

Лекция

Серологические реакции

Особенности взаимодействия антитела (АТ) с антигеном (АГ) являются основой диагностических реакций (или серологических от лат. serum – сыворотка), поскольку один из компонентов всегда известен. Используют для:

1) Серодиагностика – это обнаружение в исследуемой сыворотке АТ против АГ возбудителя, позволяющее поставить диагноз, судить о напряженности постинфекционного иммунитета. Проводят с помощью набора специфических АГ – *диагностикумов*. Они позволяют установить наличие АТ в материале (чаще всего сыворотке больного).

2) Сероидентификация проводится для определения вида и серовара выделенных культур микроорганизмов (АГ) с помощью набора специфических антисывороток – *диагностических сывороток* (содержат АТ) .

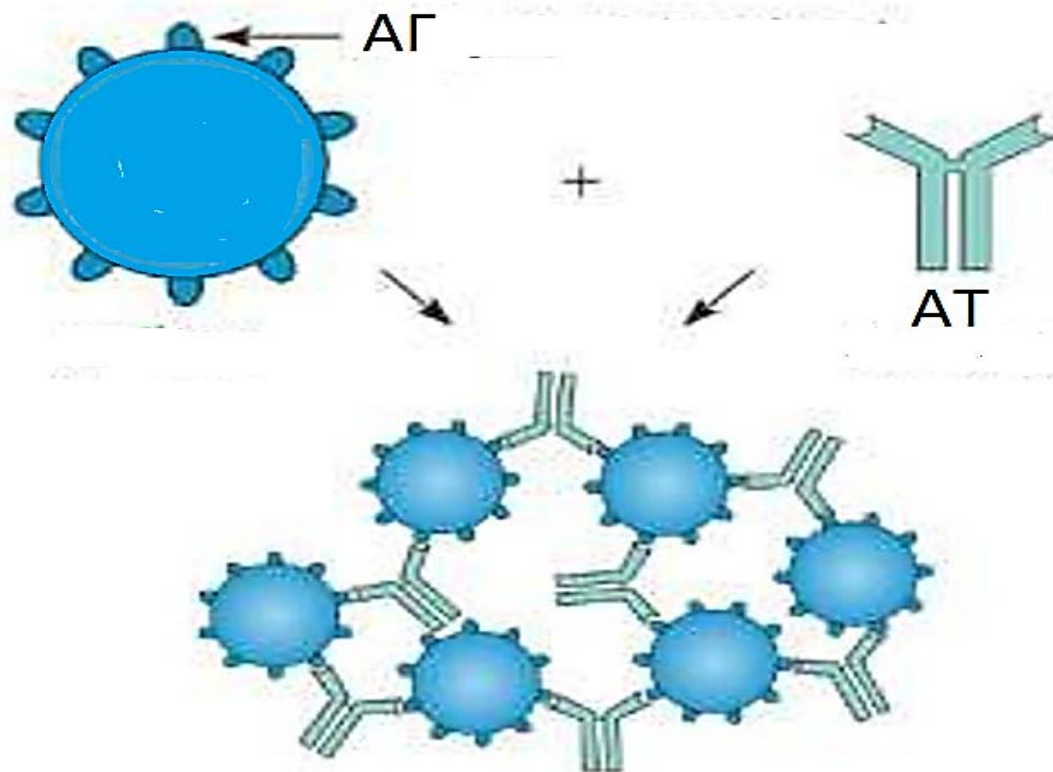
I. Реакции, протекающие с укрупнением частиц антигена в растворе электролита:

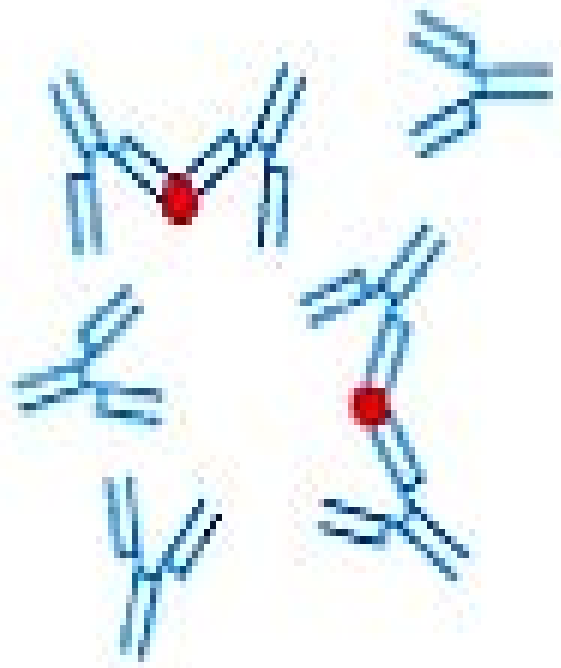
1. Реакции агглютинации

От лат. *agglutinacion* – склеивание. Проявляется в склеивании и выпадении в осадок корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов), а также частиц с адсорбированными на них антигенами под влиянием антител в среде с электролитом. Реакция протекает в 2 фазы:

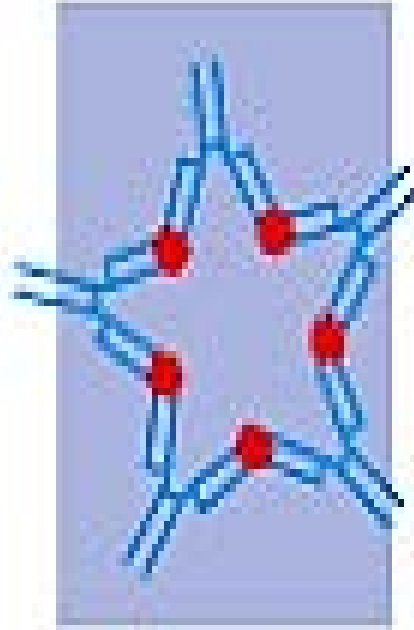
- 1 – специфическая адсорбция АТ на поверхности клетки или частицы, несущей соответствующие АГ;
- 2 – образование агрегата (*агглютината*) и выпадение его в осадок. Происходит в присутствии электролита (раствор NaCl).

Механизм реакции описывается *теорией «решётки»*, согласно которой агглютинат образуется при соединении одного активного центра двухвалентного АТ с эпитопом одного АГ, а второго активного центра – с эпитопом другого АГ. Избыток или недостаток антител препятствует проявлению агглютинации.

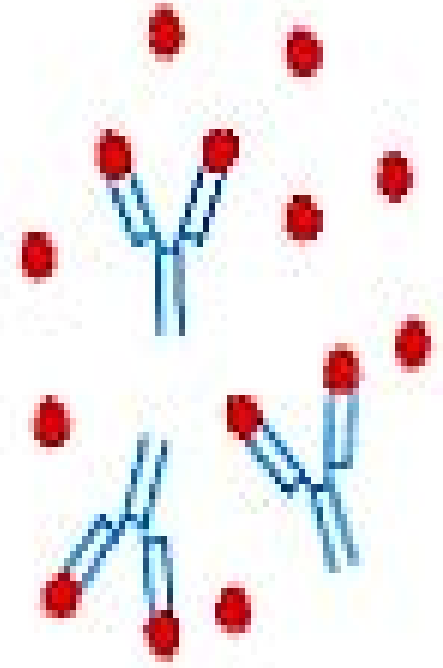




Избыток АТ



Агглютинация



Избыток АГ

Ориентировочная реакция агглютинации

Для обнаружения антигенов: на одну половину стекла наносят каплю диагностической сыворотки, на другую – каплю изотонического раствора хлорида натрия. Петлей в каждую каплю вносят небольшое количество бактериальной культуры и перемешивают до получения равномерной взвеси. Учет производят через 3-5 минут. В положительном случае, при образовании комплекса АГ-АТ, образуются хлопья. Капля с физиологическим раствором должна оставаться мутной.

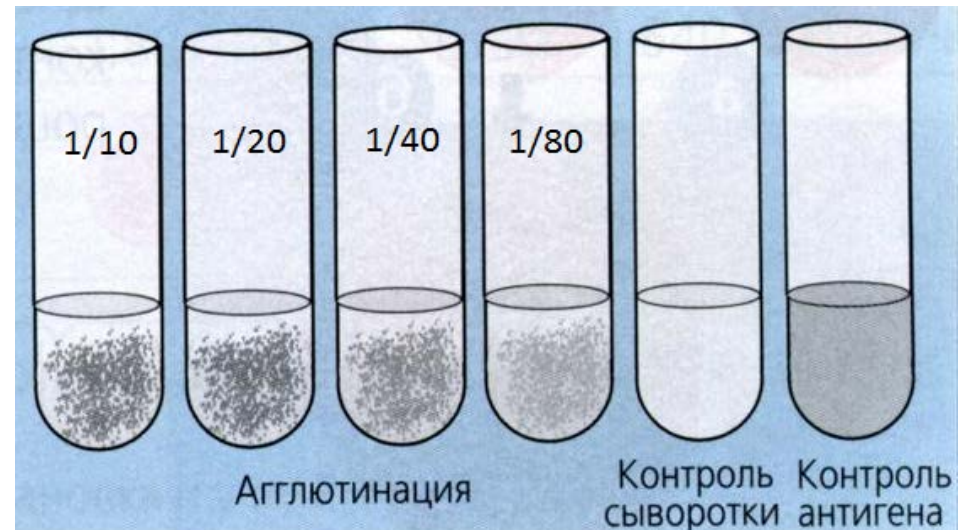
Для обнаружения антител: в каплю исследуемой сыворотки больного добавляют диалектикум. Результат оценивают по образованию хлопьевидного осадка. В качестве контроля используют физиологический раствор.

Развернутая реакция агглютинации

Для обнаружения антител в сыворотке.

Делают разведения сыворотки больного (титрование). Затем в каждую пробирку добавляют диагностикум – взвесь убитых микробов, к которым ищут АТ. Также используют два контроля: контроль сыворотки и контроль диагностикума. После инкубации учитывают результаты. Положительный – выпадение осадка и просветление среды. Определяют титр АТ в сыворотке: учитывают

максимальное
разведение (титр)
с положительным
результатом.

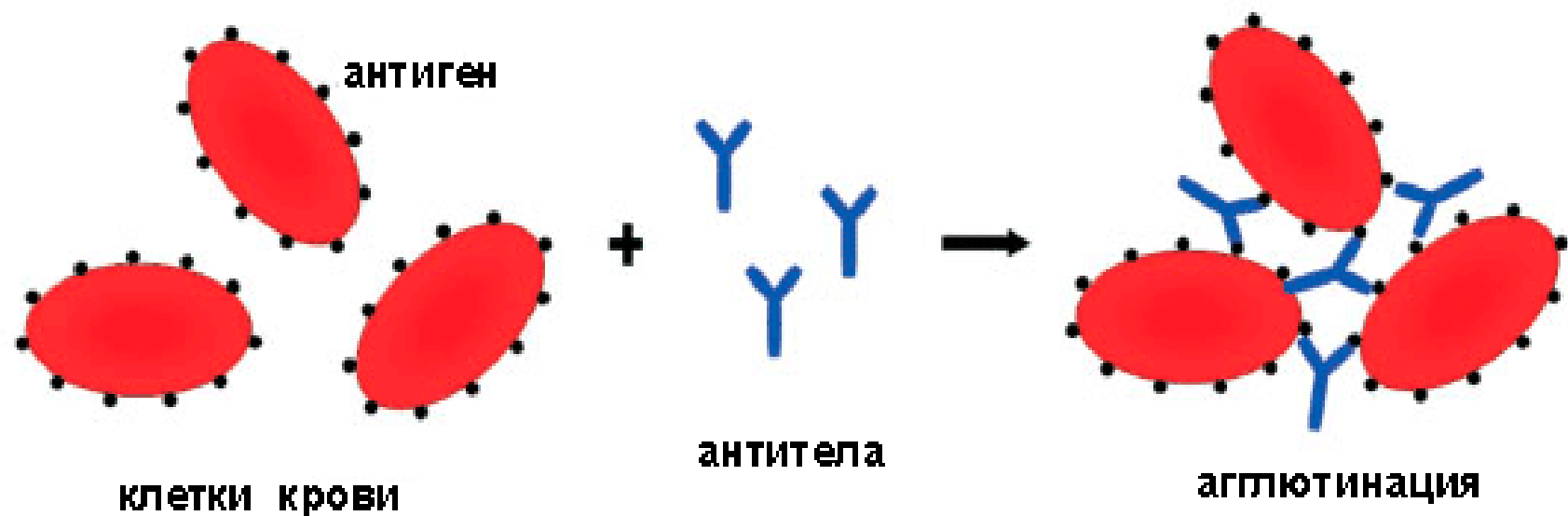


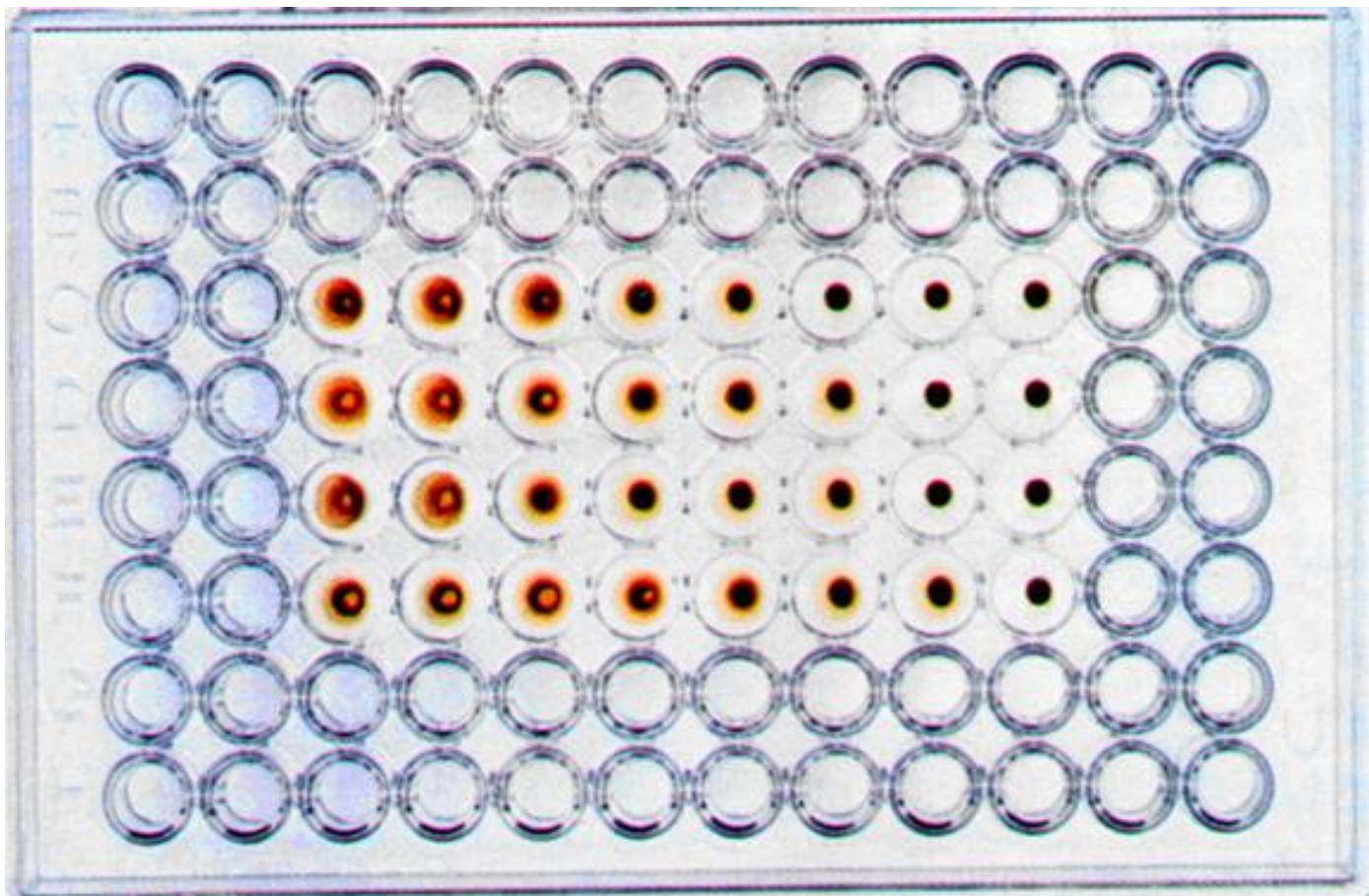
Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА)

В случаях, когда АГ высоко дисперсны и комплекс АГ-АТ не виден, их адсорбируют на более крупных частицах-носителях, например, эритроцитах (латексные частицы и др.) и используют в качестве диагностикума для определения АТ в сыворотке больного.

В положительном случае АТ исследуемой сыворотки связываются с АГ, адсорбированными на эритроцитах, что вызывает склеивание и выпадение их в осадок на дно пробирки в виде «зонтика» (фестончатый осадок с неровными краями).

При отрицательной реакции эритроциты выпадают в осадок в виде «пуговки» (маленький компактный осадок). Титр сыворотки в РНГА – это максимальное разведение сыворотки, которое дает положительный результат.





Результат РНГА (РПГА)

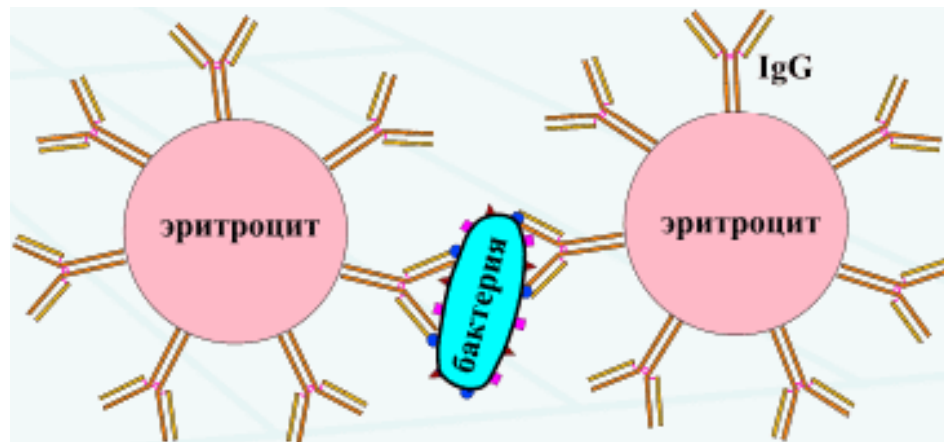


Положительный («зонт»)

Отрицательный («пуговка»)

Реакция обратной непрямо́й гемагглютинации (РОНГА).

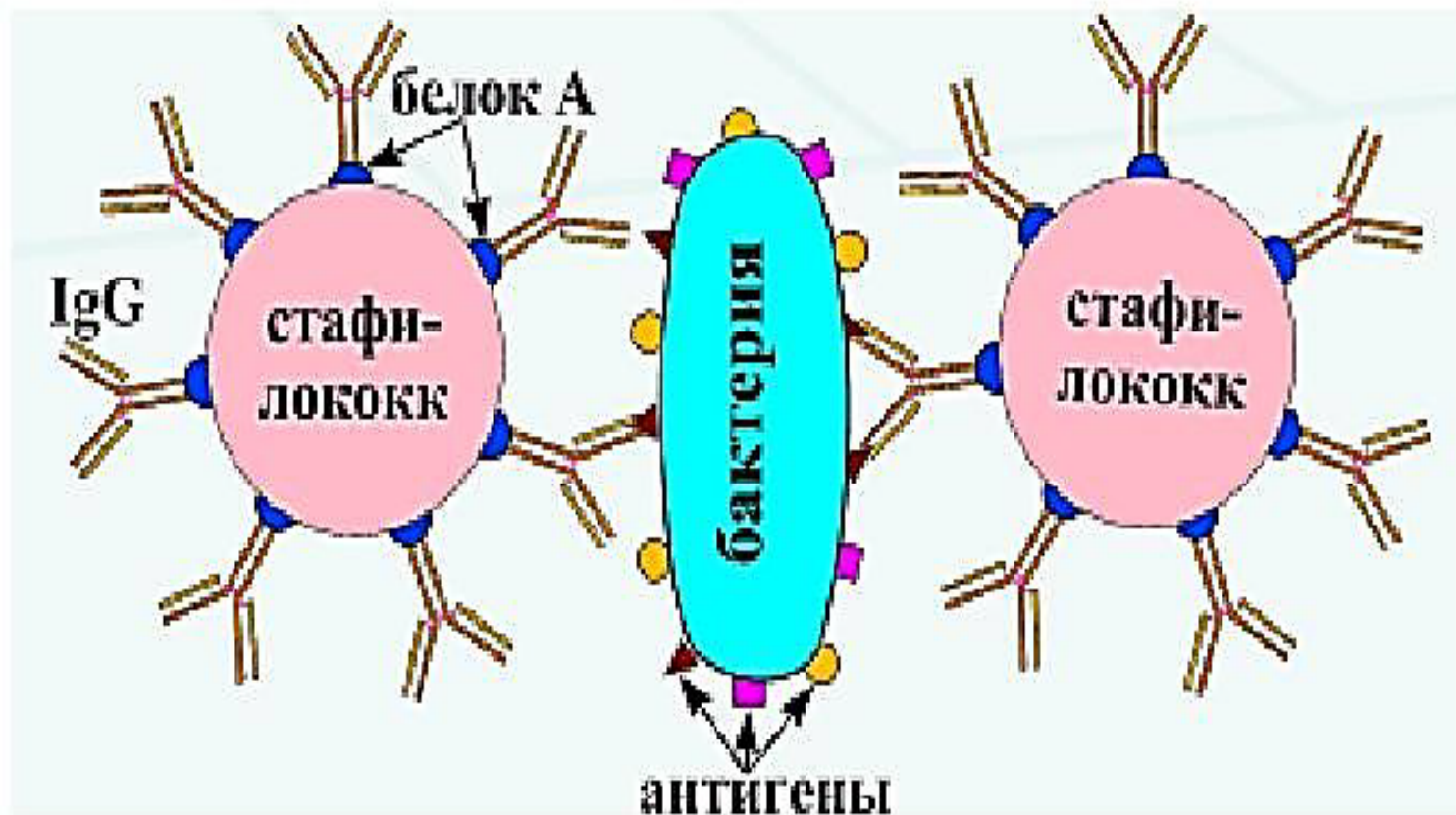
В ряде случаев, чтобы комплекс АГ-АТ стал крупнее, на эритроцитах адсорбируют АТ (*антительный эритроцитарный диагностикум*). В этом случае для исследования берут материал, в котором определяют наличие АГ. Как и в РНГА, в положительном случае образуется осадок в виде «зонтика», в отрицательном – в виде «пуговки».



Реакция коаггутинации

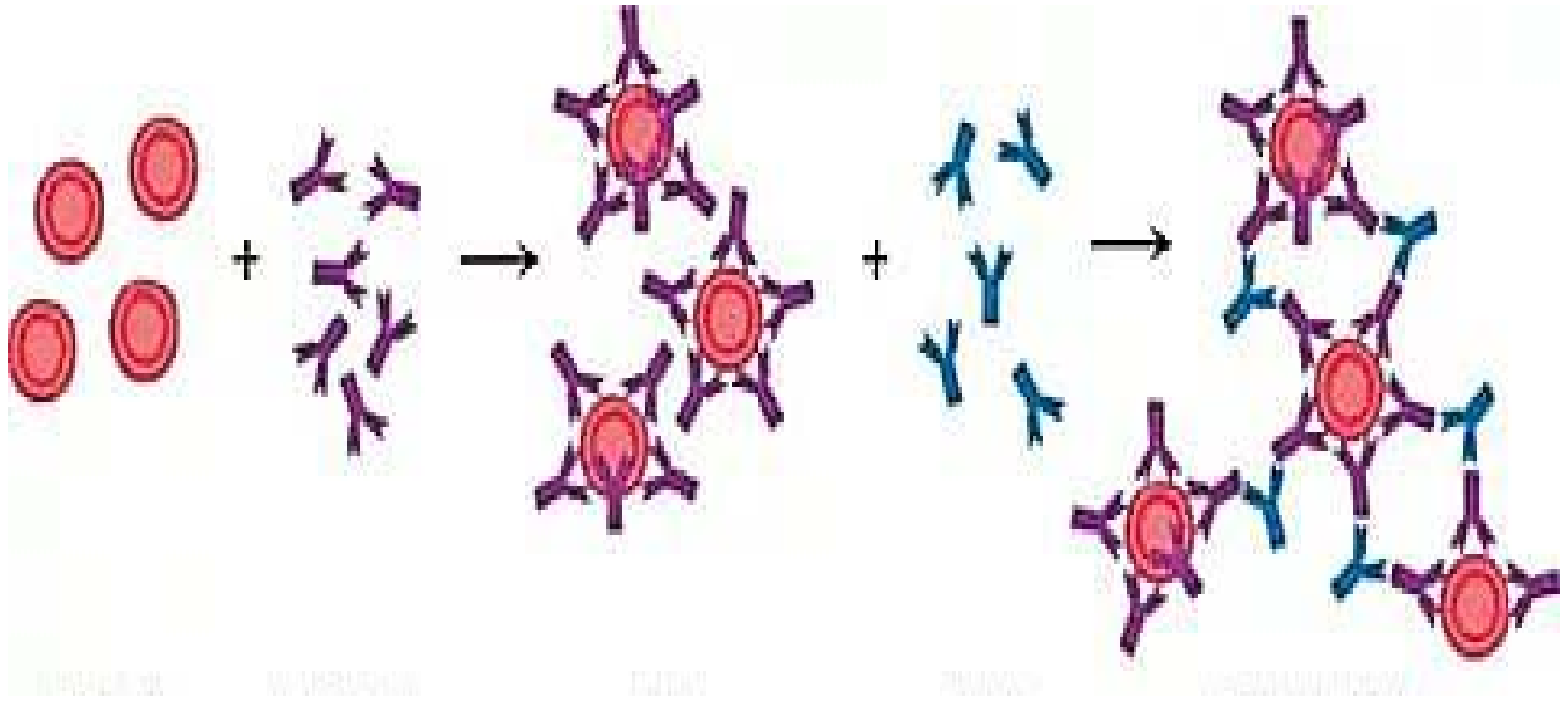
Применяют для определения АГ с помощью *антительного диагностикума* – АТ, адсорбированных на белке А клеток стафилококка.

Белок А стафилококка имеет сродство к Fc-фрагменту Ig, поэтому такие бактерии, обработанные иммунной диагностической сывороткой, неспецифически адсорбируют АТ сыворотки. Реакцию коаггутинации ставят на стекле. АТ диагностикума взаимодействуют антигенсвязывающими центрами с соответствующими микроорганизмами, выделенными от больных. В результате коаггутинации образуются хлопья, состоящие из стафилококка, АТ диагностической сыворотки и определяемого микроба.



Реакция Кумбса

Реакция Кумбса – это разновидность реакции агглютинации для определения антирезусных АТ. В сыворотке могут быть обнаружены антирезусные АТ, которые являются неполными, одновалентными, т.е. способны связывать АГ только одним активным центром. Они специфически взаимодействуют с АГ *Rh+*-эритроцитов, не вызывая их агглютинацию. Для обнаружения таких АТ в систему «антирезусные антитела + *Rh+*эритроциты» добавляют антиглобулиновую сыворотку (АТ против иммуноглобулинов человека), что вызывает агглютинацию эритроцитов.

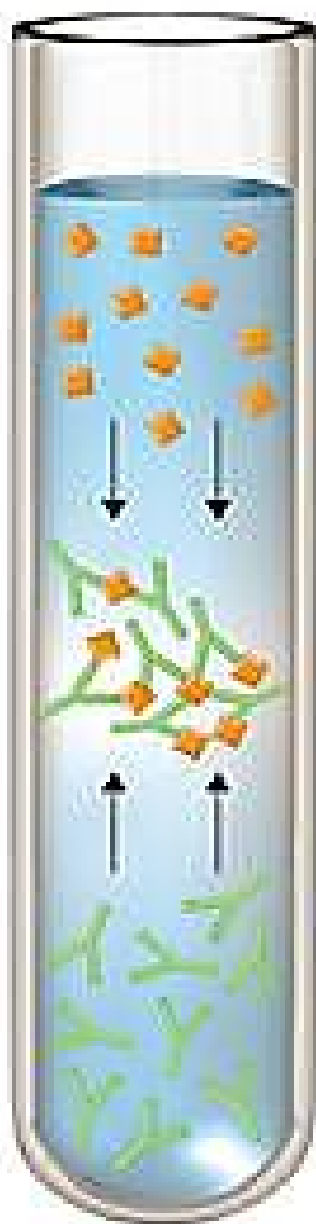


2. Реакции преципитации

Реакция преципитации (от лат. praecipito – осаждать) – это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого преципитатом. Механизм реакций преципитации также объясняется *теорией «решетки»*. При этом АГ и АТ также должны быть смешаны в эквивалентных количествах.

Реакция кольцепреципитации

Для этой реакции используют узкие преципитационные пробирки диаметром 0,5 см. В пробирку наливают диагностическую (т.е. содержащую антитела) сыворотку. Затем по стенке пробирки на сыворотку медленно наслаивают исследуемый антиген. В положительном случае и при оптимальном соотношении антигенов и антител на границе растворов образуется мутное кольцо преципитата, содержащее комплекс антиген-антитело. Одновременно ставится контроль.



Раствор
антигенов

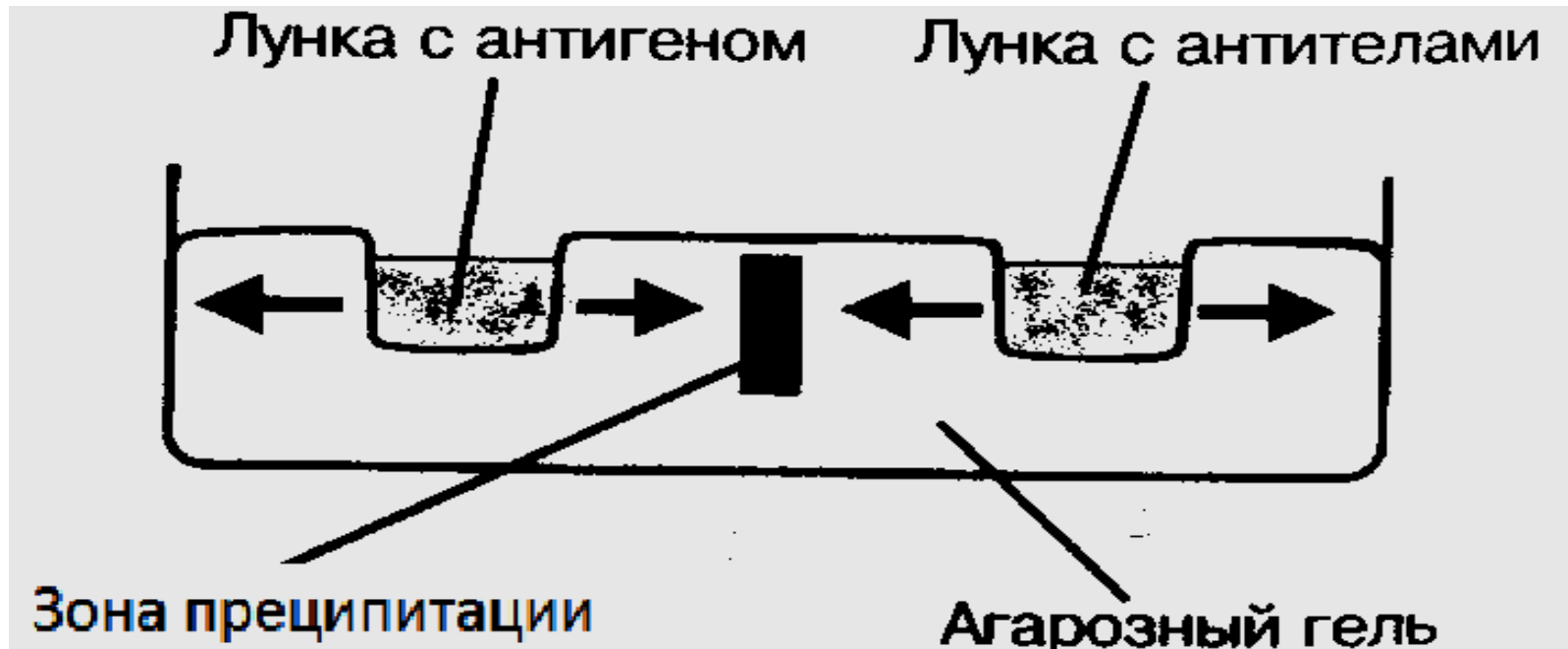
Зона эквивалентности:
Видимый преципитат

Антитела

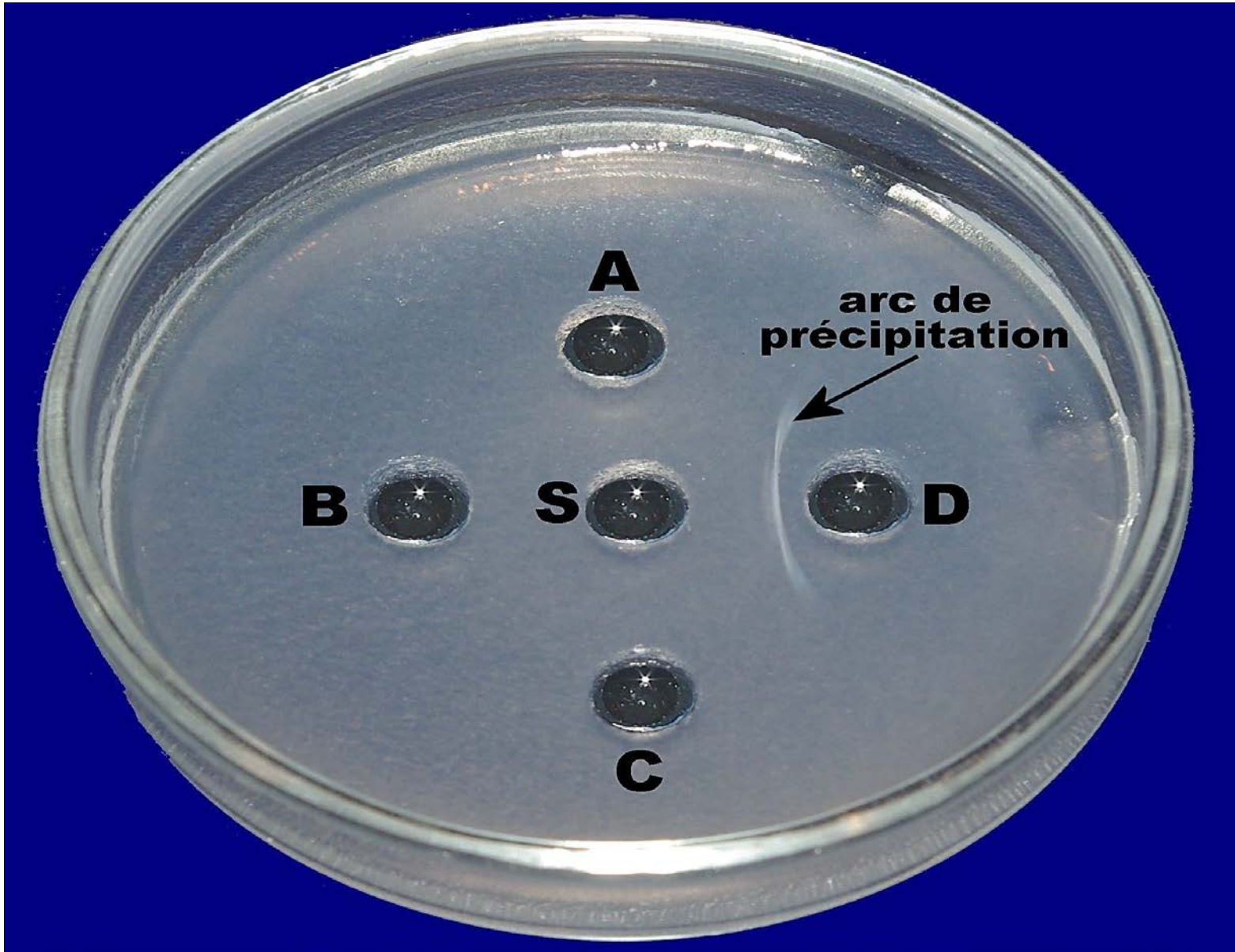


Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони

Разновидность реакции, в которой взаимодействие антигена с антителом происходит не в жидкости, а в геле. Чаще всего используют агаровый или полиакриламидный гель.



Для постановки реакции растопленный гель тонким слоем наносят на пластинку, после затвердевания в нем вырезают лунки. В лунки отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют в гель. В положительном случае на границе встречи образуется преципитат в виде белой полосы. У многокомпонентных систем между лунками с антигенами и антителами появляется несколько линий преципитата. У идентичных антигенов линии преципитата сливаются, у неидентичных – пересекаются.



A

**arc de
précipitation**

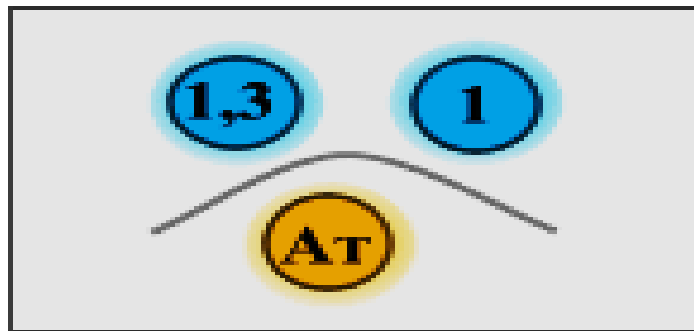
B

S

D

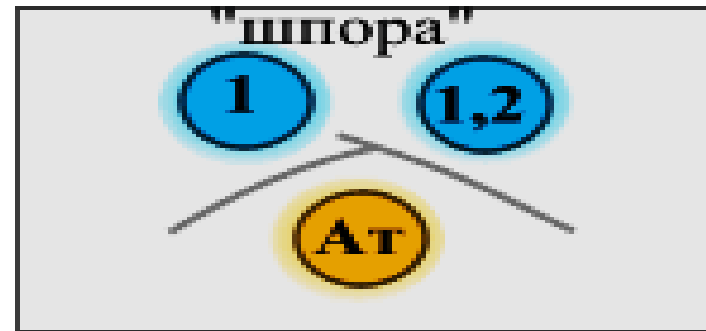
C

1. Идентичные
эпитопы
антигенов



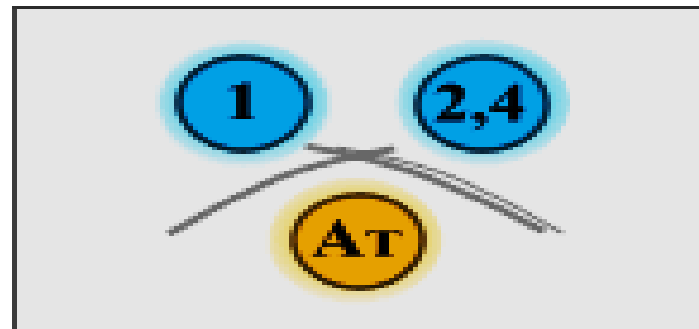
Анти-1

2. Частично
идентичные
эпитопы
антигенов



Анти-1,2

3. Неидентичные
антигены

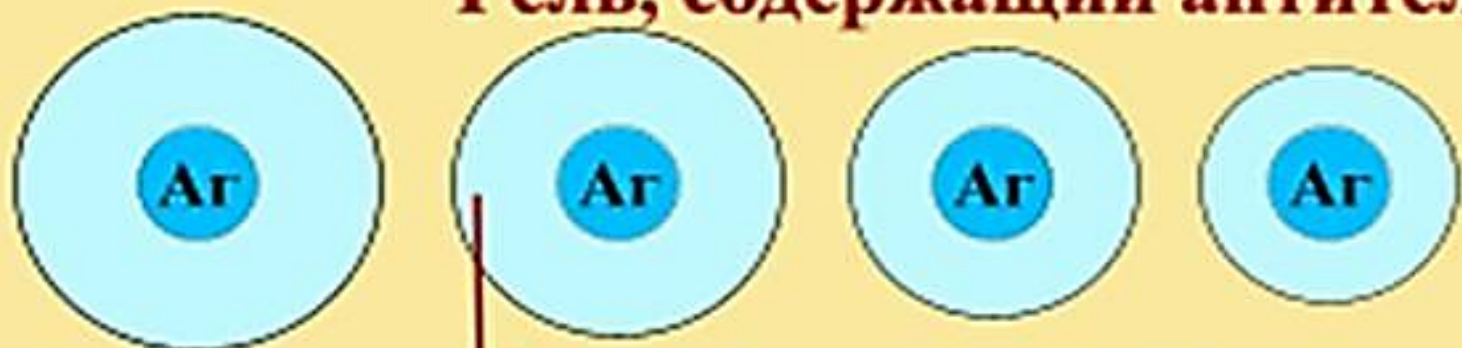


Анти-1,2,4

Реакция радиальной иммунодиффузии по Манчини

Иммунную сыворотку смешивают с расплавленным агаровым гелем и равномерно наносят на стекло. После застывания в геле делают лунки, в которые помещают антиген в различном разведении. 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 разных классов, компонентов системы комплемента и др.

Гель, содержащий антитела



Кольцо преципитации

**(Диаметр
кольца)²**

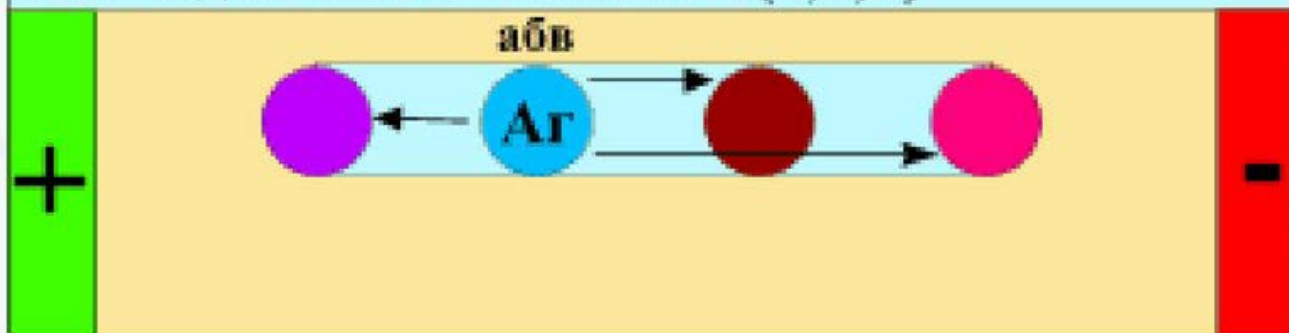


Иммуноэлектрофорез

Представляет собой сочетание электрофореза в геле с иммунодиффузией. Сначала проводят электрофоретическое разделение смеси антигенов в агаровом геле. Затем в канавку, параллельную направлению миграции белков, вносят диагностическую иммунную сыворотку. Антигены и антитела диффундируют в геле.

В месте их взаимодействия образуются дугообразные линии преципитации, количество, расположение и форма которых дают представление о составе исходной смеси антигенов.

1. Разделение антигенов (а,б,в)



2. Внесение иммунной сыворотки в канавку



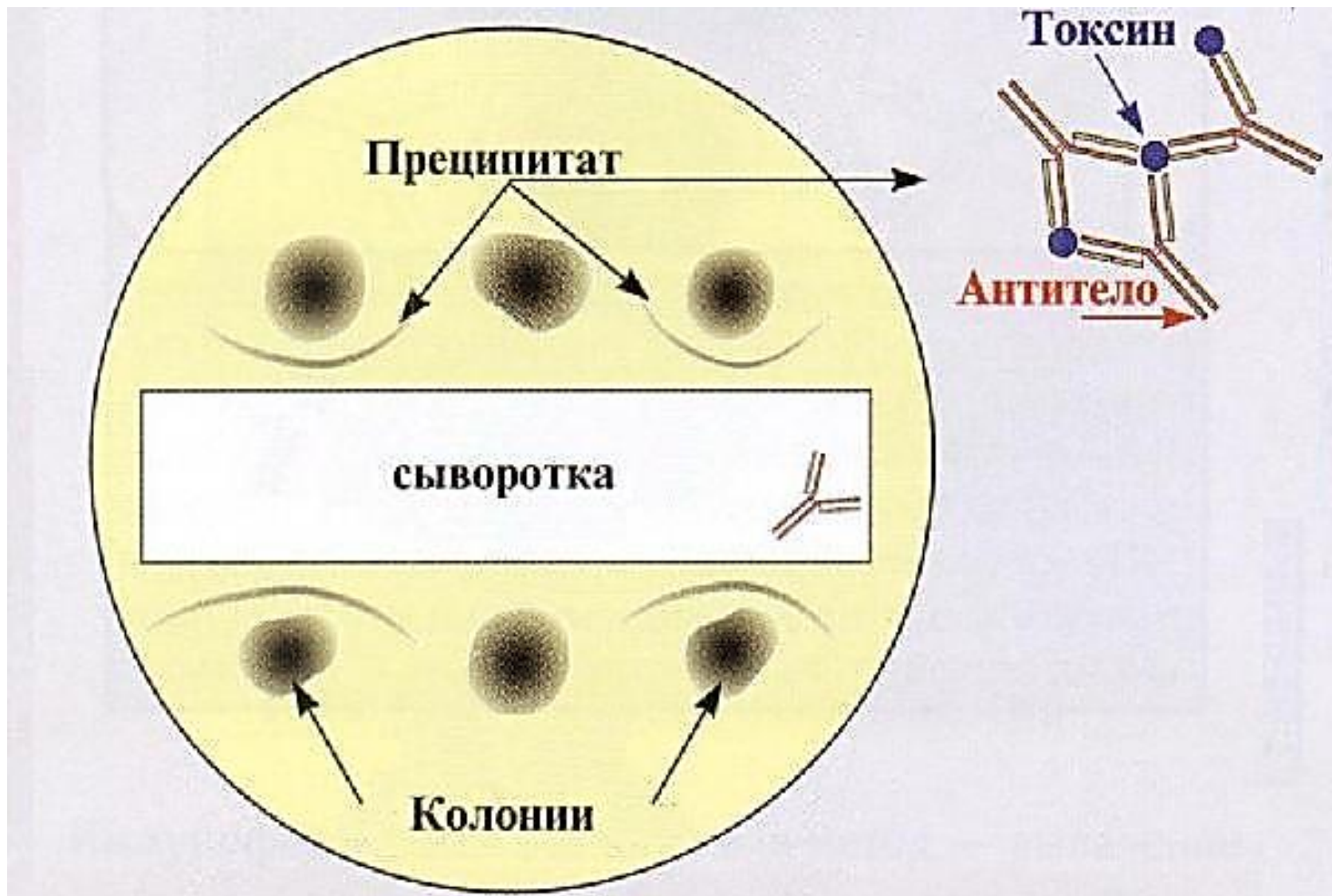
3. Диффузия и преципитация



Реакция преципитации для определения токсичности дифтерийной бактерии

Штаммы возбудителя дифтерии могут быть токсичными (продуцирующими экзотоксин) и нетоксичными, что проверяется при диагностике заболевания.

Для этого в центр чашки с агаром кладут полоску фильтровальной бумаги, пропитанную противодифтерийной антитоксической сывороткой. Параллельно полоске бляшками засевают исследуемые штаммы бактерий и ставят в термостат (37° С, 24 ч.). В качестве контроля используют заведомо токсигенную культуру. Если бактерии выделяют токсин (является антигеном), то при его диффузии в гель на месте встречи с антителами сыворотки, которой пропитана бумага, образуется полоска преципитации. Если штамм нетоксигенный, то полоска не образуется.



II Реакции нейтрализации

1. Реакция нейтрализации *in vivo*

Проводится редко. Реакция направлена на выявление антител против токсина (антитоксина) у человека. Для этого в область предплечья внутрикожно вводят небольшое количество токсина. Если покраснения и припухлости в месте введения токсина нет, значит он был нейтрализован имеющимися антителами (положительная реакция, есть иммунитет). Если наблюдается местная реакция, значит токсин оказывает свое повреждающее действие, следовательно антител к нему нет (отрицательная реакция).

Данная реакция была предложена Шиком для выявления иммунитета к дифтерии.

2. Реакция нейтрализации *in vitro*

Реакции нейтрализации основаны на способности антигенов нейтрализовать *in vitro* биологически активные антигенсодержащие субстраты: токсины, вирусы, яды змей и т.п. Смешивают биологически активные вещества с сывороткой, содержащей антитела. Данную смесь вводят животным (в культуру клеток). Если животное остается здоровым, значит, произошла нейтрализация токсина антитоксином (антитоксическими антителами). Если у животного появляются симптомы интоксикации и оно погибает, то иммунный комплекс не образовался и не произошла нейтрализация.

Пример, определение наличия ботулотоксина в материале.

Исследуемый материал (сыворотка крови, фильтрат консервов и др.) вводят двум мышам: первой и второй (контрольная). При этом второй одновременно вводят сыворотку, содержащую антитела против всех типов данного токсина. Наблюдают. Если первая мышка погибла, а вторая осталась жива, значит в материале содержится ботулотоксин.

Кроме наличия токсина, определяют и его тип (см. схему).

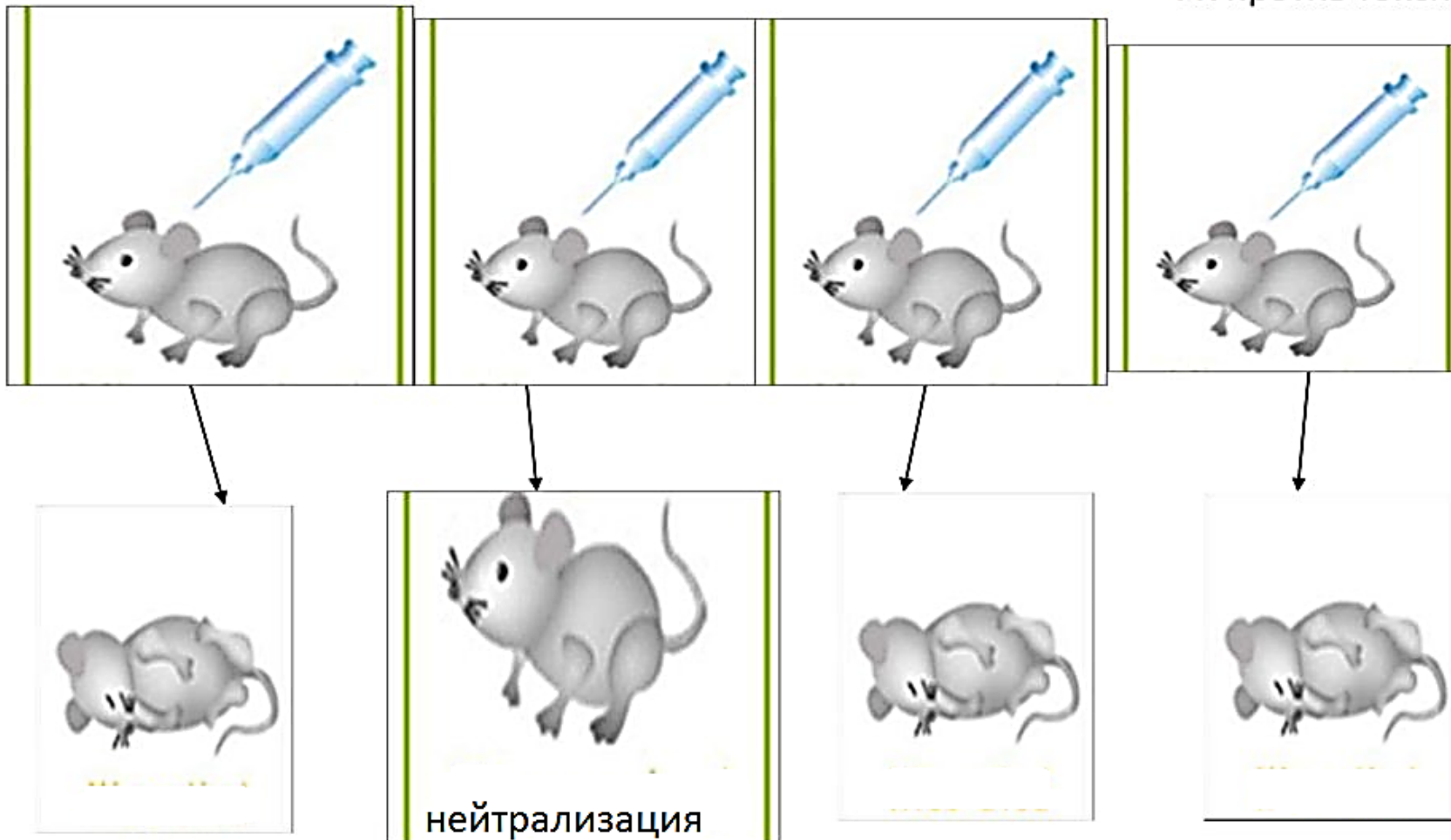
Реакция нейтрализации для определения типа ботулотоксина в исследуемом материале

Контрольная группа (Вводят исслед.материал)

Исслед.материал+
АТ против токсина А

Исслед.материал+
АТ против токсина В

Исслед.материал+
АТ против токсина Е



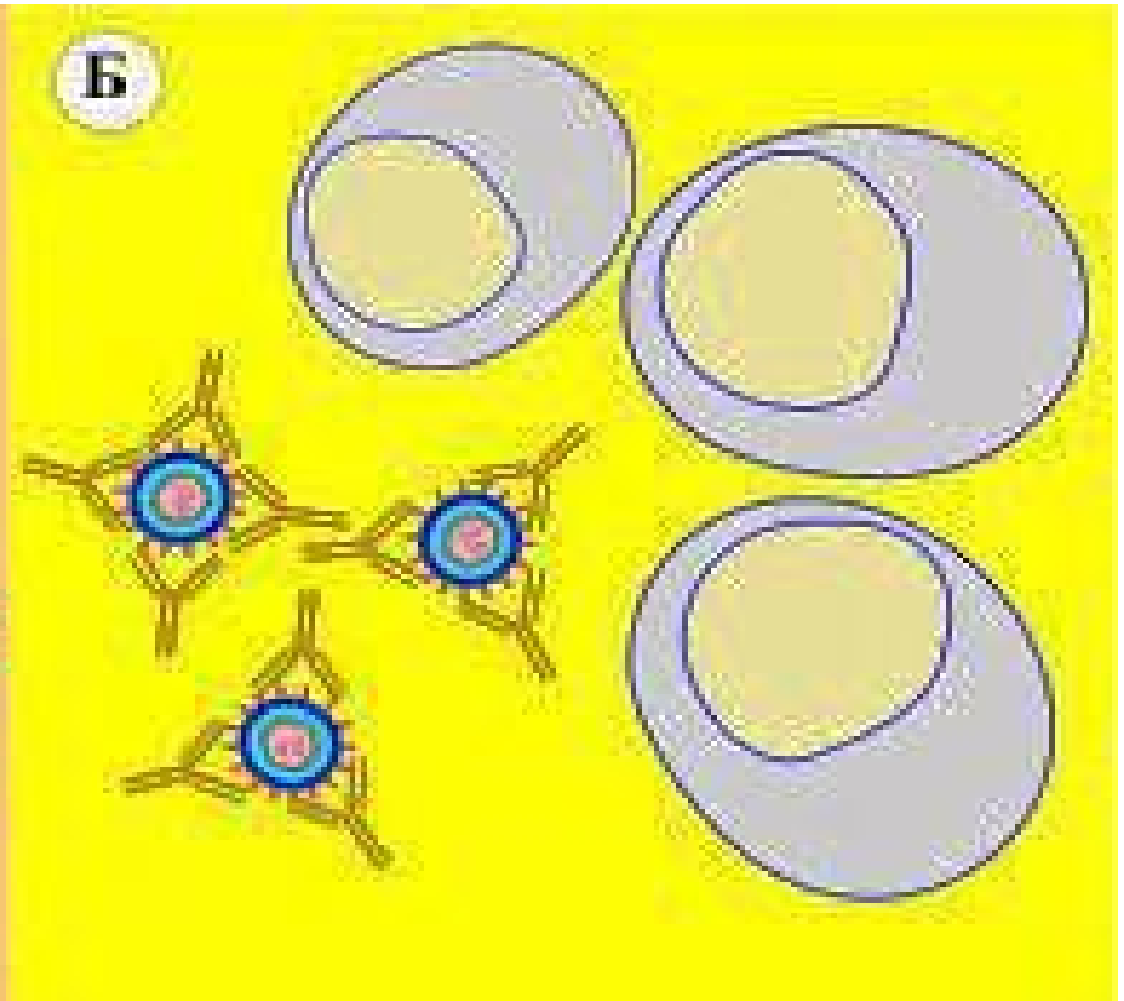
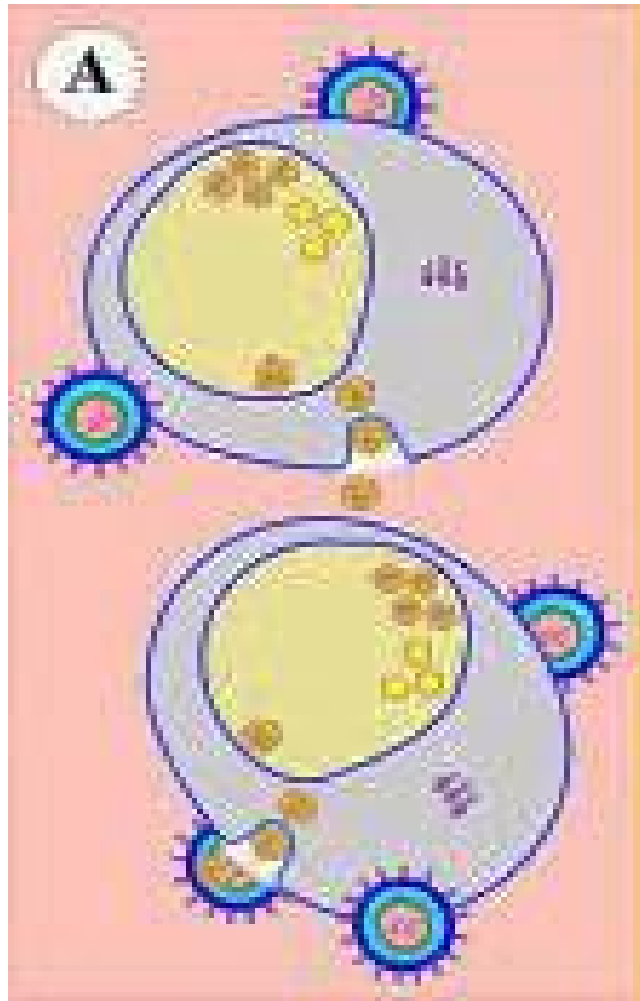
3. Реакция нейтрализации вирусов

Применяется для определения антител к вирусам. Смешивают сыворотку, исследуемую на наличие антител, с вирусом, к которому ищут антитела.

1) Данной смесью заражают чувствительных лабораторных животных. Через несколько суток регистрируют результаты. Если животное погибло, следовательно антител к данному вирусу в исследуемой сыворотке нет, нейтрализация не произошла. Если животное осталось живым и здоровым, следовательно произошла нейтрализация вируса имеющимися антителами (положительный результат).

2) Данной смесью заражают культуру клеток. При этом клетки находятся в питательной среде с индикатором на кислые продукты их метаболизма

(изначально индикатор красного цвета, при наличии кислых метаболитов становится желтым). Если в сыворотке больного есть антитела, то они нейтрализуют вирус. При этом клетки остаются живыми и выделяют продукты жизнедеятельности, в результате индикатор меняет цвет на желтый (положительный результат). Если антител нет, то вирус приводит к гибели культуры клеток, в результате цвет среды остается красным. Реакцию также применяют для определения титра противовирусных антител: делают разведения сыворотки и выявляют, в каком титре антител достаточно для нейтрализации вируса.

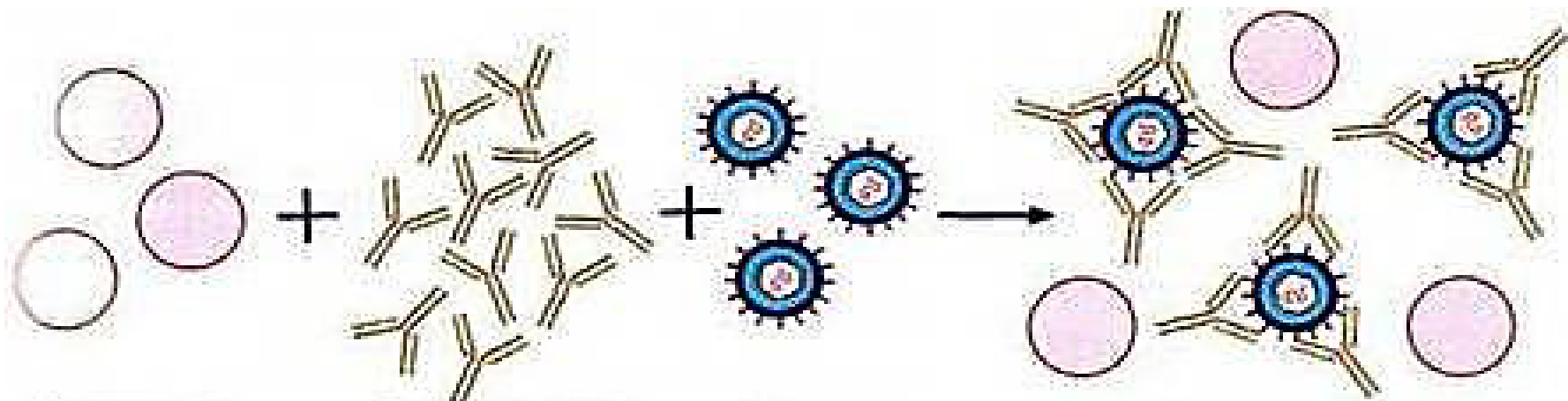


4. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

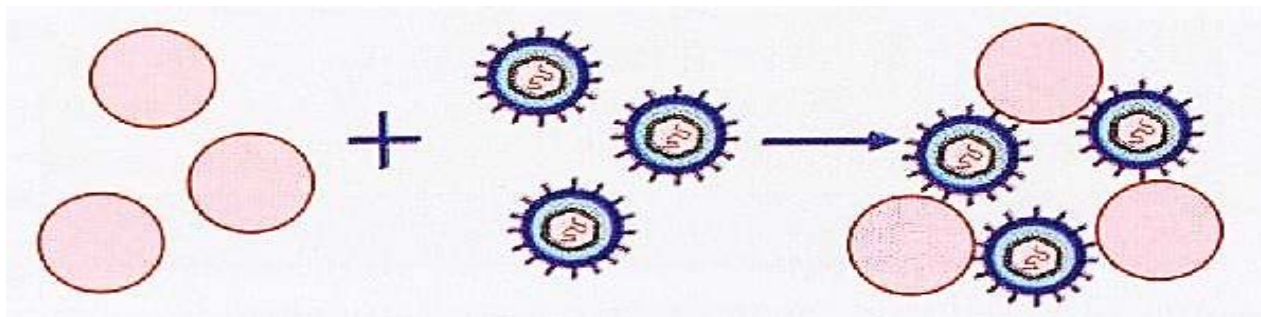
Применяется для определения антител к вирусам, обладающим способностью склеивать эритроциты (Пр., вирус гриппа, кори, краснухи и др.).

Делают последовательные разведения сыворотки больного в пробирках. Затем в каждую пробирку в одинаковом количестве добавляют взвесь эритроцитов и вирусы, к которым определяют антитела. Если антител достаточно для нейтрализации вируса, эритроциты остаются свободными и выпадают в осадок в виде «пуговки» (положительная реакция). Если сыворотка разведена настолько сильно, что антител в ней нет или недостаточно, вирус остается способным склеивать эритроциты, что приводит к образованию осадка в виде «зонтика».

Положительный результат



Отрицательный результат (антител нет)



5. Реакция флоккуляции

Основана на способности токсина или анатоксина при смешивании в эквивалентных соотношениях с антитоксической сывороткой (содержит антитела против токсина) образовывать помутнение, а затем рыхлый осадок, похожий на комок шерсти – флоккулят.

Механизм аналогичен реакции преципитации. Применяется для титрования антитоксических сывороток, токсинов и анатоксинов, определения типа токсина.

*Анатоксин – это токсин, потерявший токсические свойства, но сохранивший антигенные.