



ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздравсоцразвития России  
Кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии

**Реакции основанные на  
взаимодействии антигена  
с антителом**

1 2 3 4

9

Ю.И.Будчанов

Тверь 2012



УДК

Будчанов Ю.И.

В учебно-методических рекомендациях представлены современные сведения о иммунологических методах основанных на взаимодействии антигена с антителом. Освещены основные принципы постановки и использования этих реакций в медицине. Даны сведения о вариантах их постановки, примеры практического использования. Методические рекомендации предназначены для самоподготовки к практическим занятиям студентов лечебного, педиатрического, стоматологического и фармацевтического факультетов, изучающих основы медицинской иммунологии.

Ю.И.Будчанов, канд. мед. наук, доцент курса иммунологии ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздравсоцразвития России

© Ю.И.Будчанов, 2012



## Список сокращений

Ig – иммуноглобулин

IgG, IgA, IgM, IgE, IgE - классы сывороточных иммуноглобулинов

АГ – антиген

АТ – антитело

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр

ИФА – иммуноферментный анализ

ИХА - иммунохроматографический анализ

МАТ (mAT) (англ. *mab*) – моноклональные антитела

РА - реакция агглютинации

ЦМВ – цитомегаловирус

## Цель занятия

Изучить основы иммунологических методов основанных на взаимодействии антигена с антителом; постановки основных реакций основанных на взаимодействии антигена с антителом: реакции агглютинации, преципитации, иммунофлуоресценции, иммуногистохимический, иммуноферментный, радиоиммунный, иммуноблот; принципы их постановки, области применения; значение методов иммуноанализа для клинической медицины.

## Учебные элементы темы

1. Высокая специфичность взаимодействия антигена с антителом – основа использования реакции антиген-антитело в диагностике.
2. Реакция агглютинации и ее варианты.
3. Реакция преципитации и ее варианты.
4. Реакция нейтрализации.
5. Реакция иммунофлуоресценции и ее варианты.
6. Иммунофенотипирование клеток.
7. Проточная цитометрия.
8. Иммуноферментный анализ и ее варианты. Метод ELISPOT.
9. Иммуноблот как верифицирующий анализ выработки антител ко всем антигенам инфекта.
10. Радиоиммунный анализ – принципы постановки.
11. Иммунохроматографические методы, как современные методы быстрых тестов выявления антител и антигенов.



### **Студент должен знать:**

1. Принципы, на которых основаны реакции специфического взаимодействия АГ-АТ.
2. Феномены специфической агглютинации и преципитации, варианты постановки, использование в медицине.
3. Феномен нейтрализации повреждающего действия микроорганизмов, их токсинов на культуры клеток, на лабораторных животных, с особым вниманием применения в вирусологии.
4. Принципы постановки реакций с использованием химических и физических меток антител или антигенов (иммунофлуоресценция, иммунофенотипирование клеток, проточная цитометрия, ИФА, радиоиммунный анализ) их варианты и диагностическое значение.
5. Современную технологию быстрых иммунохроматографических тестов.

### **Студент должен уметь:**

1. Оценить результаты реакций прямой и непрямой агглютинации, антииммуноглобулиновых реакций Кумбса, РТГА; реакций преципитации в жидкой среде, в агаре, двойной и радиальной иммунодиффузии, ИЭФ.
2. Оценить результаты прямой и непрямой иммунофлуоресценции, ИФА, иммуноблота.
3. На основе знаний полученных на занятии уметь применять, оценить быстрые тесты, с использованием иммунохроматографических методов.

### **Предисловие**

Реакция антиген-антитело является основой многих высоко чувствительных иммунологических исследований. Это обусловлено строгой специфичностью выработавшихся антител, на определенный антиген. Т.е. антитела к определенному антигену будут связываться только с этим антигеном (антигенной детерминантой, эпитопом) и ни с каким другим. Взаимодействие антиген-антитело основано на принципе взаимного узнавания, обусловленного их конформационной комплементарностью. На основе знаний полученных на предыдущих занятиях – активный центр антитела строго комплементарен антигенной детерминанте, что обеспечивает их связывание.

Необходимо отметить, очень родственные в структурном отношении антигенные детерминанты могут перекрестно реагировать с антителами, но реакция при этом значительно слабее, нежели с тем антигеном, который индуцировал синтез антител данной специфичности.

При иммунизации животных образуются антитела, которые содержатся в сыворотке крови. Они могут быть обнаружены путем проведения реакции *in vitro* со специфическим антигеном. Такие реакции

называют серологическими – от лат. *serum* – сыворотка. Поэтому все методы исследования, основанные на использовании иммунных сывороток, называют **серологическими**. Они находят широкое применение для лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней, определения групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, видовой принадлежности белка, беременности, гормональных нарушений, распознавания аллергии и аутоиммунных болезней и т.д.

Эти реакции **применяются для определения, как антител, так и антигенов**. По известному антигену определяют в исследуемой сыворотке наличие специфических к данному антигену антител, а с помощью известного антитела (диагностической иммунной сыворотки) определяют наличие в исследуемом материале специфического антигена. Примером использования серологических методов для идентификации антигенов является серотипирование микроорганизмов с использованием специфических антисывороток.

Чувствительность иммунологических методов исследования превосходит все другие методы исследования антигенов и антител, например, иммуноферментный анализ позволяет улавливать присутствие антигена в количествах, измеряемых в нанограммах и даже в пикограммах.

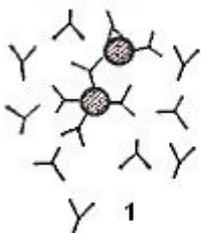
Развитию иммунологических методов способствовало создание **моноклональных антител**.

Моноклональные антитела несут только одну химически однородную популяцию антител, комплементарную специфической детерминанте антигена, что позволяет осуществлять тонкую дифференциацию белков.

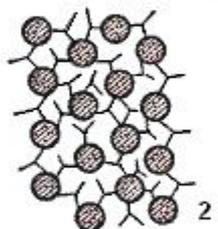
### **Образование иммунных комплексов при разном соотношении антиген—антитело (общее положение):**

Если в реакции избыток антител, это приводит к образованию

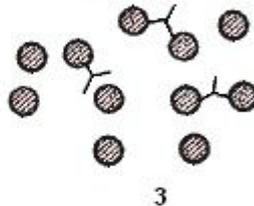
Избыток молекул антител



Количество антигена эквивалентно количеству антител



Избыток молекул антигена



Y- антитело

●- антиген

единичных растворимых иммунных комплексов - 1 (см рисунок).

Если в реакции используется эквивалентное количество антигена и антител, это ведёт к образованию наибольшего количества иммунных комплексов и образованию преципитата растворимых антигенов

или агглютинации, при использовании корпускулярных антигенов [2];

Избыток антигена в реакции приводит к образованию растворимых комплексов [3].



## Реакция специфической агглютинации и ее варианты

**Реакция агглютинации (РА)**, reactio agglutinationis (англ. agglutination test) — является методом выявления **антител** или **корпускулярных антигенов**, который основан на феномене специфической агглютинации.

Реакция агглютинации (от лат. agglutinatio - склеивание) - склеивание и выпадение в осадок из однородной взвеси антигеннесущих корпускулярных частиц (бактерий, эритроцитов и др. клеток, частиц латекса), молекулами специфических антител - **агглютининов**. РА проявляется в виде образования хлопьев или осадка (**агглютината**), состоящего из корпускул (например, бактерий), "склеенных" антителами. Агглютинаты обычно видны невооруженным глазом.

Важно помнить, что в этих реакциях принимают участие **антигены в виде частиц (корпускул** - микробные клетки, эритроциты и др.), которые склеиваются антителами и выпадают в осадок. Для появления реакции необходимо присутствие электролитов (например, изотонического раствора хлорида натрия), снижающих электрический заряд комплексов АГ+АТ и ускоряющих процесс агглютинации.

В зависимости от вида используемого иммунодиагностикума различают **реакцию микробной агглютинации, гемагглютинации (агглютинация эритроцитов), латекс-агглютинации** и т. д.

Реакция агглютинации используется с диагностической целью в двух направлениях:

1) для определения неизвестного микроба (антигена), выделенного от больного. Реакция в этом случае ставится с известной **диагностической агглютинирующей сывороткой**, полученной путем иммунизации кроликов известным видом микробов (серологическая идентификация микроба);

2) для выявления агглютининов в сыворотке больного к известному виду микробов. Реакция ставится со стандартным **микробным диагностикумом** (в качестве антигена) — и сывороткой больного (серодиагностика заболевания).

**Различают прямую и непрямую реакции агглютинации**

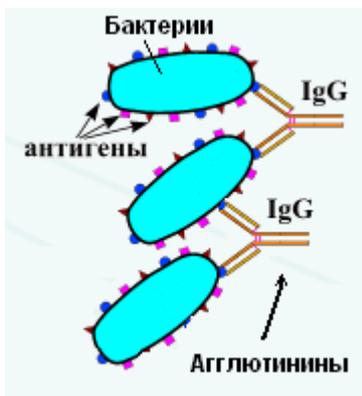
**Реакция прямой агглютинации** - в этой реакции **антитела (агглютинины)** непосредственно агглютинируют корпускулярные **антигены (агглютиногены)**.

**Реакция прямой агглютинации клеток.** Чаще всего реакция агглютинации в клинике ставится для **определения группы крови, которая** основана на взаимодействии аллоантител (изоантител) и антигенов эритроцитов. Для определения групп крови используют стандартные изогемагглютинирующие сыворотки крови доноров, содержащие известные анти-А или анти-В антитела. Реакцию ставят на

стекле или пластинах. При наличии на эритроцитах А антигена (2-я группа крови), В антигена (3-я группа крови) или обоих антигенов (4-я группа крови) соответствующие сыворотки агглютинируют эритроциты. В последнее время широко используют **Цоликлоны** - солевые растворы [МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ](#) к антигенам, расположенным на поверхности эритроцитов человека.

Применяется также проба на совместимость крови, когда капли крови донора и реципиента смешивают и оценивают агглютинацию.

В клиниках применяют реакцию агглютинации лейкоцитов, тромбоцитов и других клеток для выявления аутоантител, а также для определения антигенов на этих клетках.



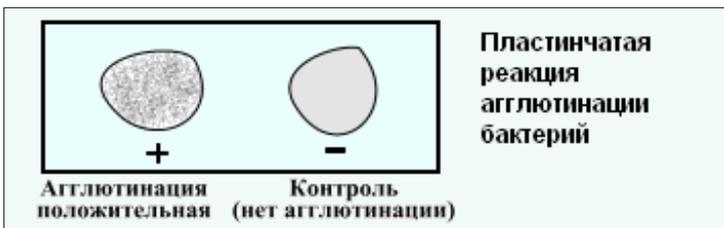
### Реакция прямой агглютинации микробов (РА).

В этом случае антигены обычно представлены взвесью инактивированных микроорганизмов (реакция микробной агглютинации).

Для определения вида микроорганизмов используют стандартные **диагностические агглютинирующие сыворотки**. Их получают гипериммунизацией лабораторных животных взвесью бактерий. Титром такой сыворотки

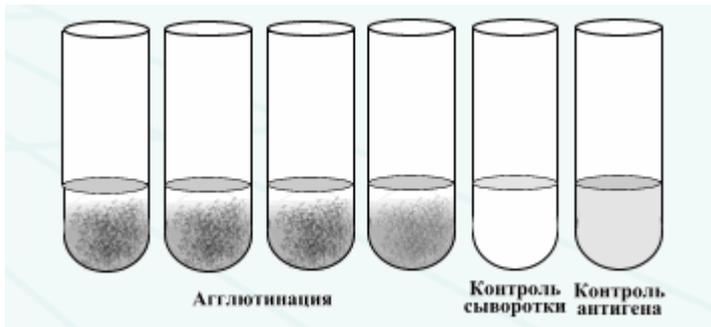
является ее наибольшее разведение, при котором наблюдается отчетливая агглютинация соответствующего антигена. *(Есть некоторые особенности агглютинации при участии О- и Н-антигенов бактерий, а так же антител видоспецифических и к групповым антигенам. Об этом Вы узнаете на занятиях по микробиологии).*

Наиболее распространены **пластинчатая** (ориентировочная) и **развернутая** РА бактерий.



**Пластинчатую РА** ставят на стекле. В этой реакции используют сыворотки с небольшим разведением или неразведенные. Используют ее как ускоренный метод обнаружения антител или

идентификации микроорганизмов. На стекло наносят каплю сыворотки, в которую вносят неизвестную культуру бактерий, перемешивают и через 2-3 минуты наблюдают появление мелкозернистой или хлопьевидной агглютинации. Для контроля используют каплю физиологического раствора, в которой после внесения бактерий наблюдается равномерное помутнение.



Развернутую РА проводят в пробирках или лунках пластин. При этом диагностическую сыворотку разводят (титруют) и вносят одинаковые количества антигена. При положительном результате на дне пробирки образуется рыхлый осадок в

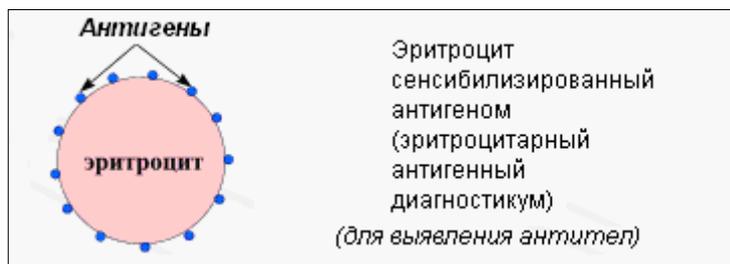
виде "зонтика", при отрицательном - осадок в виде "пуговицы" (маленького диска).

Для определения антител в сыворотке больного (серологический диагноз) используют стандартный микробный диагностикум, содержащий взвесь известных микробов или их антигенов. Взвесь бактерий добавляют к различным разведениям испытуемой сыворотки крови и через определенное время контакта регистрируют, при каком наивысшем разведении сыворотки крови происходит агглютинация. В этом случае также можно ставить пластинчатую и развернутую РА.

Реакцию агглютинации бактерий используют для диагностики ряда инфекционных болезней: бруцеллеза, туляремии, брюшного тифа и паратифов, бациллярной дизентерии, сыпного тифа.

### Реакция пассивной, или непрямой, гемагглютинации (РПГА, РНГА).

В ней используют эритроциты (эритроциты барана) или нейтральные синтетические материалы (например, частицы латекса, целлюлозы, полистирола, оксида бария и др.), на поверхности которых **сорбированы антигены** (бактериальные, вирусные, тканевые) или **антитела**. Их агглютинация происходит при добавлении соответствующих сывороток или антигенов.



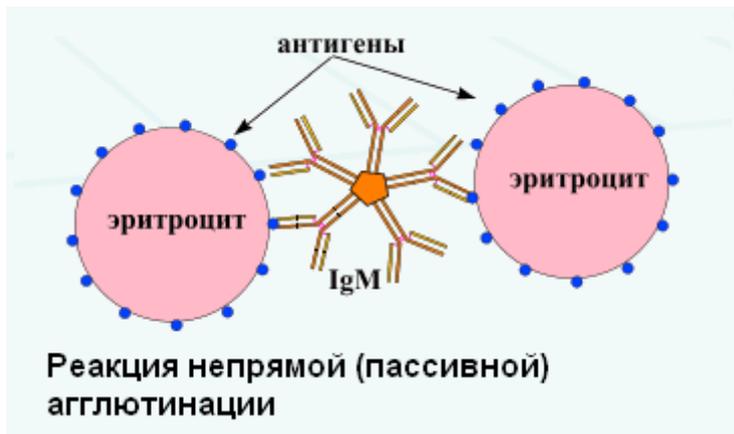
Эритроциты, сенсibilизированные антигенами, называют **эритроцитарным антигенным диагностикумом** и используют для выявления и

титрования антител.

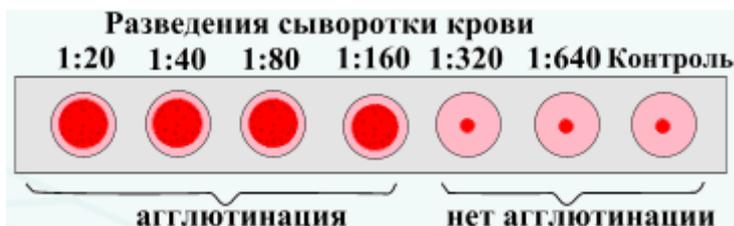
Эритроциты, сенсibilизированные антителами, называют **эритроцитарным иммуноглобулиновым диагностикумом** и применяют для выявления антигенов.



Так как это важно, позволю себе повториться. В реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) в качестве носителя используют эритроциты. Нагруженные антигеном эритроциты склеиваются в присутствии специфических антител к данному антигену и выпадают в осадок. Сенсибилизированные антигеном эритроциты используют в РПГА как



**эритроцитарный антигенный диагностикум** для обнаружения антител (серодиагностика, установление серологического диагноза). Если нагрузить эритроциты антителами, то их можно применять для выявления антигенов.



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 лунок в виде фестончатого осадка. При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговки».

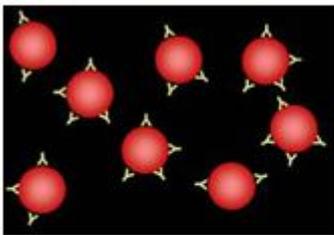
Реакцию пассивной гемагглютинации используют для диагностики бактериальных заболеваний (брюшной тиф и паратифы, дизентерия, бруцеллез, чума, холера и др.), заболеваний, вызванных простейшими (малярия) и вирусами (грипп, аденовирусные инфекции, вирусный гепатит В, корь, клещевой энцефалит, крымская геморрагическая лихорадка и др.), а также для определения некоторых гормонов, выявления повышенной чувствительности больного к лекарственным препаратам и гормонам, например пенициллину и инсулину.

### **Прямая и не прямая антииммуноглобулиновые реакции Кумбса (реакция Кумбса, тест Кумбса).**

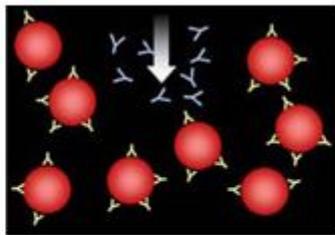
Используются для выявления "неполных" (неагглютинирующих) антиэритроцитарных антител, которые образуются при различных заболеваниях: резус-конфликте, аутоиммунных заболеваниях, некоторых

инфекциях. Для постановки этих реакций необходима антиглобулиновая сыворотка, которую получают путем иммунизации кролика иммуноглобулинами человека. Такая сыворотка содержит полные (бивалентные) антииммуноглобулиновые антитела.

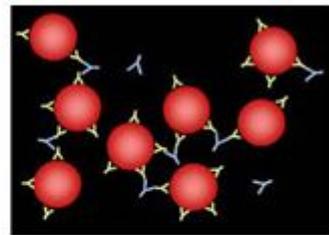
Антитела против резус-фактора являются неполными, они не способны к прямой реакции с резус-положительными эритроцитами, поэтому для их обнаружения используют реакцию Кумбса, основанную на выявлении неполных антител с помощью антииммуноглобулиновых сывороток. Антитела могут находиться как на поверхности эритроцитов, так и в свободном состоянии в плазме крови. В зависимости от этого проводится прямая или непрямая реакция Кумбса.



Антитела, фиксированные на поверхности эритроцитов



Добавление антиглобулиновой сыворотки



Агглютинация эритроцитов

**Прямая реакция:** к отмытым эритроцитам крови больного добавляют антииммуноглобулиновую сыворотку. Если на эритроцитах есть неполные антитела (иммуноглобулины), что наблюдается при гемолитической анемии, резус-конфликте (эритроциты плода), то они агглютинируются. Например, используют этот тест, когда у новорожденного подозревают гемолитическую болезнь, вызванную материнскими анти-Rh-антителами класса IgG, связанными с эритроцитами младенца.

**Непрямая реакция** выявляет свободные антиэритроцитарные антитела в сыворотке крови больного. К отмытым эритроцитам донора 0(I) группы крови добавляют исследуемую сыворотку. Смесь инкубируют при 37°C в течение 30 минут и отмывают эритроциты. Затем к ним добавляют антииммуноглобулиновую сыворотку против IgG. Если в сыворотке больного были неполные антиэритроцитарные антитела, то наступит агглютинация. Непрямой тест Кумбса чаще используют для обнаружения антител класса IgG к резус-фактору в крови резус-отрицательных женщин.

Иммунный механизм: Fab-фрагменты неполных антител исследуемой сыворотки крови присоединяются к эритроцитам, а к свободным Fc-фрагментам этих антител присоединяются антитела против IgG, и происходит агглютинация эритроцитов.

Таким образом, прямой тест Кумбса выявляет связанные антитела, а непрямой тест – сывороточные.



**Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)** используется для диагностики вирусных болезней. Некоторые **вирусы обладают гемагглютинирующими свойствами**, т.е. эти вирусы могут связываться с эритроцитами и образовывать осадок склеившихся эритроцитов на дне пробирки или лунки планшета. Избирательное блокирование гемадсорбции с помощью специфических антител является основой для проведения реакции торможения гемагглютинации, которая широко используется в лабораторной практике.

Таким образом, РТГА основана на феномене предотвращения (торможении) иммунной сывороткой гемагглютинации эритроцитов вирусами и используется для выявления и титрования противовирусных антител. Она служит основным методом серодиагностики **гриппа, кори, краснухи, эпидемического паротита, клещевого энцефалита и других вирусных инфекций**, возбудители которых **обладают гемагглютинирующими свойствами**.

Пример, РТГА для диагностики гриппа и парагриппозной инфекции. Парные сыворотки от больного исследуют в одном опыте. Титром сыворотки считают ее наибольшее разведение, в котором наблюдается полное ингибирование гемагглютинации вируса. Диагностически достоверным считается не менее, чем 4-кратное увеличение титров антител в постинфекционной сыворотке по сравнению с сывороткой, взятой в острой фазе заболевания.

Типирование вируса проводят в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с набором типоспецифических сывороток ( $H_0N_1$ ,  $H_1N_1$ ,  $H_2N_2$ ,  $H_3N_2$  и др.). Результаты реакции учитывают по отсутствию гемагглютинации.

**Реакция агглютинации лейкоцитов (син. реакция лейкоагглютинации)** - метод определения тканевой совместимости донора и реципиента, основанный на феномене агглютинации лейкоцитов донора под действием антилейкоцитарных антител. Агглютинирующие антитела вызывают *in vitro* прямую агглютинацию лейкоцитов, обладающих соответствующим антигеном. После окрашивания агглютинаты выявляются под микроскопом.

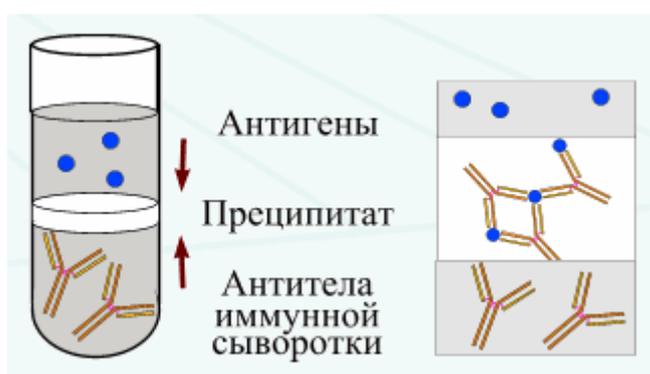
### **Реакция преципитации и ее варианты**

Реакция преципитации (от лат. *praecipito* - осаждать) - это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого **преципитатом**.

В основе реакций преципитации лежит образование и выпадение в осадок комплексов антиген-антитело. В реакции, в отличие от реакций агглютинации, участвуют **растворимые антигены - преципитиногены** (продукты микроорганизмов, тканей, химические вещества и лекарства). Антитела (**преципитины**), соединяясь с растворимыми антигенами, вызывают их агрегацию, что **проявляется в**

**помутнении прозрачных жидкостей или выпадении осадка (преципитата).** Диагностические преципитирующие сыворотки получают путем иммунизации лабораторных животных соответствующим антигеном. Титром преципитирующей сыворотки является минимальное количество антигена, которое данная сыворотка может преципитировать. Преципитат образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах; избыток одного из них снижает уровень образования иммунного комплекса.

Реакцию преципитации можно проводить в жидкой и плотной среде (в полужидком геле). Картину преципитата можно оценить макроскопически, однако более точен учет реакции с помощью нефелометрии (по степени помутнения раствора), что позволяет автоматизировать процесс.



**Реакция преципитации в жидкой среде - реакция кольцепреципитации.** Реакцию проводят в пробирках: на иммунную сыворотку медленно и аккуратно по стенке наслаивают (наносят) раствор антигена. При оптимальном соотношении антигена и антител на границе этих двух растворов образуется

непрозрачное кольцо преципитата. Контроль - использование нормальной сыворотки - преципитация отсутствует. Для экономии реагентов реакцию можно проводить в капиллярах (микропреципитация).

**Реакция преципитации в агаре.** Широкое распространение получили реакции преципитации **в полужидком геле агара или агарозы** — двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и др. Сущность реакций в том, что антигены и антитела, помещенные в разные лунки в агаре, диффундируют навстречу друг другу и при взаимодействии образуют комплекс, который выявляется в виде линии преципитации.

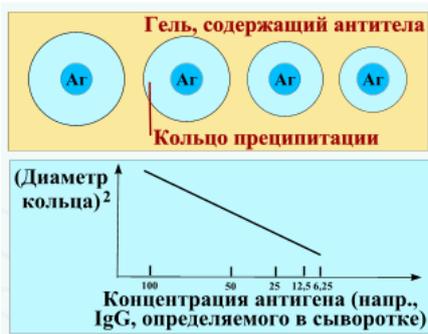
Ячейки пространственной решетки геля имеют размер 3-6 нм, поэтому белки могут проходить через агар, а иммунные преципитаты, наоборот, задерживаются. Наряду с агаром или агарозой для этой реакции используют желатин, ацетатцеллюлоза, полиакриламид, образующие гель.

**Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони.** При двойной диффузии антиген и антитела диффундируют навстречу друг другу. Для постановки реакции растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку. После затвердевания в нем вырезают лунки диаметром 2-3 мм. В лунки геля отдельно помещают антигены и

иммунные сыворотки, которые диффундируют в геле. В результате свободной диффузии в геле антигенов и антител в зоне оптимального (эквивалентного) их соотношения образуются полосы преципитации, которые выявляют визуально (в виде белой полоски) или при окрашивании. Особенностью метода является то, что каждая пара антиген — антитело формирует индивидуальную полосу преципитации, и реакция не зависит от наличия в исследуемой системе других антигенов и антител. Поэтому, в **многокомпонентных системах** между лунками с антигенами и антителами появляется **несколько линий преципитации**; у идентичных антигенов линии преципитата сливаются, а у неидентичных пересекаются.

Этот метод позволяет исследовать сразу несколько образцов иммунореагентов. Например, вокруг лунки с антисывороткой можно разместить несколько лунок с растворами разных антигенов или наоборот.

Принцип иммунодиффузии в геле положен в основу метода, который применяется для изучения токсигенности (способности вырабатывать токсин) бактерий. Например, для обнаружения дифтерийного токсина. О чем подробно Вы узнаете на микробиологии.

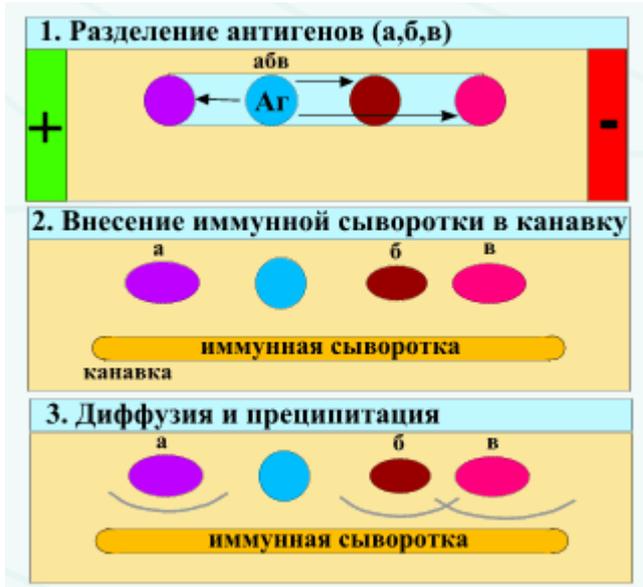


**Реакция радиальной иммунодиффузии (по Манчини).** Эта реакция используется для определения концентрации G, A, M классов иммуноглобулинов в сыворотке крови. При постановке реакции иммунную сыворотку вносят в расплавленный агаровый гель, который тонким слоем выливают на стеклянную пластинку (или в чашку Петри). После застывания в геле делают лунки, в которые помещают антиген - раствор исследуемой сыворотки и контрольные сыворотки с известной концентрацией иммуноглобулина, которые, диффундируя в гель, образует зоны преципитации в виде кольца вокруг лунок. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена. Реакцию используют, как указывалось, для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов (G, A, M), компонентов комплемента. (См. методическую рекомендацию по теме «Гуморальный иммунитет. Антитела.»).

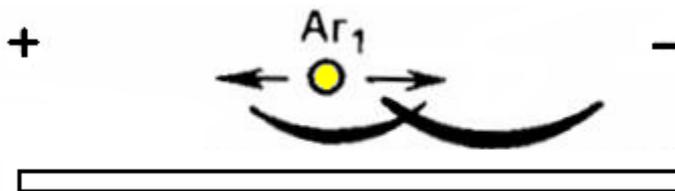
после застывания в геле делают лунки, в которые помещают антиген - раствор исследуемой сыворотки и контрольные сыворотки с известной концентрацией иммуноглобулина, которые, диффундируя в гель, образует зоны преципитации в виде кольца вокруг лунок. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена. Реакцию используют, как указывалось, для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов (G, A, M), компонентов комплемента. (См. методическую рекомендацию по теме «Гуморальный иммунитет. Антитела.»).

## Иммуноэлектрофорез (ИЭФ) - сочетание метода электрофореза и

иммунопреципитации в агаре. Реакцию проводят в два этапа. Вначале проводят электрофоретическое разделение антигена в забуференном агаровом геле. Смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза. В результате происходит перемещение антигенов на неодинаковые расстояния соответственно своей электрофоретической подвижности - в соответствии с их размером и зарядом.



После этого в канавку, которая расположена по краю пластинки, вносят специфическую иммунную сыворотку. Антигены и антитела диффундируют в геле навстречу друг другу. В месте их соприкосновения образуются **дугообразные линии преципитации**.



С помощью ИЭФ анализируются состав и количество белков сыворотки крови, спинномозговой жидкости, антигенных структур микроорганизмов.

## Реакция нейтрализации

Реакции нейтрализации основаны на способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать повреждающее действие микроорганизмов или их токсинов на чувствительные клетки или ткани. При отсутствии повреждающего эффекта смеси антител и микробов или их токсинов на культуру клеток говорят о специфичности взаимодействия комплекса антиген-антитело.

**Реакция нейтрализации экзотоксина** происходит при его взаимодействии с антитоксической сывороткой (антитела-антитоксины). В результате образования комплекса антиген-антитело токсин теряет свои ядовитые свойства.

Реакцию нейтрализации проводят с целью обнаружения и титрования токсинов, анатоксинов или антитоксинов. Реакцию нейтрализации токсинов можно оценивать **по биологическому эффекту**, так, например, титруют антистолбнячные и антиботулинические сыворотки. Смесь



токсина с антисывороткой, введенная животным, не вызывает их гибели, если количества антител в сыворотке достаточно для нейтрализации токсина. **Реакция нейтрализации in vivo.** Для определения типа токсина его смешивают с диагностической антитоксической сывороткой и эту смесь вводят белым мышам. При нейтрализации токсина антитоксической сывороткой мыши не погибают.

Реакцию нейтрализации используют для определения **антитоксического иммунитета** у детей при дифтерии (проба Шика) и скарлатине (проба Дика). Для этого в область предплечья внутрикожно вводят определенное количество соответствующего токсина (1/40 DLM). При наличии в организме антитоксинов произойдет нейтрализация токсина и реакция будет отрицательной. При отсутствии антитоксинов в организме возникает воспалительная реакция на месте введения токсина.

Варианты постановки реакции нейтрализации токсина: **реакция флокуляции** основана на способности токсина или анатоксина при смешивании в эквивалентных соотношениях с антитоксической сывороткой образовывать помутнение в пробирке. Механизм флокуляции аналогичен механизму реакции преципитации и обычно используют для количественного определения токсинов или анатоксинов.

Различные варианты реакции нейтрализации **применяют в вирусологии.** При смешивании вирусов с соответствующей антисывороткой и введении этой смеси животным или в клеточные культуры патогенность вирусов нейтрализуется и при этом животные не заболевают, а клетки культур не подвергаются деструкции.

**Реакция нейтрализации вирусов.** Данная реакция используется для идентификации вирусов. Для этого к исследуемому материалу, содержащему неизвестный вирус, добавляют специфическую противовирусную сыворотку. После инкубации эту смесь вводят либо в куриный эмбрион, либо лабораторному животному, либо в культуру клеток.

Наиболее распространена реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток. Если антитела соответствуют вирусу (нейтрализуют его), то клеточная культура развивается нормально. При этом происходит выделение кислых продуктов клеточного метаболизма, pH среды снижается, и индикатор изменяет свой цвет. В контроле вирус добавленный к клеточной культуре быстро разрушает ее, клетки погибают (отсутствует их метаболизм), pH не меняется, и цвет среды остается прежним.

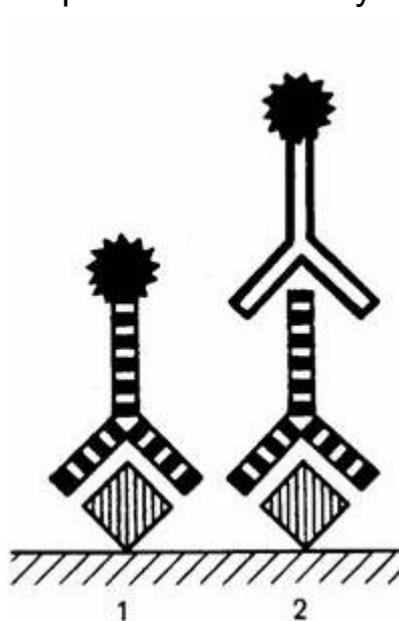
На этом же принципе основана реакция ингибции метаболизма для идентификации микоплазм.

## Реакции с использованием химических и физических меток антител.

### Реакция иммунофлуоресценции и ее варианты

Реакция основана на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками, мечеными флюорохромами, способны светиться в ультрафиолетовых лучах люминисцентного микроскопа (реакция иммунофлюоресценции).

**Иммунофлюоресценция** заключается в использовании меченных флюорохромом антител, точнее, иммуноглобулиновой фракции антител IgG. Меченное флюорохромом антитело образует с антигеном комплекс антиген — антитело, который становится доступным наблюдению под микроскопом в УФ-лучах, возбуждающих свечение флюорохрома.



#### Прямой метод иммунофлуоресценции (1)

основан на взаимодействии антител, меченых флюорохромом, с антигеном, который находится на клетке, в клетке или в тканях. В качестве флюорохрома используют флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ). Он дает зеленое свечение в ультрафиолетовых лучах, а тетраметилродаминизотиоцианат (ТРИТЦ) - оранжево-красное свечение.

Прямой метод одноэтапный: на фиксированный мазок клеток с антигеном наносят диагностическую сыворотку с антителами, мечеными ФИТЦ, инкубируют, отмывают и, при положительном результате, учитывают свечение в люминисцентном микроскопе.

Реакцию прямой иммунофлуоресценции используют для изучения клеточных антигенов, выявления вируса в зараженных клетках и обнаружения бактерий и риккетсий в мазках. Так, для диагностики бешенства отпечатки кусочков мозга животных, подозреваемых на вирусоносительство, **обрабатывают люминесцирующей антирабической сывороткой**. При положительном результате в цитоплазме нервных клеток выявляются глыбки ярко-зеленого цвета. На обнаружении антигенов вирусов в клетках отпечатков со слизистой оболочки носа основана **экспресс-диагностика гриппа, парагриппа и аденовирусной инфекции**.

Непрямой метод иммунофлуоресценции (2) заключается в том, что первоначально антиген обрабатывают обычной диагностической сывороткой, которую получают путем иммунизации кроликов соответствующим антигеном. Для обнаружения образовавшегося комплекса антиген-антитело используют антисыворотку, меченую



флюорохромом против иммуноглобулинов кролика. Такую сыворотку получают путем иммунизации барана иммуноглобулинами кролика. Непрямой метод дает возможность обнаруживать различные комплексы антиген-антитело с помощью одной меченой антиглобулиновой сыворотки.



Имунофлюоресценцию широко используют не только в бактериологии, вирусологии, паразитологии (для идентификации бактерий, риккетсий, вирусов), но и в иммунопатологии для обнаружения антител к тканевым антигенам человека, а также для определения рецепторов и антигенов клеток человека. Применяя меченые

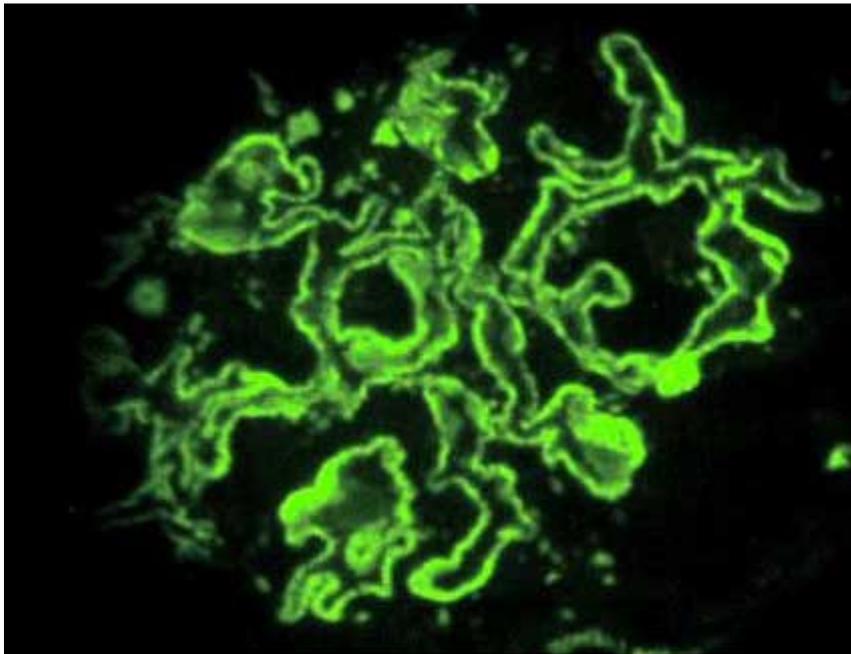
иммунные сыворотки против IgM- или IgG-антител, можно дифференцировать тип антител и обнаруживать ранний иммунный ответ по наличию IgM-антител.

### Имуногистологические методы

**Имуногистологические методы** предназначены для определения антигенов на поверхности или внутри клетки, например для обнаружения маркеров лимфоцитов при лимфомах, иммунных комплексов при гломерулонефритах и других заболеваниях почек. В этой реакции для выявления антигенов пользуются или **имунофлюоресценцией, или иммуноферментными конъюгатами с пероксидазой**. Количество специфических антигенов определяют по интенсивности окрашивания. Иногда используют автоматическую регистрацию с помощью спектрофотометра.

**Имуногистохимические методы** – методы морфологической диагностики, в основе которых лежит визуализация и оценка с помощью микроскопа результатов реакции антиген-антитело в срезах ткани. Можно сказать проще – это метод идентификации локализации антигена в тканях и клетках. В качестве антигена выступают компоненты клеточных структур или межклеточного вещества ткани. Антитела получают из сыворотки крови животных, иммунизированных интересующим антигеном, или используют моноклональные антитела. Антитела метят флюоресцирующей краской, что позволяло обнаружить комплекс тканевого антигена и диагностического антитела в гистологических срезах с помощью люминисцентного микроскопа. Следующий шаг в развитии иммуногистохимии был связан с разработкой антител, меченных не флюорохромами, а ферментами (имуноферментные конъюгаты). Для обнаружения места связывания меченных ферментом антител

применяют субстрат, который под воздействием ферментных меток превращается в окрашенные продукты. Иммуногистохимические методы



Иммунофлуоресцентное выявление IgG на базальной мембране клубочков почек при гломерулонефрите

применяются для иммунофенотипирования опухолей кроветворной и лимфоидной тканей; диагностики иммунокомплексных и аутоиммунных заболеваний (гломерулопатии, буллезные дерматозы, синдром Гудпасчера и др.)

Принципиальным отличием иммуногистохимии от других методов иммунологической диагностики,

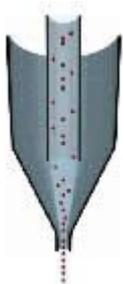
использующих реакцию антиген-антитело, является **структурная специфичность исследования**. Это означает, что в реакции оценивается не только наличие сигнала (есть окрашивание или нет) и его сила (интенсивность окрашивания), но и пространственное распределение сигнала в гистологическом препарате (окрашивание мембран клеток, цитоплазмы, ядра и других структурных элементов). В иммунологии важнейшим является **иммунофенотипирование клеток**.

### Метод проточной цитометрии

**Метод проточной цитометрии** является современной технологией для быстрого измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов. Регистрация рассеяния света лазерного луча при прохождении через него клетки в струе жидкости, позволяет по степени световой дисперсии получить представление о размерах и структуре клетки (соотношении ядро/цитоплазма, а так же о неоднородности и гранулярности клеток, определить субпопуляционный состав клеточной суспензии и др.). Более того, в ходе анализа учитывается уровень флуоресценции химических соединений, входящих в состав клетки (аутофлуоресценция) или внесённых в образец флуорохромов перед проведением проточной цитометрии. Для проточной цитометрии часто используют суспензии клеток крови, костного мозга, ликвора, суставной жидкости, плевральной жидкости, клеток тканей (например, опухолей), бактериальных клеток. Клеточную суспензию метят флуоресцирующими

моноклональными антителами или флуоресцентными красителями и подают в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку. Фотоэлектронные умножители, фиксирующие флуоресценцию, позволяют определить многие параметры (*размеры клеток, определить субпопуляционный состав клеточной суспензии*).

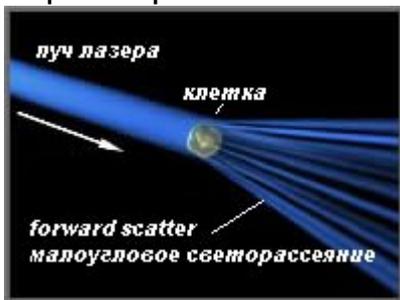
Принцип метода проточной цитометрии основан на регистрации параметров флюоресценции и светорассеяния от каждой отдельно взятой клетки в клеточной суспензии. Суспензию клеток предварительно окрашивают флуоресцирующими красителями (как правило, в роли красителей выступают **моноклональные антитела** к определенному антигену **конъюгированные с флуоресцентной меткой**).



Клетки под давлением подаются в проточную ячейку, где за счет разности давлений между образцом и обтекающей жидкостью клетки, находясь в ламинарном потоке жидкости, выстраиваются в цепочку друг за другом (т.н. гидродинамическое фокусирование струи в струе).

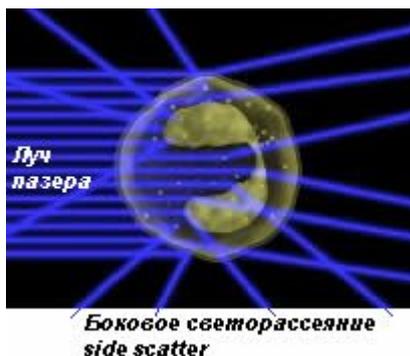
Клетки одна за другой проходят через лазерный луч, а высокочувствительные детекторы, расположенные вокруг проточной ячейки регистрируют флюоресценцию и рассеянное лазерное излучение каждой клетки. Полученный сигнал передается в компьютер, обрабатывается, и полученные данные отображаются в виде различных графиков и гистограмм.

В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют параметры клеток:



**Прямое (переднее, точнее, малоугловое) светорассеяние** - forward scatter. Детектор прямого светорассеяния располагается по ходу лазерного луча за проточной ячейкой и регистрирует излучение лазера, которое рассеивается под углами 2-19 градусов. Интенсивность рассеянного под малым углом света пропорциональна размеру клетки. Более

крупные клетки рассеивают свет сильнее мелких. Т.о. данная характеристика используется для определения **размеров клеток**.



**Боковое светорассеяние** - side scatter. Внутреннее содержимое клеток оптически неоднородно. Луч лазера, проходя сквозь клетку, многократно преломляется и рассеивается во все стороны. Регистрация этого излучения позволяет судить о сложности внутреннего строения клетки (соотношение ядро-цитоплазма, наличие гранул, других внутриклеточных включений). Комбинация бокового и прямого



светорассеяния позволяет судить **о морфологии клетки** в целом, выделять различные популяции клеток (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) для дальнейшего анализа.

**Регистрация излучения флуоресцентных меток** (FL1, FL2, и т.д.), имеющих строго определенную для каждого красителя (флуорохрома) длину волны. Система для регистрации свечения флуоресцентных меток состоит из комплекса светофильтров и фотоумножителей, каждый из которых регистрирует излучение в диапазоне длин волн, соответствующих используемых красителей (флуорохромомам). Одновременно можно проводить анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов клеток с помощью **моноклональных антител к ним, конъюгированных с различными флуоресцентными метками**. Использование несколько флуоресцентных меток позволяет проводить одновременный двух- и даже пяти-цветный анализ, так как каждый флуорохром при прохождении через луч лазера испускает свет различной длины волны. Если анализируемая клетка содержит флуорохром, то он испускает излучение соответствующих параметров, при этом интенсивность флуоресценции коррелирует с плотностью антигена на клеточной поверхности.

Выбор типа и количества флуоресцентных красителей определяется поставленной задачей для данного исследования.

Основными типами таких красителей являются моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой: **FITC (ФИТЦ) - флуоресцеин изотиоционат, PE (ФЭ) - фикоэритрин**, APC - алофикоцианин, PerCP - перидинин-хлорофилл протеин, а также тандемные красители (фикоэритрин-Cy5 и фикоэритрин-Cy7)) для определения мембранных и цитоплазматических антигенов клетки. (Выделенные шрифтом флуорофоры используются наиболее часто. Они возбуждаются аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и излучают флуоресценцию в разных диапазонах волн: **ФИТЦ** излучает свет в «зеленом» спектре, а **ФЭ** - в «оранжево-красном». Красители различаются по специфичности их молекулярного связывания).

Красители, позволяющие оценить жизнеспособность клеток (7AAD, PI). Так нежизнеспособные клетки выявляются по позитивности окрашивания с 7AAD,

Флуорофоры, связывающиеся с нуклеиновыми кислотами (DAPI, Hoechst),

pH-чувствительные флуорофоры (Fluo-3),

Ион-зависимые флуорофоры (Indo-1). Интенсивность флуоресценции по нескольким каналам позволяет определить субпопуляционный состав клеточной суспензии и др.

Полученные данные обрабатываются компьютером и отображаются в виде одномерных гистограмм или двух- и трехмерных точечных или плотностных графиков. Анализ данных позволяет определить количество



клеток, отвечающих тем или иным условиям, оценить интенсивность флуоресценции (т.е. плотность того или иного маркера на поверхности клетки).

Таким образом, методом проточной цитометрии производится анализ клеток по следующим основным параметрам:

1. Показатель прямого светорассеяния – forward side scatter (FSC), характеризующий размеры клеток.
2. Показатель бокового светорассеяния – side scatter (SSC), отражающий оптическую неоднородность цитоплазмы клеток, характер клеточных включений и гранулярность клетки.
3. Регистрация излучения флуоресцентных клеток (FL1, FL2, и т.д.) – каналы детекции специфического флуоресцентного сигнала красителя разной длины волны.

### **Области применения проточной цитометрии:**

**В иммунологии** – наиболее активное использование для иммунофенотипирования клеток периферической крови, оценки клеточного звена иммунитета (определение субпопуляций лимфоцитов и функционального их состояния), исследования иммунного статуса, определения фагоцитарной активности (захват меченных флуорохромами бактерий или дрожжей), определения внутриклеточных цитокинов и внутриклеточных белков, оценки клеточной цитотоксичности.

**В онкологии** - для количественного анализа внутриклеточных компонентов (ДНК), для анализа стадий клеточного цикла, выявления ануплоидного клона, определения пролиферативной активности ануплоидного клона, выявления специфических маркеров.

**В цитологии** - для определения цитоморфологической принадлежности клеток по размеру, соотношению ядро/цитоплазма, степени асимметрии и гранулярности клеток, оценки активности внутриклеточных ферментов с помощью флуорогенных субстратов, определения экспрессии поверхностных антигенов, анализа стадий клеточного цикла, измерения физиологических параметров клетки (внутриклеточный pH, концентрация свободных ионов Ca<sup>2+</sup>).

**В гематологии** - для анализа субпопуляционного состава клеток периферической крови, для подсчета ретикулоцитов, анализа тромбоцитов по специфическим маркерам, диагностики лимфопролиферативных заболеваний и острых лейкозов.

**В клинической микробиологии** – в последние годы стали использовать специфические антитела и олигонуклеотиды, меченные флуорохромами, или прямое определение окрашенных объектов проточной цитометрией, как идеальный инструмент для идентификации единичных организмов в клинических образцах. Проточная цитометрия позволила разработать быстрые количественные методы для оценки антимикробной чувствительности и дала возможность определения наличия гетерогенных популяций с разными ответами на антимикробные препараты.



**Иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)** - лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов и антител.

В основе ИФА лежит принцип специфического взаимодействия между антигеном и соответствующим ему моноклональным антителом. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием так называемого **конъюгата**, который представляет собой **анти-антитело, соединённое (конъюгированное) с ферментной меткой** (обычно используют фермент пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу). Конъюгат может быть получен с использованием поликлональных антител (например, кроличьи антитела против иммуноглобулинов человека) или моноклональных антител, направленных против человеческих иммуноглобулинов определённого класса (M, G, A). В зависимости от того, какие антитела использованы, тест-система будет выявлять в исследуемом образце или специфические антитела независимо от их класса, или антитела лишь определённого класса (например, только иммуноглобулин G или только иммуноглобулин M).

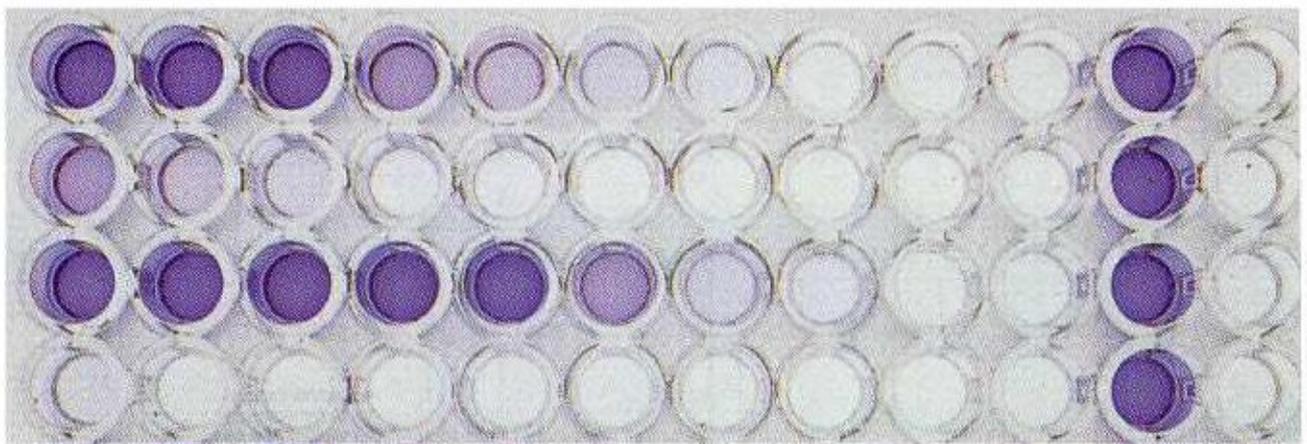
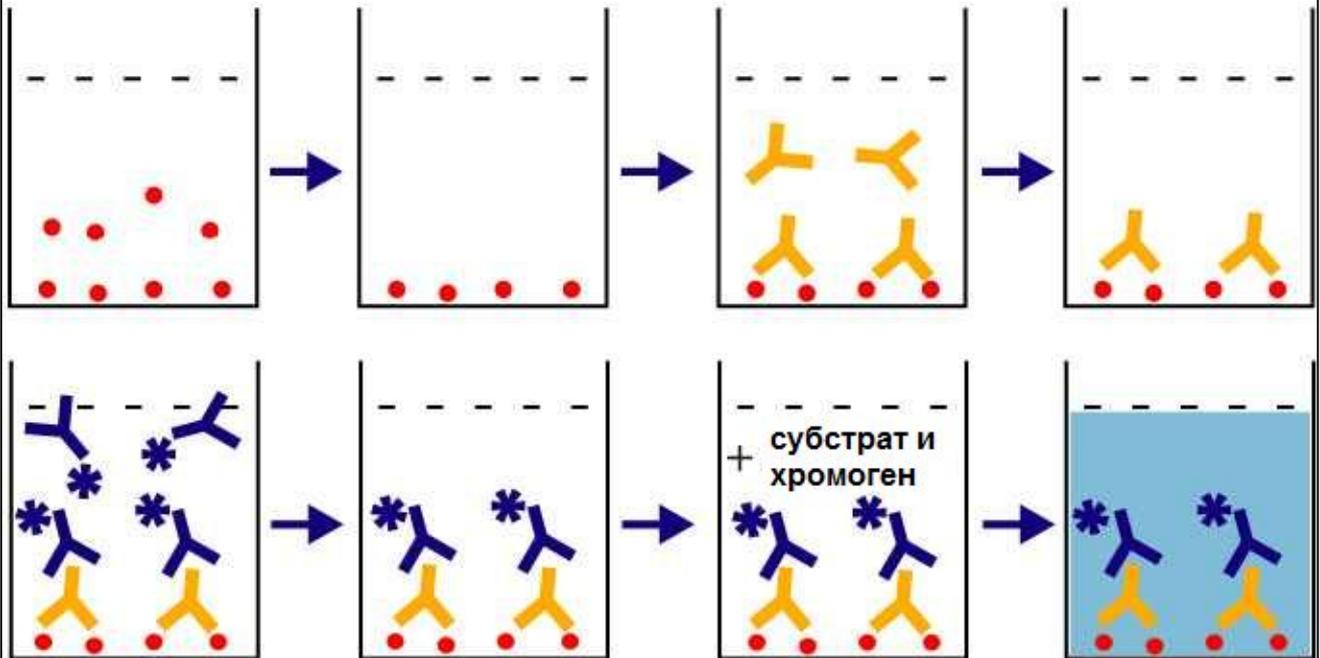
Чтобы обнаружить соединение меченых антител с антигеном, добавляют субстрат (хромоген), разлагаемый присоединенным ферментом, вместе с хромогеном, который окрашивается в желто-коричневый (пероксидаза) или желто-зеленый (фосфатаза) цвет. Подобно иммунофлуоресценции иммуноферментный метод применяют для обнаружения антигенов в клетках.

Хромоген - химическое соединение, хорошо растворимое в воде, раствор которого бесцветен. Превращение бесцветного хромогена в цветное вещество хромофор происходит под действием фермента, для которого хромоген является субстратом. Слова «хромоген» и «хромофор» в переводе с греческого означают «производящий цвет» и «несущий цвет», соответственно.

Для **выявления антител** известный антиген адсорбируют в лунках полистироловой пластины. Затем вносят исследуемую сыворотку, в которой хотят обнаружить антитела к данному антигену. После инкубации лунки промывают для удаления несвязавшихся белков и вносят в них антииммуноглобулиновые антитела, меченные ферментом (обычно пероксидазой). После инкубации и отмывания в лунки добавляют специфичный для фермента **субстрат** (перекись водорода) и **хромоген (орто-фенилендиамин)** для регистрации конечных продуктов расщепления субстрата. О наличии и количестве антител судят по изменению цвета и интенсивности окраски раствора.

Для **обнаружения антигенов** на носитель сорбируют антитела, затем вносят в лунки исследуемый материал и проявляют реакцию мечеными ферментом антителами к определяемому антигену.

### Этапы постановки ИФА



● - антиген     
 Y - антитела исследуемой сыворотки     
 \*Y - конъюгат (анти-антитело конъюгированное с ферментом)

**Области применения ИФА.** Методы ИФА обладают высокой чувствительностью и специфичностью и получили широкое распространение в различных областях биологии и медицины. В клинической диагностике с помощью ИФА определяют **концентрации лекарственных препаратов в организме, присутствие антигенов раковых клеток, вирусов, микробов, гормонов, ферментов, других биологически активных веществ** и т. д., содержащихся в исследуемом материале даже в концентрации  $10^{-10} - 10^{-12}$  г/л.



Используя твердофазные носители с антигенами, выявляют **антитела к различным видам бактерий, вирусов, простейших**. Так, планшеты с адсорбированными антигенами вируса иммунодефицита человека служат для диагностики ВИЧ-инфекции.

I. При определении **антител** в лунки планшетов с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больного, антиглобулиновую сыворотку, меченную ферментом, и субстрат/хромоген для фермента.

II. При определении **антигена** в лунки с сорбированными антителами вносят антиген (напр. сыворотку крови с искомым антигеном), добавляют диагностическую сыворотку против него и вторичные антитела (против диагностической сыворотки), меченные ферментом, а затем субстрат/хромоген для фермента.

### **Иммуноблот**

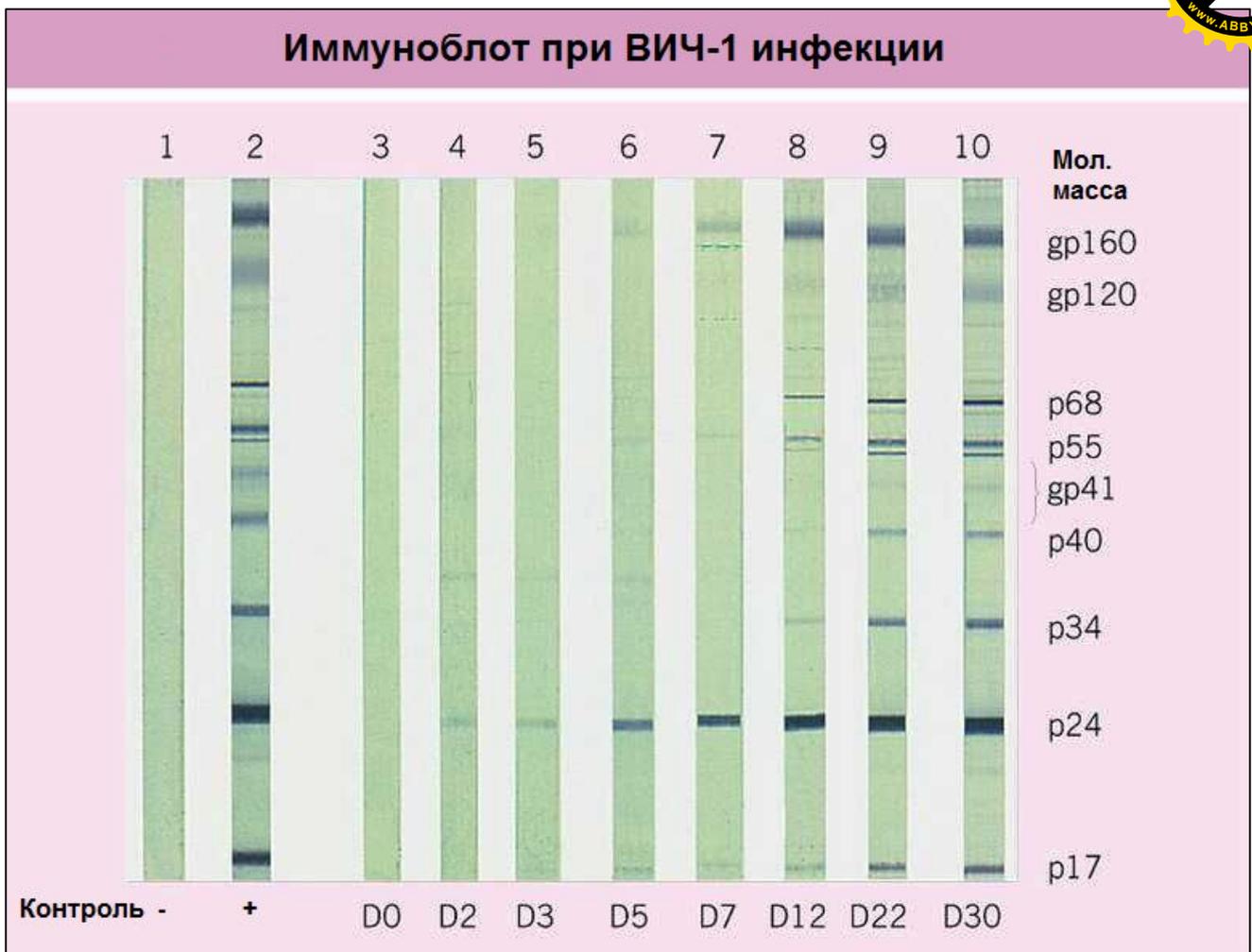
**Иммуноблот** или **иммуноблоттинг** (western blot) – высокочувствительный метод выявления антител к отдельным антигенам возбудителя, основанный на сочетании электрофореза и ИФА.

Предварительно проводят электрофорез в полиакриламидном геле сложного антигена (микроорганизмов, например, ВИЧ, ЦМВ, ВЭБ), затем переносят разделенные антигены на нитроцеллюлозную мембрану. Фирмы выпускают уже готовые полоски с «блотами» антигенов, т.е. электрофорез и перенос антигенов уже проведен.

На эти полоски наносят исследуемую сыворотку. Затем, после инкубации, полоски отмывают от несвязавшихся антител пациента и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченую ферментом. Образовавшийся на полоске комплекс (антиген + антитело больного + антитело против Ig человека) выявляют добавлением хромогенного субстрата, дающего окраску под действием фермента, т.е. проводится ИФА.

Если в исследуемой сыворотке имеются антитела против определенных антигенов - появляются окрашенные линии (пятна) на участке мембраны, где локализован данный антиген. Уникальность иммуноблота заключается в его высокой информативности и достоверности получаемых результатов. Только при положительном иммуноблоте ставится диагноз ВИЧ+.





## Радиоиммунный анализ

**Радиоиммунный или радиоиммунологический анализ (РИА)** - количественное определение антител или антигенов, меченых радионуклидами, с применением аналогичных нативных (немеченых) антигенов или антител. Основой радиоиммунологического анализа является использование радиоактивной метки для детекции специфических комплексов (АГ-АТ), образующихся в результате иммунологической реакции с исследуемым веществом. Открытие данного способа метки антител (антигенов) положило начало разработке целого ряда новых методик исследования, основанных на конкурентном и неконкурентном связывании определяемого вещества.

Принцип радиоиммунологического анализа основан на выявлении комплекса АГ-АТ, в котором **один из иммунореагентов мечен радиоактивным изотопом**. Обычно используют изотопы йода ( $I^{125}$  или  $I^{131}$ , гамма-излучатели), изотоп водорода (третий  $^3H$ , испускающий бета-частицы). После их взаимодействия выделяют образовавшийся радиоактивный комплекс антиген — антитело и определяют его



радиоактивность: количество меченого антигена, связавшегося с антителами, обратно пропорционально количеству искомого антигена. Широкое распространение получили так называемые **прямой и непрямой варианты твердофазного радиоиммунологического метода**, при которых используют полистироловые плашки с адсорбированными антигенами или антителами. Метод применяют для выявления антигенов микроорганизмов, определения гормонов, ферментов, лекарственных веществ и иммуноглобулинов. Учет реакции проводят по убыванию или по возрастанию радиоактивности (в зависимости от методики РИА) с помощью специальных счетчиков  $\beta$ - или  $\gamma$ -излучения. Причем радионуклид  $^{125}\text{I}$  менее стабилен по сравнению с тритием и реактивы с данной меткой необходимо использовать в течение 3—8 недель. Антигены, меченные тритием  $^3\text{H}$ , дольше сохраняются (до 3—6 месяцев), но имеют сравнительно низкую удельную радиоактивность и требуют специальных приборов для радиометрии — жидкостных сцинтилляционных счетчиков.

Метод высокочувствителен, но постепенно вытесняется иммуноферментным анализом, что связано с небезопасностью работы с радиоактивными изотопами, маленьким сроком хранения и необходимостью наличия сложного регистрирующего оборудования. Кроме того, необходима специальная система производства, доставки, учета, утилизации реагентов меченых радионуклидами.

### **Иммунохроматографический анализ**

**Иммунохроматографический анализ (ИХА)** - основан на хроматографии и реакции между антигеном и соответствующим ему антителом. Это сравнительно молодой метод анализа, являющийся одним из **бурно развивающихся, эффективных и востребованных методов лабораторной диагностики**. Он часто обозначается в как **метод сухой иммунохимии, стрип-тест, QuikStrip cassette, QuikStrip dipstick, быстрый тест, экспресс-тест или экспресс анализ**. Значение ИХА трудно переоценить, так как в современной медицинской практике с каждым годом возрастает роль лабораторной диагностики как основного инструмента постановки диагноза и мониторинга терапии.

Чувствительность и специфичность **быстрых иммунохроматографических тестов**, в настоящее время, близки к ИФА. При этом экспресс-тесты выполняются быстро (как правило, не более 15-20 минут), проведение анализа и интерпретация результата очень просты, для проведения анализа не требуется специального оборудования (оценка результата визуальная), специальных навыков. Очень важно, что анализ может быть проведен непосредственно в кабинете врача, что позволяет избежать потери времени на транспортировку образца в лабораторию и последующей передаче самого результата из лаборатории - назад врачу.



ИХА - метод определения наличия определенных веществ антигенной природы в биологических материалах (моча, цельная кровь, сыворотка или плазма крови, слюна, кал и т. д.). Данный вид анализа осуществляется при помощи **индикаторных полосок (тест-полосок), палочек, панелей или тест-кассет**, которые обеспечивают быстроту проведения тестирования.

Напомним, одним из самых важным свойством антител является их способность избирательно связываться с антигеном, а более точно – с определенной антигенной детерминантой. Это означает, что каждое антитело связывается только с определенным антигеном. На этой уникальной особенности антител и основан ряд иммунологических методов анализа, в том числе и ИХА. Причем определяемым “антигеном” в данном методе анализа может служить и определяемое в биоматериале антитело к инфекционному агенту или аутоантитело, тогда остальные используемые в тесте антитела будут являться анти-антителами.

Принцип действия **иммунохроматографического теста**.

В ИХА-полосках (экспресс-тестах) используются три типа антител:

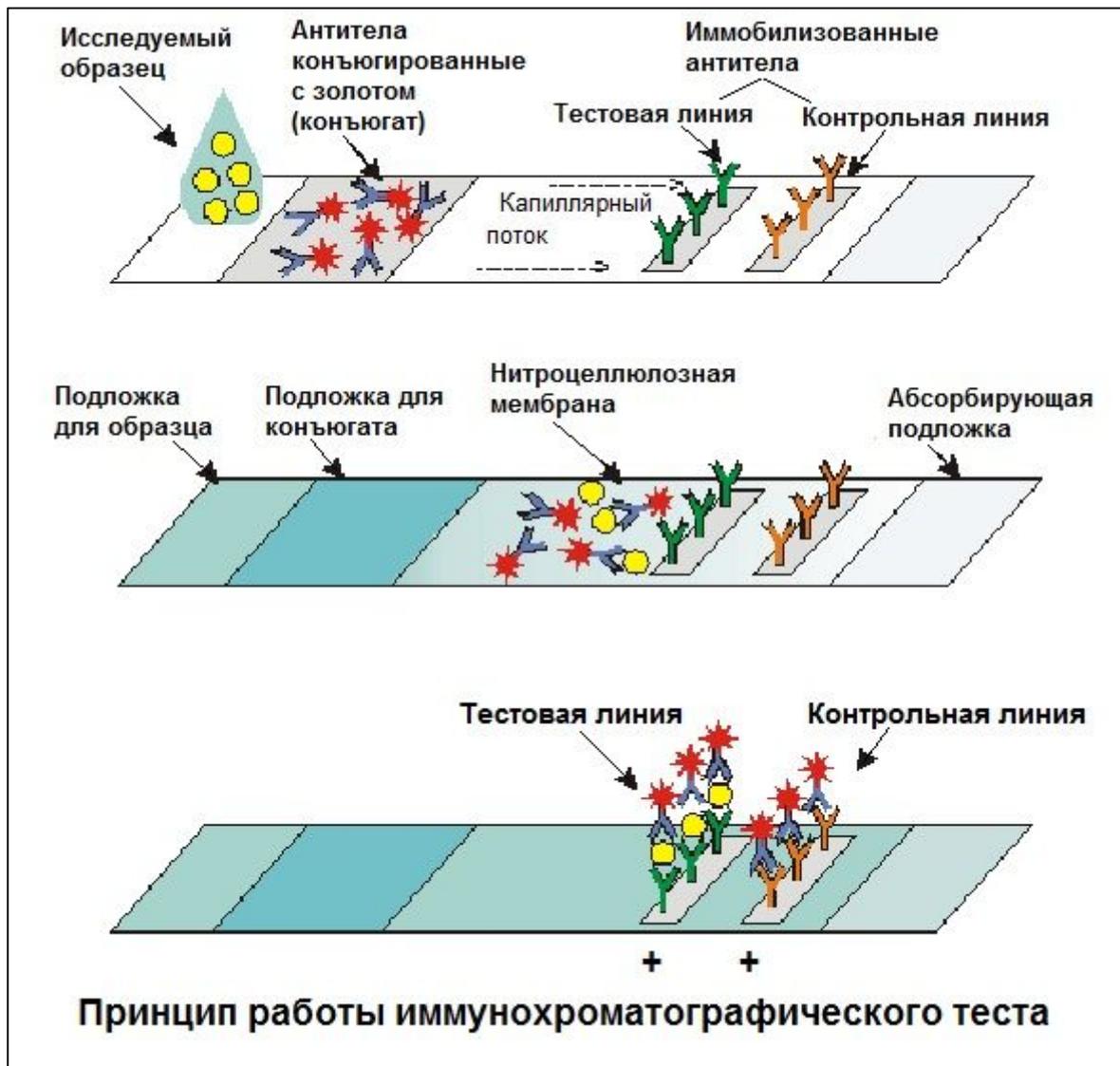
1. **Подвижные** (растворимые) **моноклональные антитела** к исследуемому антигену или антителу, конъюгированные (“сшитые”) с коллоидным золотом - красителем, который можно легко идентифицировать даже в самых малых концентрациях. Эти антитела нанесены вблизи участка погружения тест-полоски в исследуемую жидкость (мочу, кровь, ...). И после погружения в биологическую жидкость мигрируют вместе с жидкостью.

2. Поликлональные антитела к исследуемому антигену или антителу, жестко **иммобилизованные в тест-зоне полоски**.

3. Вторичные антитела к моноклональным антителам, жестко **иммобилизованные в контрольной зоне тест-полоски** (анти-антитела).

При погружении теста (тест-полоски) в физиологическую жидкость (сыворотка, моча, слюна и др.) она начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии. Вместе с жидкостью движется жидкая фаза тест-полоски содержащая антитела с **красителем**. Если в этой жидкости присутствует исследуемый антиген (гормон, онкологический или инфекционный маркер), то происходит его связывание, с растворимыми мечеными коллоидным золотом антителами. Иммуновый комплекс движется под действием капиллярных сил вдоль полоски, а в тестовой зоне связывается с жестко иммобилизованными (фиксированными) антителами, образуя окрашенную полоску. Таким образом, происходит накопление антител с красителем, антигеном, в зоне фиксированных антител в тестовой зоне. Это визуально проявляется в виде окрашивания тест-полоски. Свободные антитела с красителем (избыток не прореагировавших, не связавшихся)

мигрируют далее вдоль полоски и в контрольной зоне взаимодействуют со вторичными антителами, где и наблюдается вторая окрашенная (контрольная) полоса. **Окрашенная полоса в контрольной зоне должна проявляться всегда**, если анализ проведен правильно, независимо от присутствия исследуемого антигена в исследуемой жидкости.



### Области применения ИХА.

С помощью экспресс-тестов в настоящее время можно определять:

#### **Состояние и фазы репродуктивной (детородной) системы женщины.**

Биологическими маркерами в этих случаях являются гормоны репродуктивной системы, например пик повышения уровня **лютеализирующего гормона (ЛГ)** в моче предшествует моменту овуляции, т.е. периоду, благоприятному для зачатия. Повышение уровня **хорионического гонадотропина (ХГЧ)** свидетельствует о наступлении беременности.

**Инфекционные и вирусные маркеры.** Либо сами инфекционные агенты, либо антитела, которые вырабатывает человеческий организм

при попадании в него патогенных бактерий или вирусов. Эти маркеры можно обнаружить задолго до появления клинических симптомов заболевания, например, **туберкулеза**. Экспресс-тестами можно определить **маркеры наиболее опасных вирусных заболеваний: вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вызывающий заболевание СПИДом, гепатиты В и С, туберкулез, сифилис**. Смотрите презентацию «Быстрые тесты на ВИЧ 2011» ([http://tvergma.ru/index.php?option=com\\_kaf&id\\_kaf=20&Itemid=260#file](http://tvergma.ru/index.php?option=com_kaf&id_kaf=20&Itemid=260#file) - на официальном сайте Тверской медицинской академии), в которой показаны все этапы постановки тестов.

В обзоре доктора Пант Пай и её коллег (The Lancet Infectious Diseases, Early Online Publication, 24 January 2012) проведен анализ и систематизация результатов исследований, содержащихся в мировых базах. Оральный (саливационный) тест на ВИЧ (Oraquick advance rapid HIV-1/2) становится одним из наиболее популярных, поскольку он комфортен и лёгок в применении. Неинвазивный, безболезненный, удобный, - дает результат через 20 минут. «Людей трудно заставить приходить на ВИЧ-тестирование в муниципальные клиники, поскольку это связано с публичностью процесса, боязнью общественного порицания, отсутствием конфиденциальности и дискриминацией. Конфиденциальное тестирование, такое как автотест, может положить конец страхам позора, который традиционно ассоциируется с анализами на ВИЧ», - говорит доктор Пант Пай, работа которой поддержана программой «Восходящая звезда здравоохранения» (Rising Star in Global Health Award) канадской организации Grand Challenges Canada. «Сегодня появилась глобальная перспектива применения альтернативных стратегий, когда люди смогут получать информацию о своем ВИЧ-статусе путем самотестирования».

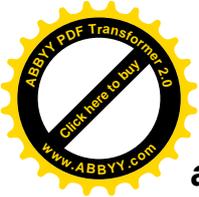
**Маркеры соматических заболеваний.** Эти заболевания сопровождаются повышенным синтезом в организме определенных биологических маркеров: при аллергии, например, это **иммуноглобулины класса E (IgE)**; при раке предстательной железы - это **простатоспецифический антиген (PSA)**; при гастрите и язве желудка определяют **антитела к бактерии Helicobacter Pylori**.



**Наркотические вещества.** При приеме наркотических веществ определенное их количество выводится из организма с мочой; тестируя образцы мочи можно установить факт употребления наркотиков или вид употребленного наркотика.

Принцип работы **тестов на наркотики** несколько **отличается** от других тест-систем. Устройство ИХА-полоски

отличается тем, что **в тест-зоне иммобилизованы искусственные**



**антигены**, способные специфически связываться со свободными антителами. Если исследуемый антиген (наркотик) **НЕ присутствует** в физиологической жидкости, участки связывания антител (эпитопы) остаются свободными, и они способны связываться с искусственными антигенами в тест-зоне, образуя темную полосу за счет конъюгированного красителя.

Соответственно, если исследуемый антиген **присутствует** в жидкости, то антитела, связавшись с ним, уже не могут взаимодействовать с антигенами в тест-зоне, и образования темной полосы там не происходит. Но в обоих случаях (если анализ проведен правильно) происходит связывание "окрашенных" антител с вторичными антителами в контрольной зоне и образование там темной полосы.

Возможные варианты при проведении анализа: одна полоса — положительный результат, две полосы — отрицательный результат, нет полос — анализ проведен неправильно.

Хотелось бы подчеркнуть **основные преимущества** использования иммунохроматографических тест-полосок: **Простота, удобство и оперативность** - позволяет получить в короткие сроки результат (анализ и первичное представление о причине заболевания) без оборудования и специальных навыков; **Надежность** - достоверность тестов достигает 99,8%, при этом каждый тест имеет встроенный внутренний контроль; **Экономичность** - минимальные затраты на приобретение теста и экономия времени на проведение обследования; **Анонимность** - что особенно важно, например, при выявлении фактов употребления наркотических веществ, что планируется ввести в школах;

Однако иммунохроматографические тест-полоски имеют ряд особенностей и не лишены недостатков. Надежность и чувствительность зависит, во-первых, от качества используемых в тесте моноклональных антител и, во-вторых, от концентрации антигена в биоматериале. Качество моноклональных антител зависит от способов их получения, очистки и фиксации на носителе. Концентрация антигена - от стадии заболевания и количества биоматериала. Количество биоматериала особенно важно при использовании цельной крови. При этом существенную роль играет гематокрит, т. е. соотношение плазмы и форменных элементов. При высоком гематокрите снижается количество плазмы с антигеном, мигрирующей вдоль полоски. Температура, от которой зависит скорость взаимодействия антитела с антигеном, важна только для времени постановки теста.

В бюджетных медицинских организациях, при массовом проведении исследований, ИФА более экономичен. А главное, не решены многочисленные вопросы этики и безопасности. Лица, не имеющие специальной подготовки, могут безоглядно положиться на результаты используемых ими наборов для самодиагноза *in vitro*. При этом ложный отрицательный результат приведет к тому, что больной не получит вовремя соответствующей квалифицированной медицинской помощи.



Ложный положительный результат может оказать влияние на психическое состояние пациента.

**Вопросы для самоподготовки к занятию (сможете ли Вы ответить?)**

(**Впишите** дома. Это позволит судить об уровне Вашей подготовки. На занятии Вы проверите правильность ответов, дополните или исправите их). Ответы вписать !

1. Иммуноглобулин какого класса обладает самым высоким агглютинирующим свойством? Почему? .....
2. Какие реакции называются серологическими? .....
3. При каком соотношении антигена и антител образуется наибольшее количество иммунных комплексов? .....
4. Перечислите корпускулярные антигены, которые Вам известны? .....
5. Что такое агглютинины? .....
6. Реакция прямой агглютинации чаще всего применяется для определения ... ..
7. Диагностические агглютинирующие сыворотки содержат антитела или антиген? .....
8. Реакция пассивно гемагглютинации – напишите синоним .....
9. Что такое эритроцитарный антигенный диагностикум? Для чего он применяется? .....
10. Что такое эритроцитарный иммуноглобулиновый диагностикум? Для чего он применяется? .....
11. Какая реакция используется для выявления неагглютинирующих антиэритроцитарных антител? .....
12. Что такое прямая реакция Кумбса? .....
13. Что такое непрямая реакция Кумбса? .....
14. Для чего применяется РТГА? .....
15. Укажите виды реакций преципитации? .....
16. Назовите реакцию на основе феномена преципитации, которая используется для определения концентрации Ig в сыворотке крови .....
17. Для чего используют реакцию нейтрализации? .....



- 18. Виды реакции иммунофлуоресценции .....
- 19. Укажите области применения проточной цитометрии .....
- 20. Перечислите ингредиенты необходимые для постановки ИФА .....
- 21. Иммунохроматографический анализ принцип работы объяснить по схеме.
- 22. Преимущества ИХА .....

**Учебно-исследовательская работа студентов (УИРС)  
Варианты тем рефератов:**

- 1. Иммуноблоттинг в диагностике ВИЧ инфекции.
- 2. Иммунофенотипирование лимфоцитов.
- 3. Иммунохроматографические методы в диагностике инфаркта миокарда.
- 4. Цоликлоны – использование в определении групп крови
- 5. Метод агглютинации в геле для определения антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител

**Примеры тестов и эталоны ответов**

- 1. **Наибольшее количество комплексов АГ-АТ образуется при**
  - 1) избытке молекул антител
  - 2) избытке молекул антигена
  - 3) эквивалентном количестве антигена и антител
  
- 2. **Реакцией агглютинации можно выявлять**
  - 1) антигены и антитела
  - 2) только антигены
  - 3) только антитела
  - 4) корпускулярные антигены
  - 5) растворимые антигены
  
- 3. **Корпускулярными антигенами являются**
  - 1) вирусы
  - 2) бактерии
  - 3) эритроциты
  - 4) антитела
  - 5) частицы латекса
  
- 4. **В реакции прямой агглютинации используются**
  - 1) растворимые антигены
  - 2) корпускулярные антигены





- 3) частицы, на поверхности которых сорбированы антигены
- 4) частицы, на поверхности которых сорбированы антитела

**5. Эритроцитарный антигенный диагностикум – это**

- 1) эритроциты, сенсibilизированные антигеном
- 2) эритроциты, сенсibilизированные антителами
- 3) эритроциты известной группы крови

№ вопроса	1	2	3	4	5
Ответы	3	1, 4	2, 3, 5	2	1

**Список основной рекомендуемой литературы по теме занятия:**

- 1) Хаитов, Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология. 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство Медицина», 2010. - 752 с. (стр. 647 – 657.)
- 2) Лекционный материал.

**Дополнительная литература для подготовки к занятию:**

- 1. Коико Р., Саншайн Д., Бенджамини Э. Иммунология: учебное пособие / пер. с англ. А.В.Камаева, А.Ю.Кузнецовой под ред. Н.Б.Серебряной. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 368 с. (стр 79 – 100.).
- 2. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. – М.: Мир, 2000. – 592с. (стр.527 – 542).
- 3. Ярилин А. А. Иммунология: учебник. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с.