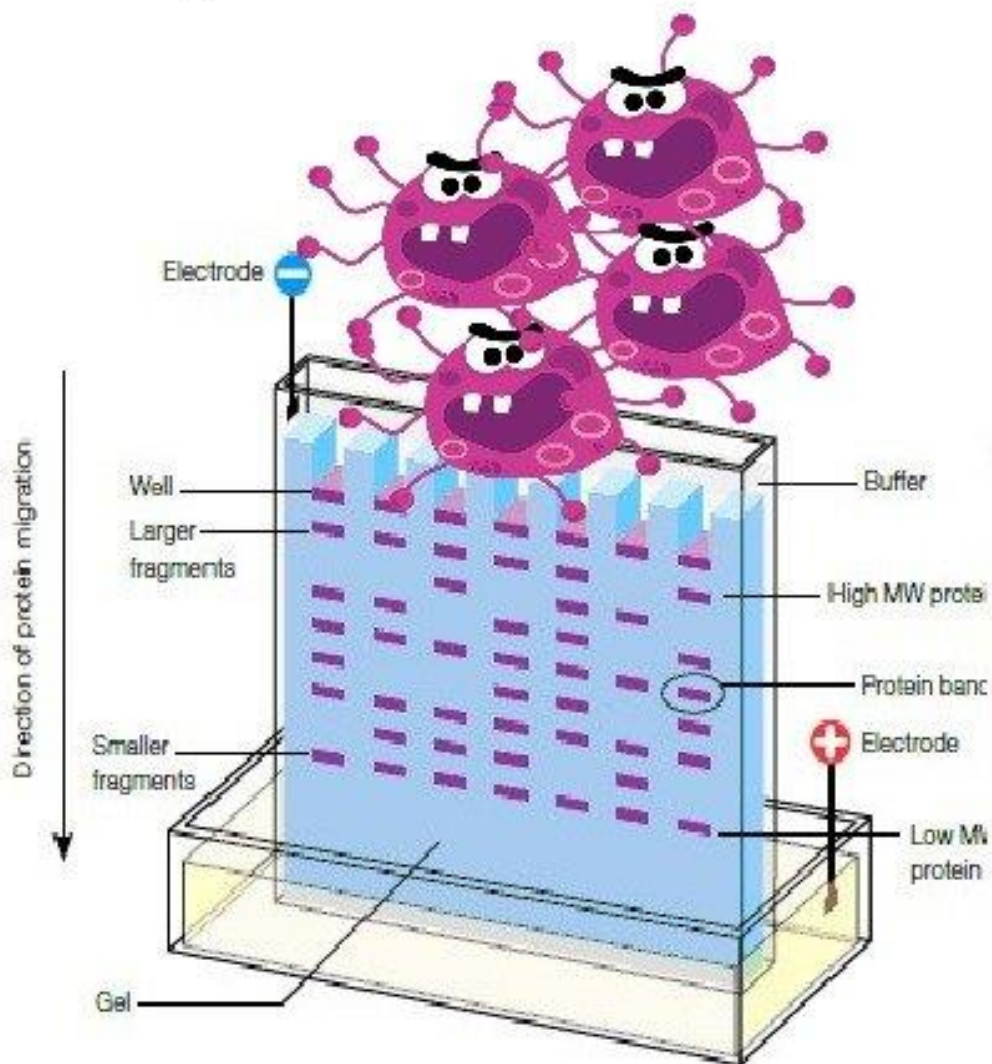
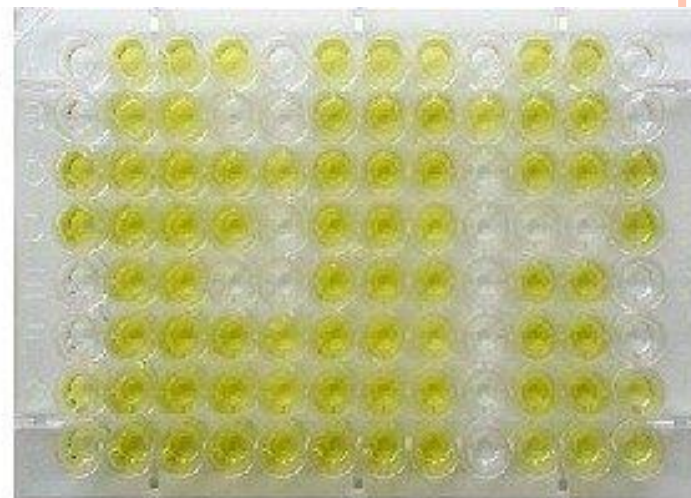


ИММУНОБЛОТТИНГ

- Метод идентификации белков в многокомпонентной смеси.
- Представляет собой сочетание электрофореза и ИФА (чаще) или РИА



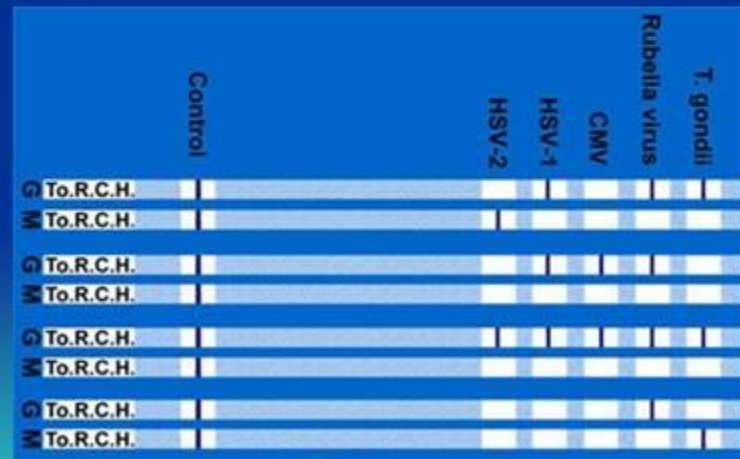
Тест антигена на антигенность- -- - способность узнавать специфические антитела in vitro



**Иммуноблоттинг белков ВИЧ с
сыворотками больных**

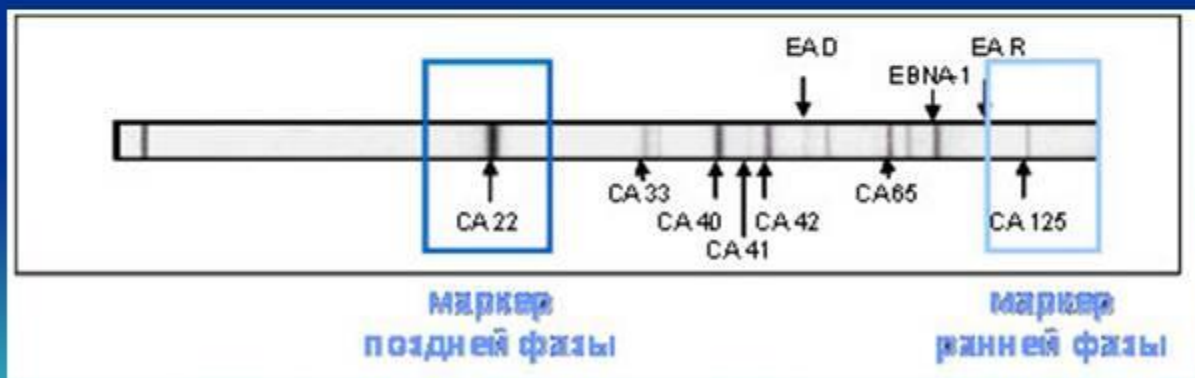
Иммуноблоттинг: виды наборов


Лайн-блот: на тестовые стрип-мембраны нанесены только клинически значимые антигены (нативные, синтетические или рекомбинантные) в определенном порядке. Такой подход используется при дифференциальной диагностике нескольких инфекций на одном стрипе



Иммуноблоттинг: виды наборов

Вестерн-блот: Наборы содержат тестовые стрипсы-мембраны с электрофоретически разделенными нативными антигенами соответствующих инфекционных агентов, т.о. антигены располагаются в порядке молекулярной массы



- 
- ИХЛА – современный метод лабораторной диагностики.
-

- В ИХЛА используется иммунологическая реакция, где в качестве субстрата присоединяются люминофоры - вещества, светящиеся в ультрафиолете.
- Уровень свечения измеряется на специальных приборах люминометрах.
- Метод схожий с ИФА, но обладает **большой специфичностью** и чувствительностью, а также **занимает меньше времени.**

9. РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ, МЕТОДЫ КУНСА)

РИФ основана на соединении антигенов бактерий, риккетсий и вирусов со специфическими антителами, мечеными флуоресцирующими красителями (флуоресцеинизотиоцианат, родамин, сульфохлорид и др.), имеющими реакционно-способные группы (сульфохлорид, изотиоцианит и др.).

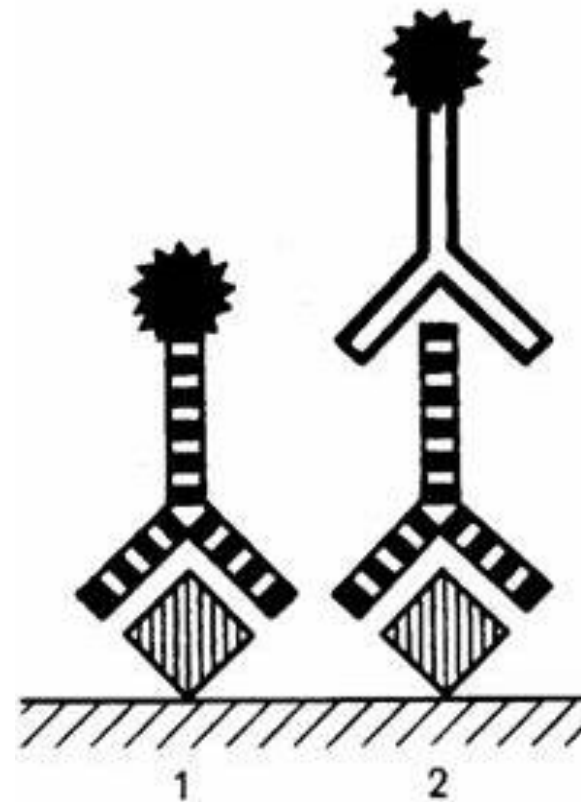
Эти группы соединяются со свободными аминогруппами молекул антител, которые не теряют при обработке флуорохромом специфического средства к соответствующему антигену. *Образовавшиеся комплексы Ag-AT становятся хорошо видимыми, ярко светящимися структурами под люминесцентным микроскопом.*

Прямой метод РИФ основан на непосредственном соединении антигена с меченым антителом (рис 1).

Непрямой метод РИФ - поэтапное выявление комплекса Аг-АТ с помощью флуоресцентных красителей (рис 2):

1 этап: образование иммунных комплексов определенного антигена со специфическими антителами.

2 этап: выявление этого комплекса путем обработки его меченым антигаммаглобулином.





Преимущества РИФ:

- простота
- высокая чувствительность
- скорость получения результата

РИФ применяется как метод ранней **экспресс-диагностики** гриппа, дизентерии, малярии, чумы, туляремии, сифилиса и др.

Для проведения РИФ используется люминесцентный микроскоп.



ПРОТОЧНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

- Это технология быстрого измерения различных параметров клеток или их органелл
- Клеточная суспензия, предварительно обработанная флюоресцентными МКАТ или флюоресцентными красителями, подается к потоковому элементу. Клетки идут одна за другой, где в проточной ячейке их пересекает лазерный луч, под действием которого окрашенные клетки флюоресцируют



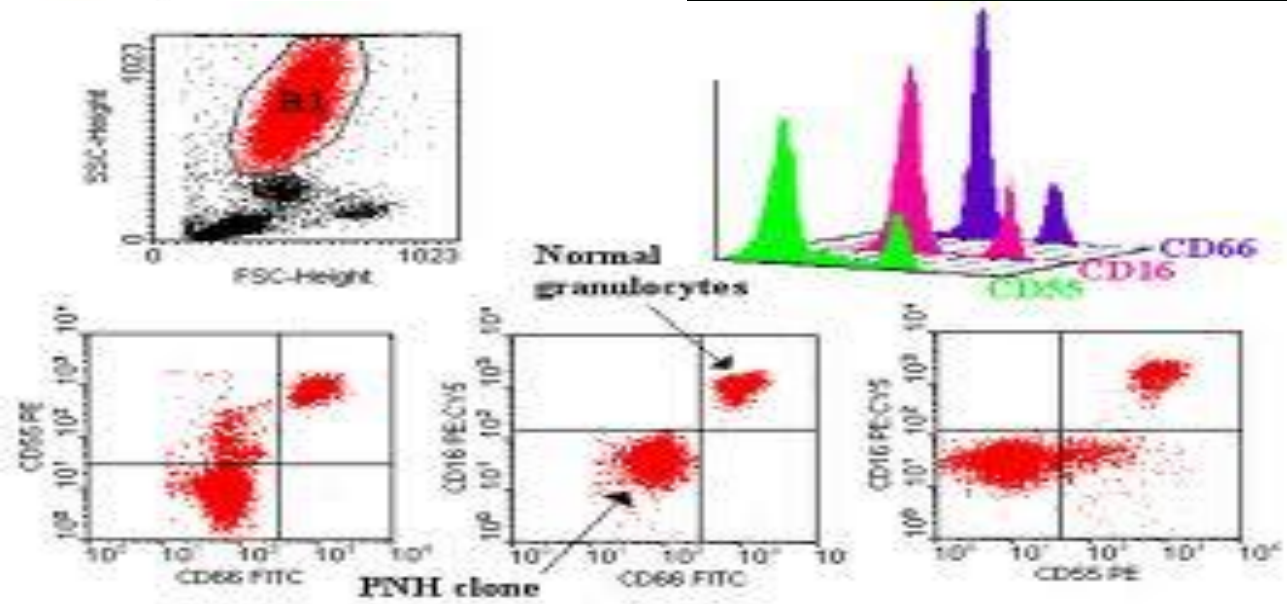
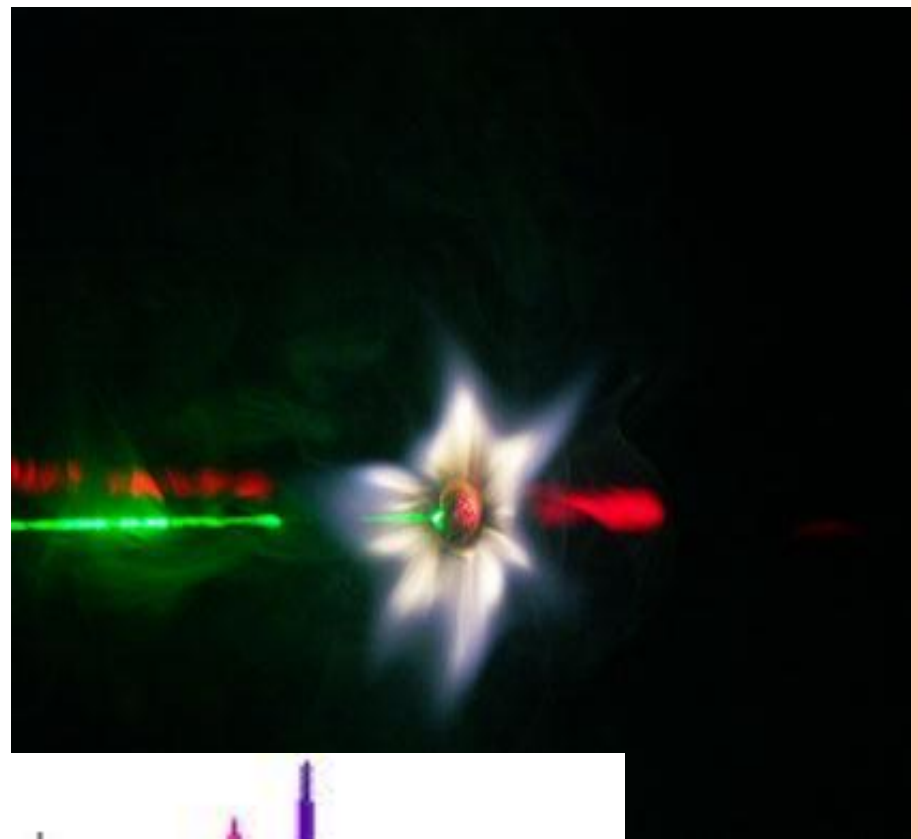
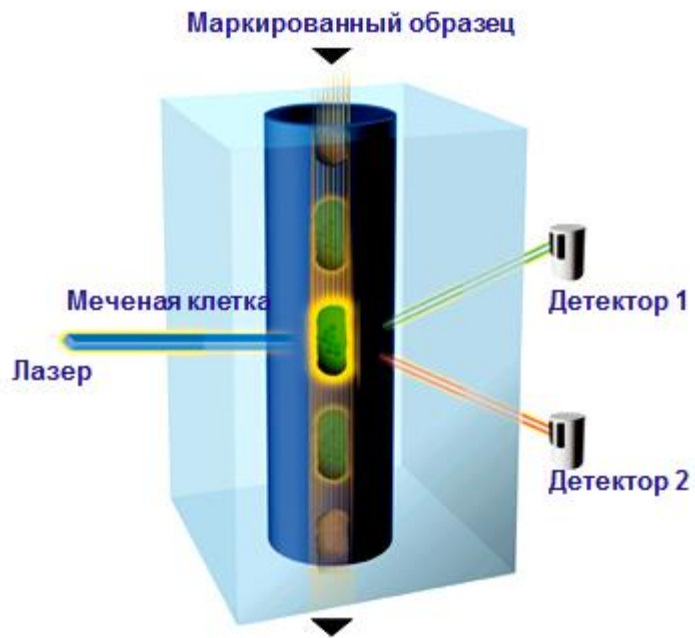
- Далее через оптическую систему излучение попадает на регистрирующее устройство, где в дальнейшем обрабатывается.
- С помощью проточной цитометрии можно определить кол-во популяций и субпопуляций клеток, их размеры и их морфологические характеристики: соотношение ядра и цитоплазмы, степень асимметрии и др.



- Также можно выявить стадию дифференцировки и активации клеток, оценить уровень функциональной активности, определять внутриклеточные и секретируемые цитокины; проводить исследования фагоцитоза, анализировать клеточный цикл, оценивать апоптоз и пролиферацию;
- Можно проанализировать от нескольких десятков до нескольких миллионов клеток

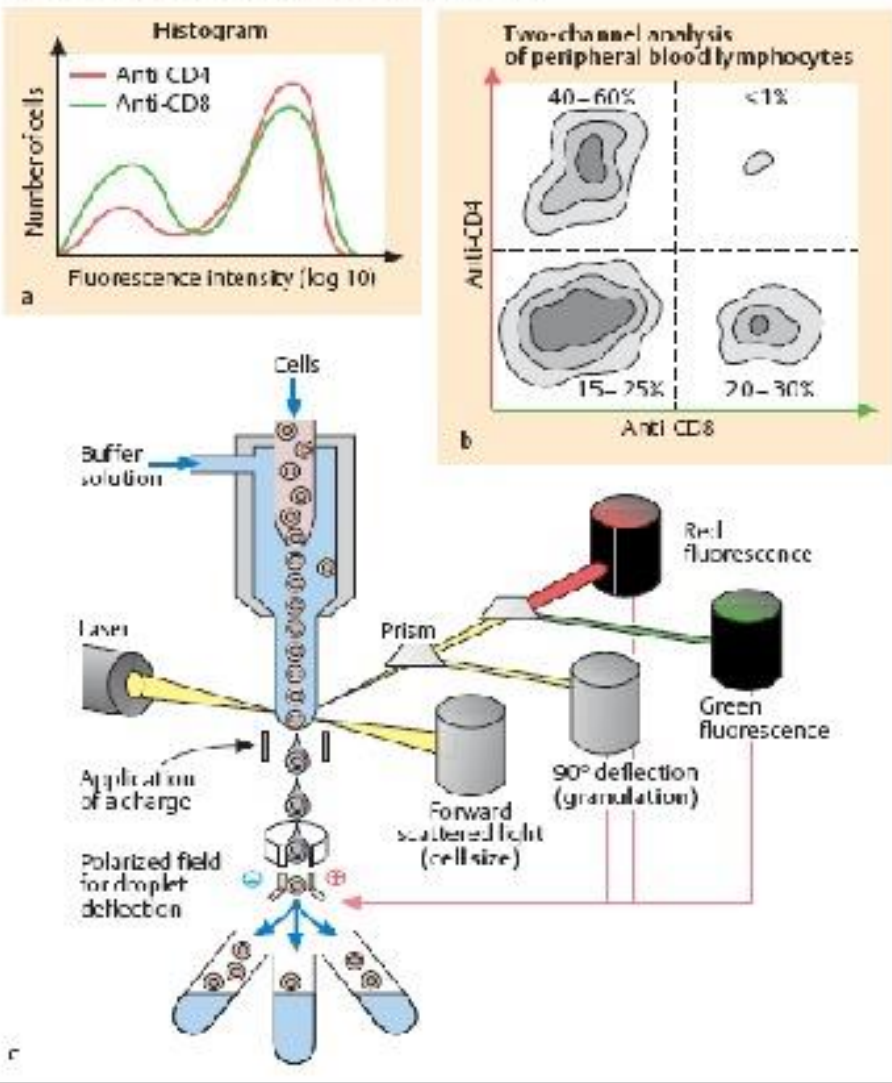


• проточная:



Проточная цитометрия

Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)



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