


ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
Федеральное казённое учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный  
институт Сибири и Дальнего Востока»

# **ИММУНОСЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**



УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ  
ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ

ИРКУТСК – 2022



Федеральная служба по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия человека  
Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный институт  
Сибири и Дальнего Востока»

# **ИММУНОСЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

**Учебное пособие  
для врачей-бактериологов**

Иркутск – 2022

УДК 616.9-071  
ББК 53.4:55.14  
И53

Иммуносерологические методы диагностики инфекционных болезней: учебное пособие для врачей-бактериологов. – Иркутск: ИНЦХТ, 2022 – 88 с.

ISBN 978-5-98277-360-9

Утверждено Ученым советом  
ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора»

Учебное пособие включает расширенную теоретическую часть, рассматривающую характеристики и основные свойства антигенов и антител, основы их взаимодействия, иммуносерологические методы диагностики инфекционных болезней, и практическую часть, в которой подробно описаны методики постановки серологических реакций, направленных на обнаружение возбудителей инфекционных заболеваний и антител к ним.

Пособие предназначено для обучения врачей-бактериологов (биологов), эпидемиологов и лаборантов при прохождении профессиональной переподготовки по основным и дополнительным профессиональным образовательным программам (свыше 500 ч), на циклах повышения квалификации по профилю программ профессиональной переподготовки (144 ч, 72 ч) по особо опасным инфекциям; пособие может быть использовано широким кругом специалистов, занимающихся лабораторной диагностикой инфекционных заболеваний.

Авторы:

*Т.Ю. Загоскина, Т.М. Долгова, О.В. Гаврилова, О.Б. Колесникова,  
В.Ю. Колесникова, О.А. Старикова, С.В. Балахонов*

ISBN 978-5-98277-360-9



© Коллектив авторов, 2011, 2022  
© ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора, 2022  
© Оформление ИНЦХТ, 2022



## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	5
Теоретические основы взаимодействия антигена с антителом ...	5
Антигены .....	5
Антигены бактерий .....	10
Антитела .....	11
Взаимодействие антитела с антигеном .....	18
Синтез антител .....	22
Иммуносерологические методы исследования .....	24
Реакция агглютинации .....	25
Варианты реакций агглютинации .....	28
Практические занятия .....	32
Иммуносерологические методы исследования .....	32
Агглютинационные методы .....	34
Реакция преципитации и ее варианты .....	42
Практические занятия .....	48
Преципитационные методы .....	48
Методы иммунофлуоресценции .....	53
Практические занятия .....	59
Метод флуоресцирующих антител .....	59
Прямой МФА для специфической индикации ПБА .....	61
Непрямой МФА .....	63
Варианты иммуносорбентного анализа на твердой фазе .....	66
Методические варианты ИФА для определения антител и антигенов .....	70
«Сэндвич»-вариант ИФА для определения АГ и иммунных комплексов .....	70
Непрямой ИФА для выявления АТ .....	70
Варианты твердофазного иммуноферментного анализа .....	72
Мультиплексный фосфоресцентный микроанализ .....	76
Практические занятия .....	79
Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) .....	79

Серологические реакции, протекающие с участием комплемента .....	82
Серологические реакции, протекающие с участием фагоцитов .....	85
Реакции нейтрализации .....	86
Нормативные документы и используемая литература .....	87

## ВВЕДЕНИЕ

Серологические методы исследования в настоящее время широко применяются в лабораторной диагностике целого ряда заболеваний различной этиологии. Они позволяют фиксировать наличие антиген-содержащего материала, не прибегая к изоляции патогена. В отличие от бактериологического и биологического методов, достоверность которых вытекает из факта выделения возбудителя, серологические тесты представляют доказательства присутствия в исследуемом материале искомого агента на основе специфического взаимодействия антиген-антитело (АГ-АТ). Важным преимуществом этих методов является возможность индикации не только корпускулярных, но и субкорпускулярных и растворимых АГ.

К настоящему времени предложены и используются разнообразные серологические реакции, позволяющие с одинаковым успехом выявлять как АГ, так и специфические АТ.

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИГЕНА С АНТИТЕЛОМ

### Антигены

В иммунологических методах участвуют два специфических элементарных по отношению друг к другу компонента: антиген (АГ) и соответствующее ему антитело (АТ). Они составляют одну специфическую систему типа «ключ-замок».

**АГ** – это вещества различного происхождения, несущие признаки генетической чужеродности и вызывающие развитие специфических иммунных реакций (гуморальных, клеточных, состояние иммунологической толерантности, индуцирование иммунной памяти).

Свойства АГ определяются комплексом признаков: иммуногенность, антигенность, специфичность, чужеродность.

- **Чужеродность.** АГ вызывает иммунный ответ, т.е. образование АТ только в тех случаях, когда он чужероден. К собственным АГ организм толерантен.

- **Антигенность** – способность АГ избирательно реагировать со специфичными к нему АТ- или АГ-распознающими рецепторами лимфоцитов. Антигенностью обладают микроорганизмы и их токсины,

паразиты. Синтез АТ могут индуцировать яды белковой природы (змеиный), эритроциты, яичный альбумин, белки, сложные полисахариды (ПС), липополисахариды (ЛПС), полипептиды, комплексные соединения белков с липидами, полисахаридами, некоторые искусственные высокополимерные соединения.

• **Иммуногенность** – способность индуцировать иммунный ответ. При анализе генетического контроля иммунного ответа выявлены линии мышей и морских свинок, одни из которых отвечают на определенный АГ, а другие остаются к нему ареактивными. Иными словами, АГ в качестве иммуногена проявляется тогда, когда иммунная система конкретного организма способна к адекватному ответу.

Иммуногенность АГ повышается по мере увеличения размера и полимерности молекул этого АГ. Низкополимерный АГ может вызывать не только более слабый, но и качественно иной иммунный ответ, чем АГ, обладающий тем же составом, но более высоким уровнем полимерности. Повышение иммуногенности АГ с возрастанием полимерности их молекул имеет верхний предел. При дальнейшем возрастании полимерности молекулы АГ приобретают способность вызывать специфическую иммунодепрессию или толерантность. Иммунологическая толерантность – это состояние организма, при котором последний не способен отвечать продукцией АТ на введение АГ.

• **Специфичность** – структурные особенности, отличающие один АГ от другого.

АГ делятся на 2 группы: **полноценные (полные)** – иммуногенные, всегда проявляющие антигенные свойства; **неполноценные (гаптены)** – неиммуногенные.

Способностью вызывать развитие иммунного ответа и определять его специфичность обладает фрагмент молекулы АГ – **антигенная детерминанта (эпитоп)** (рис. 1).

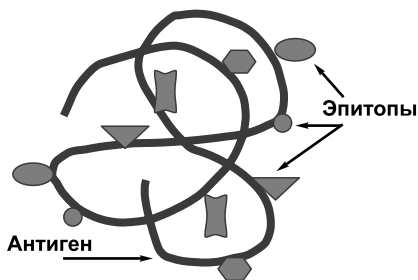


Рис. 1. Антигенные детерминанты (эпитопы)

Антигенная детерминанта – небольшой участок молекулы АГ, образующий пространственную конфигурацию за счет остатков молекул аминокислот, углеводов или липидов, который и является фактическим местом присоединения молекулы АТ. 1 молекула АГ может содержать несколько структурно отличающихся антигенных детерминант, что обуславливает **поливалентность АГ**. **Валентность АГ-молекулы** определяется числом однородных детерминант, способных соединиться с активным центром АТ одной и той же специфичности.

Молекулы гаптенов моновалентны. По валентности АГ можно судить о его молекулярной массе. В среднем валентность белковых АГ составляет от 5 до 15.

В ответ на большинство поливалентных антигенов АТ образуются к каждой детерминанте. Комплементарность АГ-детерминанты к АТ у специфического АГ выше, чем у перекрестно реагирующего. В основе взаимодействия перекрестно-реагирующих АГ с АТ лежит структурное подобие или полное сходство с детерминантами специфического АГ. **Моноклональные АТ** специфически распознают только одну АГ-детерминанту и связываются с ней. Поликлональные АТ, как правило, распознают несколько антигенных детерминант в составе АГ.

По химическому строению, основным иммунологическим свойствам, а также по методам их изучения детерминанты можно условно подразделить на 3 больших группы.

**1. Гаптены** [от греч. *hapto*, прикрепляться] (неполные АГ) – это вещества с низкой молекулярной массой, способные вступать во взаимодействие с АТ, но не вызывающие их образование. При увеличении размера гаптенных групп (при конъюгировании с белками), они приобретают свойства полноценных АГ. **Полугаптены** – неорганические вещества (йод или хром), присоединение которых к молекуле белка меняет его иммуногенные свойства. Образующиеся АТ специфичны к йоду или хрому, то есть к детерминантам на поверхности полного АГ, но не к белку-носителю. **Проантигены** – гаптены, способные присоединяться к белкам организма и сенсibiliзировать его как аутоантигены. Например, метаболиты грибов пенициллов или продукты распада пенициллинов могут связывать белки и вызывать развитие к ним иммунных реакций.

**2. Олигосахаридные детерминанты** входят в состав гликолипидов (АГ клеточных стенок бактерий и главные АГ групп крови) и гликопротеинов (резус-фактор). Основные АГ-детерминанты полисахаридов представляют собой короткие олигосахариды (1–6 остатков сахара). Специфические свойства АГ-детерминанты полисахарида определяются последовательностью входящих в ее состав сахаров и способом их соединения друг с другом.

**3. Пептиды** – АГ-детерминанты белковой природы состоят из аминокислотных остатков, расположенных в пространстве определенным образом. Их делят на концевые и конформационные. Специфичность первых определяется, главным образом, составом короткой концевой пептидной цепочки. Вторые находятся в середине молекулы и их специфичность определяется ее третичной структурой.

Соединение АГ-детерминанты с активным центром АГ обеспечивается различными типами химического взаимодействия молекул: ван-дер-ваальсовыми силами, полярным взаимодействием молекул, образованием водородных связей и гидрофобным взаимодействием. Прочность такого соединения выше для тех детерминант, в составе которых находятся радикалы, приобретающие в водном растворе сильный «+» или «-» заряд.

Большая часть АГ способна запускать иммунные реакции, выступая в последующем в качестве мишени, в отношении которой эти реакции реализуются. **Суперантигены** – АГ, способные непосредственно, без предварительной обработки АГ-представляющими клетками взаимодействовать с молекулами МНС (главного комплекса гистосовместимости). При этом распознавание АГ теряет строгую избирательность, вовлекаются большие группы Т-клеток. Их активация сопровождается избыточной продукцией различных медиаторов иммунного ответа, что может привести к развитию аутоиммунных реакций (например, АГ микоплазм, стрептококков, кампилобактеров и т.д.).

Особую группу составляют АГ, способные подавлять иммунные реакции с развитием специфической неспособности отвечать на них. Это состояние известно как **иммунная толерантность**. Благодаря генетическому разнообразию индивидуумов, вещество-иммуноген для одного из них может быть толерогеном для другого. Действуя как иммуноген при парентеральном введении (например, внутримышечно), то же вещество может быть толерогеном при введении другим путём (например, пероральном).

В роли АГ выступают белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты; эти соединения могут образовывать комбинации между собой или с липидами. Липиды неиммуногенны, что определяется недостаточной жёсткостью структуры этих молекул и преимущественно линейной конфигурацией. Наибольшей иммуногенностью обладают белковые АГ. Чем дальше от человека в эволюционном отношении отстоят организмы, тем большую иммуногенность проявляют их белки.

**АГ подразделяются на:** а) **экзогенные** – поступают извне, подвергаются эндоцитозу и расщеплению в АГ-представляющих клетках, б) **эндогенные** – продукты собственных клеток организма (белки, син-

тезируемые вирусинфицированными клетками хозяина и аномальные белки опухолевых клеток).

**Молекулярная масса** АГ имеет существенное значение. Вещества с массой более 5–10 кД – сильные иммуногены. Исключение – нуклеиновые кислоты, обладающие большой молекулярной массой, но слабой (по сравнению с белками) иммуногенностью.

**Растворимость.** Нерастворимые белки (например, кератины) не могут находиться в коллоидной фазе и не вызывают развития иммунных реакций.

**АГ по специфичности делятся на 10 типов.**

1. **Видовая специфичность** – особи одного вида отличаются от особей другого вида (АГ мыши отличаются от АГ кролика).

2. **Групповая специфичность (индивидуальная)** – различия среди особей одного вида организмов. **Аллоантигены (изоантигены)** – АГ конкретного индивидуума, обладающие иммуногенностью по отношению к другим представителям этого вида, но не к организму-донору трансплантата. Яркий пример изоантигенов – групповые Аг крови, присутствующие на мембранах эритроцитов и других клеток. Поскольку человек обладает естественными АГ к групповым Аг крови, последние приобретают свойства сильных трансплантационных Аг. Поэтому перед трансплантацией и гемотрансфузией необходимо определить группы крови донора и реципиента.

3. **Типоспецифичность** – относится только к микробам. Так пневмококки по полисахаридным АГ делятся на 4 типа, каждый из которых обладает своими особенностями.

4. **Гетероспецифичность** – обусловлена АГ, общими для представителей разных видов (сходство отдельных структурных компонентов органов и тканей человека с антигенами возбудителей чумы, бруцеллеза, холеры).

5. **Органоидная специфичность** – обусловлена органоидами клетки (ядро, митохондрии и т.д.).

6. **Функциональная специфичность** – связана с функцией данной молекулы (общие АГ тканей печени человека и животного за счет их функции).

7. **Стадиоспецифичность** – введена в связи с развитием иммунологии эмбриогенеза.

8. **Гаптеноспецифичность** – любой гаптен может обеспечивать свою специфичность.

9. **Патологическая специфичность** – обеспечена специфичностью патологически измененных тканей (ожоговые, лучевые, раковые).

10. АГ-специфичность ДНК.

## Антигены бактерий

Большинство возбудителей инфекционных заболеваний человека, их структуры и токсины – полноценные АГ, вызывающие развитие иммунных реакций.

В основе классификации АГ бактерий лежит их локализация (**жгутиковый, капсульный АГ** и т.д.), биологическая функция (**гемолизин, энтеротоксин**) или метод обнаружения (**преципитиноген, агглютиноген**). **Н-АГ – жгутиковые** – входят в состав бактериальных жгутиков, представляют собой белок – флагеллин, разрушающийся при нагревании, после обработки фенолом сохраняющий свои АГ-свойства. **О-АГ – соматический** – связан с ЛПС клеточной стенки, термостабилен, сохраняется при кипячении в течение 1–2 ч, не разрушается после обработки формалином и этанолом. **К-АГ – капсульные** – располагаются более поверхностно, чем О-АГ, тесно связаны с ЛПС клеточной стенки и капсулой. У некоторых возбудителей имеется термолабильный **Vi-АГ (АГ вирулентности)**, выявление которого имеет важное значение для серотипирования бактерий. Поверхностные эндоАГ (жгутиковый, капсульный, соматический) характеризуются большей антигенностью, чем внутриклеточные (цитоплазматических мембран, цитоплазмы, рибосом, НК).

Для возбудителей отдельных инфекций предложены **АГ-схемы** – классификация видов бактерий по АГ-структуре. Первая АГ-классификация бактерий была разработана Уайтом. В 1934 г. Кауфман предложил использовать ее для классификации бактерий рода *Salmonella*. В настоящее время она значительно дополнена. Сейчас существуют АГ-классификации для бактерий родов *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Arizona* и др. АГ-схемы используются для сопоставления с набором уже известных серотипов бактерий, выделенных в различных микробиологических учреждениях мира. Антигенные схемы предполагают описание отдельных АГ бактерий в виде формул, характеризующих определенные серотипы. АГ бактерий обозначают цифрами или буквами. Комбинации АГ, обозначенные в виде АГ-формулы, характеризуют биохимически определенный вид серологически. Осуществляется постоянный контроль и дополнение существующих АГ-схем.

Антигенность бактерий – одно из основных свойств. У разных возбудителей она оказывает неодинаковое влияние на возникновение, течение и исход инфекционного заболевания. Изучение АГ-структуры бактерий и продуктов их жизнедеятельности необходимо для создания эффективных слабореактогенных вакцин, для изучения патогенеза заболеваний и совершенствования методов лабораторной диагностики.

Особую группу бактериальных АГ составляют **протективные АГ** [от лат. *protectio*, защита] – термолабильные белки, иммунизация кото-



рыми защищает лабораторных животных от гибели после заражения летальными дозами патогенных микроорганизмов. В настоящее время подобные АГ выделены у возбудителей сибирской язвы, чумы, бруцеллёза, туляремии и коклюша. Нередко протективные АГ используют для изготовления вакцин.

АГ-изменчивость бактерий в настоящее время подвергается серьёзному научному исследованию. В результате внешних воздействий у бактерий могут наблюдаться **АГ-вариации** или **АГ-модуляции** – изменение, частичная или полная потеря АГ. Качественные и количественные изменения АГ у определенных видов могут привести к изменению серотипа. Различают Н-О-вариации (потеря Н-АГ и переход к чистой О-форме), О-вариации (потеря или количественное изменение компонентов этого комплекса), S-R-вариации переход из гладкой в шероховатую форму), V-W-изменение формы (количественное изменение содержания V-АГ). АГ-изменчивость усложняет серологическую диагностику заболеваний. **АГ-модуляции** это исчезновение поверхностных АГ под влиянием АТ. АГ-модуляции – обратимый феномен: при удалении АТ АГ микроорганизмом экспрессируются вновь.

**АГ вирусов.** Заражённые вирусами клетки начинают экспрессировать вирусспецифические АГ. Вирусные АГ могут быть структурными и неструктурными. Первые представлены веществами, кодируемыми нуклеиновыми кислотами, а также клеточными метаболитами (липиды, углеводы), захватываемыми вирионами при почковании. Неструктурные АГ не входят в состав вирионов, а образуются в инфицированных клетках на различных этапах репродукции вирусов. У вирусов выделяют ядерные (сердцевинные), капсидные и суперкапсидные АГ. У пара- и ортомиксовирусов имеются также поверхностные V-АГ – гемагглютинин и нейраминидаза.

### Антитела

**Антитела (АТ)** – это белки, относящиеся к тому или иному классу иммуноглобулинов (Ig), которые вырабатываются клетками лимфоидных органов после стимуляции АГ, поступающими в организм (при естественных инфекциях, вакцинации, действии ксенобиотиков) или образующимися эндогенно. Как правило, АТ специфически взаимодействуют с комплементарным АГ. Однако существуют АТ, взаимодействующие с АГ-детерминантами, общими для различных АГ. Такие АТ известны как **перекрёстно реагирующие**, или **гетероспецифичные**. АТ существуют в миллионах разновидностей и каждая молекула имеет уникальный участок связывания АГ-детерминанты. Практически АТ могут быть получены к любому АГ. В большинстве случаев АТ представ-

лены сывороточными гликопротеинами, мигрирующими в составе медленной фракции  $\gamma$ -глобулинов при электрофорезе белков сыворотки. Поэтому для обозначения сывороточной фракции АТ иногда применяют устаревший термин « **$\gamma$ -глобулины**». В соответствии с международной классификацией, ныне совокупность сывороточных белков, обладающих свойствами АТ, называют **Ig**.

АТ образуют одну из основных фракций белков крови, составляя 20% массы общего белка плазмы. АТ устойчивы к действию слабых кислот и щелочей, а также к нагреванию до 60°C. Существует **5 классов Ig: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD**, различающихся по молекулярной массе, содержанию углеводов, составу полипептидных цепей, коэффициентам седиментации и др. характеристикам.

Структурная единица АТ – **мономер** – молекула цилиндрической формы, состоящая из 2-х идентичных тяжелых (H-heavy) и 2-х идентичных легких (L-light) аминокислотных цепей, соединенных дисульфидными S-S-связями) (рис. 2.).

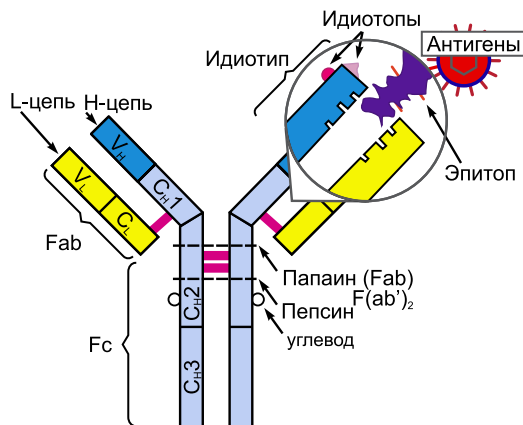


Рис. 2. Строение молекулы IgG

Молекулярная масса легких цепей составляет около 23 кД, и они состоят примерно из 214–220 аминокислотных остатков. Молекулярная масса тяжелых цепей варьирует в пределах 50–73 кД. При обработке папаином молекула Ig распадается на 3 фрагмента. Два из них – одинаковые, состоят из легкой цепи и половины тяжелой цепи и обладают способностью соединяться с АГ. Эти два фрагмента обозначают как  $F(ab)_1$  и  $F(ab)_2$ , т.е. фрагменты, связывающие АГ (от англ. antigen binding). Установлено, что Fab-фрагменты определяют АТ-специфичность Ig. Fab-фрагменты АТ взаимодействуют с антигенными детерминантами

(принцип «ключ-замок»). Связывание АГ с АТ нековалентно и обратимо. Третий фрагмент с мол. массой около 55 кД состоит из двух половин Н-цепей. В связи с постоянством аминокислотного состава, его обозначили как Fc-фрагмент (от англ. constant – постоянный). Fc-фрагмент не обладает способностью связывать АГ, но определяет ряд других важных видов биологической активности, необходимых для полного проявления всех функций АТ. С Fc-фрагментом связана способность АТ проходить через плаценту, усиливать фагоцитоз, нейтрализовать вирусы, связывать комплемент. Fc-фрагмент взаимодействует со своим рецептором в мембране различных типов клеток (макрофаг, нейтрофил, тучная клетка).

В зависимости от структуры Н-цепей выделяют 5 классов (изотипов) АТ: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), отличающихся физическими, функциональными, химическими и антигенными свойствами. Значительную помощь для постановки более обоснованного диагноза оказывает определение не только суммарного титра, но и класса Ig.

**IgM** – пентамер из 5 субъединиц, соединенных дисульфидными связями, имеет 10 АГ-связывающих участков, молекулярная масса 900000 Д (рис. 3), составляет около 10 % антител сыворотки крови.

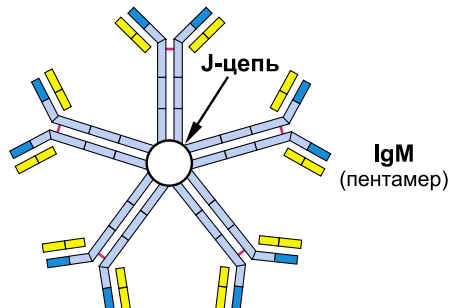


Рис. 3. Строение молекулы IgM

В сыворотке здорового человека могут также циркулировать мономерные и 2-валентные IgM (в высоких титрах их выявляют при макроглобулинемии Вальденстрема). IgM филогенетически наиболее древний Ig, что находит отражение в особенностях этого Ig (прежде всего его относительная неспецифичность). IgM – наиболее ранний класс АТ, обнаруживаемый при первичном попадании АГ в организм, выявление IgM указывает на наличие острого инфекционного процесса. Синтез других классов АТ при первичном контакте с конкретным АГ начинается позднее; несмотря на это, образование IgM к некоторым

АГ (например, жгутиковым АГ бактериям) осуществляется постоянно. IgM – основной класс АТ, синтезируемых у новорожденных и младенцев. Пик их образования приходится на 4–5 сутки с последующим снижением титра. Период полужизни IgM составляет 5,1 дня. Fc-фрагмент IgM может участвовать в классическом пути активации комплемента. Молекулы IgM опсонизируют, агглютинируют, преципитируют и лизируют содержащие АГ структуры. В отличие от прочих Ig синтез IgM мало подвержен действию иммунодепрессантов.

После первичного контакта с АГ синтез IgM обычно сменяется образованием более дифференцированных **IgG** (рис. 4).

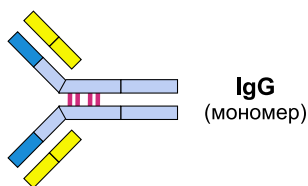


Рис. 4. Строение молекулы IgG

IgG составляет около 75 % антител сыворотки крови. Имеется 4 под-класса – IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4. Мономер, имеет 2 эпитоп-связывающих участка.

Максимальные титры IgG при первичном ответе наблюдают на 6–8 сутки. Обнаружение высоких титров IgG к АГ конкретного возбудителя указывает на то, что организм находится в стадии реконвалесценции или конкретное заболевание перенесено недавно, а также на обострение хронического заболевания. В большом количестве IgG синтезируются при вторичном иммунном ответе. IgG – основной класс АТ, защищающий организм от бактерий, вирусов и токсинов. Период полужизни IgG составляет 7–23 дня в зависимости от подкласса. IgG непосредственно участвуют в реакциях нейтрализации, а также усиливают фагоцитоз, действуя как опсонины и связывая рецепторы Fc-фрагмента в мембране фагоцитирующих клеток, в результате чего фагоциты поглощают и лизируют микроорганизмы. Fc-фрагмент IgG может участвовать в классическом пути активации комплемента. Особенностью IgG является высокая скорость связывания с АГ. Фракция IgG вызывает преципитацию растворимых АГ, а также агглютинацию и даже лизис (в присутствии комплемента) корпускулярных АГ. Только IgG беременной женщины форсируют плацентарный барьер путем опосредованного рецепторами эндоцитоза. Транспорт IgG через плаценту обеспечивает формирование пассивного иммунитета у плода.

**IgA** (мол. масса 170 тыс. Да) (составляют 15–20 % всех Ig) секретируются поверхностью эпителиев, присутствуют в слюне, слезах, молоке, выделяются на поверхность слизистых оболочек, где взаимодействуют с АГ, усиливая защитные свойства слизистых оболочек пищеварительного тракта, дыхательных, половых и мочевыводящих путей (рис. 5).

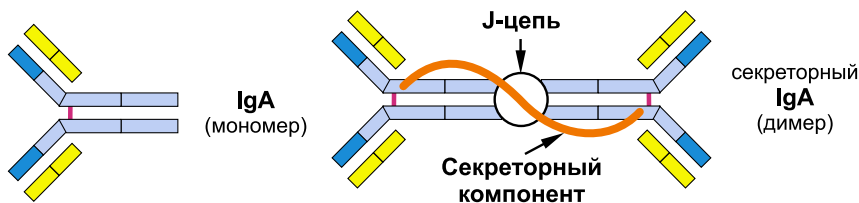


Рис. 5. Строение молекулы IgA

В сыворотке крови IgA циркулирует в виде мономеров, а в секретируемых Ig преобладают 4-валентные димеры, имеющие секреторный компонент, который защищает антитело от разрушения ферментами. Период полужизни IgA составляет 5,8 дня.

**IgE** (мол. масса 180 тыс. Да) составляют 0,002 % АТ сыворотки крови (рис. 6). Мономер, имеет два эпитопсвязывающих участка.

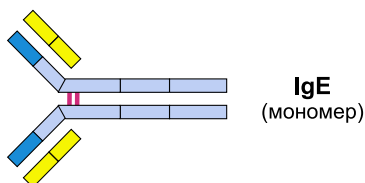


Рис. 6. Строение молекулы IgE

Участвуют в противопаразитарном иммунитете и в ответе на аллергены. Фав-фрагменты молекулы IgE специфически взаимодействуют с АГ, попавшим в организм. Сформированный иммунный комплекс взаимодействует с рецепторами Fc-фрагментов IgE, встроенных в клеточную мембрану базофила или тучной клетки. Это взаимодействие является сигналом для экзоцитоза гистамина, других биологически активных веществ и развертывания острой аллергической реакции. Защитные потенции IgE направлены преимущественно против гельминтов. Синтез IgE увеличивается при паразитарных инвазиях, IgE-моноклональной миеломе. Период полужизни IgE составляет 2,3 дня.

**IgD** – составляют около 0,2 % АТ сыворотки крови (рис. 7). Мономер, имеет два эпитопсвязывающих участка.

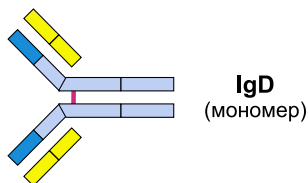


Рис. 7. Строение молекулы IgD

Биологическая роль этих Ig не установлена. IgD обнаружен на поверхности развивающихся В-лимфоцитов, контролируя их активацию и супрессию. Увеличение содержания IgD достигает максимума к 10 годам жизни, некоторое увеличение титров находят у беременных, у больных бронхиальной астмой, системной красной волчанкой и лиц с иммунодефицитами. Период полужизни IgD составляет 2,8 дня.

Важными характеристиками АТ являются: **аффинность** – прочность связывания АТ с АГ, которая зависит от пространственного соответствия реагирующих поверхностей, соотношения концентраций, связанных и свободных АГ и АТ, электростатических, гидрофобных воздействий и сил Ван дер Ваальса. Аффинитет – мера специфичности АТ. **Авидность** – интегральная характеристика силы связи (прочности) между АГ и АТ, учитывающая взаимодействие всех активных центров АТ со всеми эпитопами АГ. Это свойство АТ, определяет степень их сродства к АГ и реакцию формирования комплекса АГ-АТ. Авидность зависит как от аффинности, так и от числа активных центров на молекуле АТ. Авидность возрастает при избытке АГ, т.к. молекула АТ может формировать множественные связи с АГ. **Валентность** – равна числу активных (АГ-связывающих) центров АТ. Ig разных классов бывают 2-валентными (IgG) (такие АТ известны как **полные АТ**), или **поливалентными** (IgM). Это свойство АТ выявляется при взаимодействии их с АГ: связываясь с АГ-детерминантами, IgG и IgM вызывают их видимую агрегацию. Мономерные же молекулы IgA, хотя и имеют два активных центра, не осаждают АГ, т.к. их активные центры настолько сближены, что IgA не может выполнять роль связующего мостика.

Наряду с двухвалентными, в организме существуют также **неполные АТ**. Такие АТ называют еще моновалентными или блокирующими. Эти Ig отличаются наличием на молекуле 1-го активного специфического участка. Соединяясь с АГ, они не могут агрегировать частицы в крупные конгломераты, а лишь блокируют их. Это не значит, что второй активный центр молекулы отсутствует, он просто экранирован различными структурами, либо обладает низкой авидностью. Для выявления неполных АТ существуют специальные реакции – проба Кумбса, блокирующая проба и др.

**«Нормальные» АТ** (синоним – **природные АТ**) – АТ, появление которых не связано с иммунизацией или инфекцией. Таких АТ два рода: 1-е направлены против определенных изоантигенов. 2-е направлены против антигенов, не относящихся к изоантигенам. Например, в сыворотке крови в небольших титрах обнаруживаются АТ против бактерий кишечной группы, многих кокков, некоторых чужеродных клеток. В крови человека и животных обнаруживают АТ, которые могут реагировать с различными АГ (эритроцитами, бактериями и т.д.), несмотря на то, что организм не подвергался иммунизации этими АГ. Не исключено, что часть нормальных АТ является обычными иммунными АТ, выработанными на инфекционный агент, проникший в небольшой дозе и вызвавший латентное заболевание. Возникновение нормальных АТ может быть обусловлено попаданием АГ с пищей.

Важной характеристикой АТ является **специфичность**. Специфичность АТ определяется по их способности отличать АГ, против которого они были получены (гомологичный АГ), от любого другого АГ. Иммунологический перекрест – это способность АТ взаимодействовать со сходными АГ, отличными от гомологичного. В большинстве случаев перекрестно реагирующие АТ имеют к данным АГ более низкую аффинность, чем к гомологичному. Однако могут быть исключения. Это явление называется гетероклитичностью, а АТ, обладающие большим аффинитетом к гетерологичному АГ, называются гетероклитичными. В последнее время предлагается концепция **полиспецифичности**, заключающаяся в том, что каждое АТ в действительности может с высокой аффинностью связываться с множеством совершенно разных АГ. **Перекрестно-реагирующие** или **гетероспецифичные Ig** – это АТ, взаимодействующие с АГ-детерминантами, общими для различных АГ.

Взаимодействие АТ с АГ носит специфический характер. Продуктами этой реакции являются иммунные агрегаты (комплексы АГ=АТ), которые могут образовывать преципитат в случае растворимого АГ, или агглютинат – в случае корпускулярного АГ.

Реакции АГ=АТ *in vitro* имеют большое диагностическое значение, т.к. благодаря своей специфичности они позволяют количественно и качественно обнаруживать АГ или АТ. Существующие серологические и иммунохимические методы дают возможность определять любые антигены, используя моноспецифические сыворотки. **Специфичность** – способность АГ или АТ реагировать только с гомологичным АТ или АГ, соответственно. Чем выше специфичность, тем меньше регистрируется ложноположительных и ложноотрицательных результатов. **Чувствительность** – возможность определения минимальных количеств АГ или АТ.

В серологических реакциях участвуют АТ, принадлежащие, главным образом, к Ig классов G и M.

### Взаимодействие антитела с антигеном

Реакция взаимодействия АТ с АГ имеет несколько типичных физико-химических характеристик.

1. **Потребность в электролитах.** Взаимодействие АТ с АГ происходит только в среде электролитов. Оптимальная концентрация электролитов соответствует 0,85%-му раствору NaCl, pH = 6,4–8,6, ионная сила раствора 0,05–0,1.

2. **Скорость соединения.** Соединение специфических участков АГ и АТ происходит в первые же секунды или минуты реакции – фаза взаимодействия. Визуально наблюдаемый эффект – фаза проявления (агглютинация, преципитация, лизис) может развиваться через несколько часов (2–18–24 ч).

3. **Обратимость.** Комплекс АТ-АГ может диссоциировать с высвобождением (элюцией) АТ. Элюцией пользуются для получения высокоспецифических АТ против конкретного АГ или АГ-детерминанты. Она происходит при увеличении pH среды до 9–10 или понижении pH до 5–3, при повышении концентрации NaCl до 15 % и более, а также температуры до 60 °С.

4. **Экзотермичность.** При взаимодействии АГ и АТ выделяется небольшое количество тепла.

АТ обычно разделяют в соответствии с типом их реакций с АГ:

- **антитоксические** АТ к токсинам и анатоксинам нейтрализуют или флокулируют АГ.
- **агглютинирующие** АТ агрегируют АГ. Их выявляют в реакциях с корпускулярными АГ и растворимыми АГ, сорбированными на поверхности видимых корпускулярных частиц (эритроциты, латекс).
- **преципитирующие** АТ образуют комплекс АГ-АТ с растворимыми АГ только в растворах или гелях.
- **лизирующие** АТ вызывают разрушение клеток-мишеней (обычно взаимодействуя с комплементом).
- **опсонизирующие** АТ взаимодействуют с поверхностными структурами клеток микробов или заражённых клеток организма, способствуя поглощению их фагоцитами.
- **нейтрализующие** АТ инактивируют АГ (токсины, микроорганизмы), лишая их возможности проявлять патогенное действие.

АТ, взаимодействуя в организме с различными АГ, предотвращают инфицирование или элиминируют возбудитель, либо блокируют развитие патологических реакций, активируя при этом все системы специфической защиты.



Реакции специфического взаимодействия АТ с АГ проявляются в виде нескольких основных феноменов: **Феномен агглютинации** – корпускулярные АГ-частицы (бактерии, эритроциты и т.д.) под влиянием АТ склеиваются между собой и оседают на дно пробирки в виде хлопьев или зерен. Склеивание микроорганизмов или эритроцитов друг с другом – проявление реакции прямой агглютинации – т.е. АТ действуют непосредственно на корпускулярные АГ-частицы (реакция агглютинации [РА] на стекле, объемная РА). Механизм РА соответствует теории «решетки», согласно которой агглютинат образуется при соединении одного активного центра АТ с детерминантной группой одного АГ, второго активного центра – с детерминантной группой другого АГ и т.д. Избыток или недостаток АТ или АГ задерживают агглютинацию. **Феномен преципитации** – эффект укрупнения растворимых АГ-субстанций под влиянием АТ с появлением помутнения прозрачных растворов (явление агрегации растворенных частиц). Нерастворимый комплекс АГ=АТ выпадает только в определенном диапазоне эквивалентных концентраций реагирующих молекул. В случае избытка АТ или АГ преципитация не развивается. Это не значит, однако, что взаимодействия не произошло, просто образовался растворимый комплекс АГ=АТ. **Феномен лизиса** – способность некоторых АТ растворять клетки, против которых они возникли. Эти АТ применительно к бактериям называются бактериолизинами, к эритроцитам – гемолизинами. Реакции иммунного лизиса характеризуются тем, что они не происходят при наличии только двух ингредиентов: АТ и АГ. Необходимо присутствие третьего компонента – комплемента. Вначале реакция идет по типу агглютинации, затем к комплексу АГ=АТ присоединяется комплемент и происходит локальное растворение оболочки бактерий, эритроцитов или др. клеток. **Феномен цитотоксичности** – АТ проявляют токсический эффект, лишая клетки жизнеспособности. Реакцию по выявлению цитотоксинов ставят с взвесью микробных клеток в солевом буферном растворе. Если к взвеси микробных клеток добавить иммунную сыворотку, содержащую цитотоксины + комплемент + краситель (эозин, трипановый синий), то клетки будут гибнуть и при пробе с красителем – окрасятся. Живые клетки не красятся. Процент погибших клеток свидетельствует о количестве цитотоксинов в сыворотке. **Феномен специфической задержки** часто используется для сравнения двух изучаемых АГ. Например, готовят иммунную сыворотку против эритроцитов мыши. Чтобы определить содержится ли там АТ против эритроцитов родственного вида животных (крысы), сыворотку обрабатывают эритроцитами крысы. Если уровень АТ в сыворотке снизился, то имеются родственные АГ, если совсем падает, то АГ идентичны. **Феномен**

**опсонизации** (иммунный фагоцитоз) – АТ (через Fab-фрагменты) связываются с клеточной стенкой микроорганизма, Fc-фрагментом АТ взаимодействует с соответствующим рецептором фагоцита. Это опосредует последующее эффективное поглощение фагоцитом образовавшегося комплекса, т.е. АТ усиливают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов в отношении тех АГ-субстанций или микроорганизмов, против которых они получены. **Активация комплемента** – АТ (IgM и IgG) после связывания с АГ (микроорганизм, опухолевая клетка и др.) активируют систему комплемента, что приводит к уничтожению этой клетки путём перфорации её клеточной стенки, усиления хемотаксиса и иммунного фагоцитоза. **Антителозависимая цитотоксичность.** Опсонизируя АГ, АТ стимулируют их разрушение цитотоксическими клетками. Аппарат, обеспечивающий распознавание мишеней, – рецепторы к Fc-фрагментам АТ. Разрушать опсонизированные мишени способны макрофаги и гранулоциты (например, нейтрофилы).

До тех пор, пока не была выяснена химическая природа АТ, полагали, что каждая реакция иммунной сыворотки опосредуется особым видом АТ, которые получили соответственно название агглютининов, преципитинов, опсопинов, антитоксинов и т.п. Хотя эти названия сохранились, они имеют чисто феноменологическое значение, т.е. отражают конечный результат взаимодействия АТ с АГ. В настоящее время уже ясно, что нет специальных АТ – агглютининов, преципитинов и т.д., а есть 5 классов иммуноглобулинов. Специфичность АТ, относящихся к любому классу иммуноглобулинов, определяется структурой активного центра, причем АТ данной специфичности могут относиться к разным классам. Конечный исход взаимодействия АГ с АТ зависит от природы АГ (корпускулярный – агглютинация, растворимый – преципитация); от участия системы комплемента (бактериолиз, бактерицидное действие); от того, к какому, классу иммуноглобулинов относится данное АТ; от свойств его Fc-фрагмента. Разные классы иммуноглобулинов в неодинаковой степени участвуют в различных иммунологических реакциях. Высокая нейтрализующая активность АТ, принадлежащих к IgG, свидетельствует о важной роли их в антитоксическом иммунитете. IgM особенно активны в реакциях фагоцитоза с корпускулярными АГ и поэтому играют существенную роль в антимикробном иммунитете. В реакции нейтрализации вирусов особенно активны IgA, следовательно, им принадлежит значительная роль в противовирусном иммунитете. Кроме того, секреторные IgA обуславливают местный иммунитет слизистых оболочек. Наконец, IgE опосредуют реакции гиперчувствительности немедленного типа.

На скорость образования АТ влияет ряд факторов: доза АГ (сила АГ-воздействия), частота АГ-стимуляции и состояние иммунной системы

индивида. Если организм впервые встречается с АГ, то развивается первичный иммунный ответ, а при повторном контакте – вторичный ответ (рис. 8).

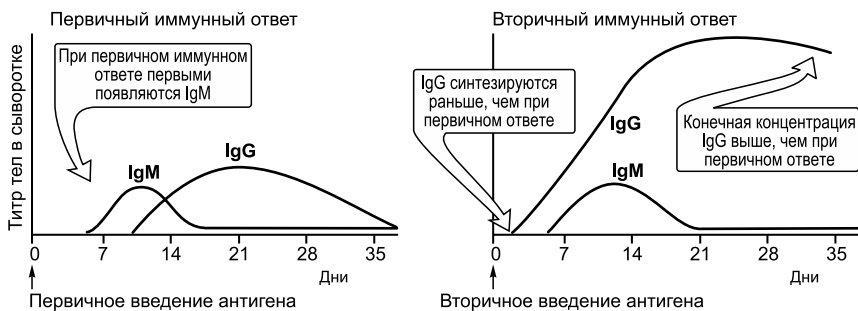


Рис. 8. Антителообразование при первичном и вторичном иммунном ответе

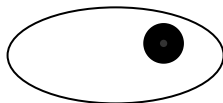
**Первичный ответ.** Появлению АТ предшествует *латентный период* продолжительностью 3–5 сут. В это время происходит распознавание АГ и образование клонов плазматических клеток. Затем наступает *логарифмическая фаза*, соответствующая поступлению АТ в кровь; её продолжительность 7–15 сут. Постепенно титры АТ достигают пика и наступает *стационарная фаза* продолжительностью 15–30 сут. Её сменяет *фаза снижения* титров АТ, длящаяся 1–6 мес. В основу пролиферации клеток-продуцентов АТ заложен принцип селекции. В динамике антителообразования титры высокоаффинных АТ постепенно нарастают: после иммунизации аффинность АТ к АГ постоянно увеличивается. Первоначально образуются IgM, но постепенно их образование уменьшается и начинает преобладать синтез IgG. Так как переключение синтезов от IgM к IgG не меняет идиотипа АТ (то есть его специфичности по отношению к конкретному АГ), то оно не связано с клональной селекцией. Особенности первичного ответа – низкая скорость антителообразования и появление сравнительно невысоких титров АТ.

**Вторичный ответ.** После антигенной стимуляции часть В- и Т-лимфоцитов циркулирует в виде клеток памяти. Особенности вторичного иммунного ответа – высокая скорость антителообразования, появление максимальных титров АТ и длительное (иногда многолетнее) их циркулирование. Основные характеристики вторичного ответа: образование АТ индуцируется значительно меньшими дозами АГ; индуктивная фаза сокращается до 5–6 ч; среди АТ доминируют IgG с большой аффинностью, пик их образования наступает раньше (3–5 сут); АТ образуются в более высоких титрах и циркулируют в организме длительное время.

Благодаря своей способности специфически взаимодействовать с бактериальными клетками и продуктами их жизнедеятельности, в том числе с токсинами и ферментами, АТ играют важную роль в формировании приобретенного постинфекционного, поствакцинального и пассивного иммунитета. Эта их роль заключается в том, что, связываясь с токсинами, они нейтрализуют их действие и обеспечивают формирование антитоксического иммунитета. Связываясь с вирусами, особенно блокируя рецепторы, с помощью которых вирусы адсорбируются на клетках, АТ создают иммунитет против вирусов. Образование комплекса АТ=АГ запускает классический путь активации системы комплемента со всеми его эффекторными последствиями (лизис бактерий, опсонизация, формирование очага воспаления, стимуляция системы макрофагов). АТ, взаимодействуя с бактериями, опсонизируют их, т.е. делают их фагоцитоз более эффективным. В результате взаимодействия АТ с растворимыми АГ, выделяющимися в кровь, образуются так называемые растворимые иммунные комплексы, с помощью которых АГ выводятся из организма, в основном желчью и мочой.

### Синтез антител

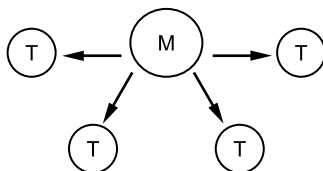
**Синтез АТ** – чрезвычайно сложный, многоэтапный и многозвеньевой процесс, в котором принимают участие клетки различных систем. Экспериментально установлено, что реакция кроветворной ткани на введение АГ осуществляется кооперативными взаимоотношениями клеток по крайней мере трех систем: макрофаг – лимфоцит – АГ-реагирующие и АТ-образующие клетки. АТ образуются в плазматических клетках. **Плазматические клетки** – крупные, имеющие овальную форму с немного сдвинутым к периферии ядром.



В этих клетках большую площадь занимают цитоплазма с многочисленными включениями (рибосомами, полирибосомами и т.д.), которая и является производственным участком, в котором происходит синтез специфических АТ. Плазматические клетки появляются после иммунизации в регионарных лимфоузлах и селезенке. Одним из важнейших признаков высокой степени дифференцировки плазматических клеток является то, что они продуцируют АТ только против одной детерминантной группы АГ. Попадая в организм, микробы фагоцитируются макрофагами и разрушаются, но 10–20 % фагоцитированных микроорганизмов могут

находится в макрофаге длительное время. За это время организм получает информацию об этом АГ, т.е. образуется очаг воспаления, в котором можно наблюдать макрофаги со скопившимися вокруг них лимфоцитами.

Между макрофагом и лимфоцитом образуются тонкие цитоплазматические мостики. Информация об АГ переходит через эти мостики к лимфоцитам. Активированные макрофаги окружены только Т-лимфоцитами.



После контакта с макрофагом Т-лимфоцит выделяет медиаторы, под влиянием которых В-лимфоциты начинают трансформироваться в плазматические клетки. Связь макрофага с Т- и В-лимфоцитами называется **клеточной кооперацией**. В организме лимфоциты постоянно рециркулируют между зонами скопления лимфоидной ткани. Распределение лимфоцитов в лимфоидных органах (лимфоузлах, селезенке, тимусе и т.д.) и их миграция по кровеносному и лимфатическому руслу строго упорядочены и отражают функцию отдельных клеток. Лимфоциты имеют одинаковую морфологию при световой микроскопии, но их ультраструктура, функции, поверхностно-клеточные маркеры, индивидуальное (клональное) развитие и судьба различны. Все лимфоциты происходят из единой костномозговой стволовой клетки, но различные популяции лимфоцитов и др. клеток крови развиваются под влиянием разных дифференцирующих сигналов. По наличию поверхностных маркеров лимфоциты разделяют на функционально различные популяции и субпопуляции. **Т-лимфоциты** проходят первичную дифференцировку в тимусе (вилочковой железе), **В-лимфоциты** – в лимфоидной ткани кишечника, являющейся аналогом сумки (бурсы) Фабрициуса у птиц. Т-лимфоциты располагаются в белой пульпе селезенки и во внутреннем кортикальном слое лимфоузла, они составляют 80 % всех лимфоцитов. Только Т-клетки распознают АГ, предварительно переработанные и представленные на поверхности АГ-представляющих клеток. Они ответственны за реализацию клеточных иммунологических реакций, а также помогают В-лимфоцитам реагировать на АГ при реализации гуморальных иммунных реакций. Т-лимфоциты осуществляют две основные функции – регуляторную и эффекторную. Регуляторные клетки обеспечивают развитие иммунного ответа другими клетками, регулируют его дальнейшее течение. Эффекторные Т-лимфоциты осуществляют эффект иммунологической

реакции чаще всего в форме цитолиза клеточных структур, к антигенам которых возникла иммунная реакция. Т-лимфоциты – основные иммунокомпетентные клетки и хранители иммунологической памяти. Это долгоживущие клетки, могут жить 10–30 лет. По функциональным свойствам Т-лимфоциты делятся на: **Т-хелперы** (помощники) относятся к основным клеткам иммунной системы, обеспечивающим усиленный синтез специфических АТ. Без их помощи не может реализоваться большинство функций В-лимфоцитов. **Т-киллеры** (обладают способностью убивать клетки-мишени, чужеродные для организма) – основные клетки, оказывающие цитотоксическое действие, вследствие чего играют важную роль в противовирусном, противоопухолевом и трансплантационном иммунитете. **Т-супрессоры** – Т-лимфоциты, подавляющие иммунный ответ (при гипериммунизации выработка АТ происходит до какого-то определенного уровня, затем подается сигнал Т-супрессорам и начинается подавление иммунной реакции). Т-супрессоры регулируют также реакции гиперчувствительности замедленного типа. Для активации Т-клеток необходимо 2 сигнала от макрофагов: 1-й – представление АГ, 2-й – синтез и секреция ИЛ-1. Последний стимулирует синтез ИЛ-2, в сочетании с другими интерлейкинами поддерживающего активацию Т-клеток. Т. о., Т-лимфоцит является эффектором гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ); принимает участие в трансплантационном иммунитете и во всех реакциях клеточного типа; носитель иммунологической памяти. **В-лимфоциты** составляют вторую основную популяцию лимфоцитов, обеспечивают гуморальный иммунитет. Существует несколько подтипов В-клеток. Все они под действием АГ-стимуляции дифференцируются в плазматические клетки, синтезирующие АТ. В-лимфоцит происходит от стволовой кроветворной клетки, проходит созревание в костном мозге, где на поверхности В-лимфоцита формируются иммуноглобулиновые рецепторы для АГ. На каждом В-лимфоците формируются рецепторы только для одного АГ. Созревший В-лимфоцит покидает костный мозг и способен взаимодействовать с одним из многочисленных АГ, существующих в природе. В отличие от Т-лимфоцита, который может взаимодействовать с АГ только после его представления АГ-презентирующей клеткой, В-лимфоцит вступает в контакт с АГ напрямую, без посредников. В-лимфоциты синтезируют Ig всех классов: М, G, А, D, Е.

### Иммуносерологические методы исследования

Взаимодействие АГ с АТ проявляется в форме различных серологических (от лат. *serum* – сыворотка) реакций. В связи с их высокой чувствительностью и специфичностью они нашли широкое диагностическое применение. Серологические реакции активно используют

при проведении полного объёма диагностических исследований. Они применяются с одинаковым успехом для двух целей. Во-первых, по известному антигену (диагностикуму) определяют в исследуемой сыворотке наличие и количественное содержание специфических к данному АГ антител. Последнее устанавливают путем титрования сыворотки. **Титром иммунной сыворотки** считают то ее максимальное разведение, которое еще дает положительную реакцию. Увеличение титров АГ – частую единственный дифференциально-диагностический признак, указывающий на инфекционное заболевание. Выявление АТ особенно актуально при неудачных попытках выделить возбудителя инфекции. Во-вторых, с помощью известного антитела, т.е. диагностической иммунной сыворотки, определяют наличие в исследуемом материале специфического АГ или осуществляют серологическую идентификацию выделенного возбудителя.

С диагностической целью используют следующие серологические реакции: реакция агглютинации в ее различных вариантах, реакция преципитации и ее различные модификации, реакции иммунофлуоресценции в прямом и непрямом вариантах, реакции с участием комплемента, реакции с участием фагоцитов, реакции иммуносорбентного анализа на твердой фазе, реакции нейтрализации биологической активности возбудителя или токсинов.

### Реакция агглютинации

Реакция агглютинации (РА) [от лат. *agglutinatio*, склеивание] – склеивание антигеннесущих корпускулярных частиц (микроорганизмы, клетки различного происхождения, частицы латекса и др.) молекулами специфических АТ в присутствии электролитов, которое заканчивается образованием видимых невооруженным глазом хлопьев или осадка (агглютината). Характер осадка зависит от природы АГ: жгутиковые бактерии дают крупнохлопьевидный осадок, безжгутиковые и бескапсульные – мелкозернистый, капсульные – тяжистый. Различают агглютинацию прямую, при которой во взаимодействии со специфическими АТ непосредственно участвуют собственные АГ бактериальной или любой другой клетки; и непрямую, или пассивную, при которой бактериальные клетки, или эритроциты, или частицы латекса являются носителями не собственных, а сорбированных на них чужих АГ (или АТ) для выявления специфических к ним АТ (или АГ). В реакции агглютинации участвуют главным образом антитела, относящиеся к классам IgG и IgM. Она протекает в две фазы: вначале происходит специфическое взаимодействие активного центра АТ с детерминантой АГ, эта стадия может происходить в отсутствие электролитов и не сопровождается

видимыми изменениями реагирующей системы. Для второй стадии – образования агглютината – необходимо наличие электролитов, которые снижают электрический заряд комплексов АГ + АТ и ускоряют процесс их склеивания. Эта фаза заканчивается образованием агглютината.

РА ставят либо на стеклянных, либо на гладких пластиковых пластинках, либо в стерильных агглютинационных пробирках (рис. 9).

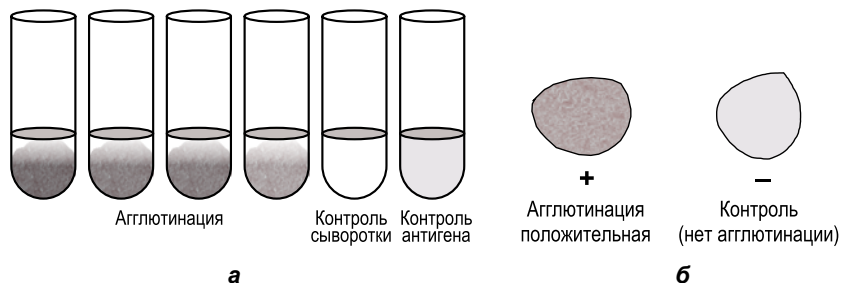


Рис. 9. Развернутая (а) и ориентировочная (б) реакции агглютинации

Реакции агглютинации (прямые и пассивные) на стекле обычно применяют в качестве ускоренного метода обнаружения специфических АТ в сыворотке больного или для серологической идентификации возбудителя. В последнем случае обычно используют хорошо очищенные (адсорбированные) диагностические сыворотки, содержащие только монорецепторные АТ или их набор к различным антигенам. Несомненным достоинством РА на стекле является простота ее постановки и то, что она протекает несколько минут или даже секунд, так как оба компонента в ней используются в концентрированном виде. Однако она имеет лишь качественное значение и менее чувствительна, чем пробирочная. Разновидности РА для выявления АТ – **кровяно-капельная проба на туляремию** (с нанесением диагностикума на каплю крови и появлением видимых белёсых агглютинатов) и **реакция Хеддльсона на бруцеллёз** (с нанесением на каплю сыворотки крови диагностикума, окрашенного генциановым фиолетовым).

Развернутая РА в пробирках дает более точные результаты, ибо она позволяет определить количественное содержание АТ в сыворотке (установить ее титр) и при необходимости зарегистрировать факт нарастания титра антител, что имеет диагностическое значение. Необходимо учесть, что при смешивании растворов гомологичных АГ и АТ не всегда наблюдаются видимые проявления РА. Осадок образуется только при некоторых оптимальных соотношениях обоих компонентов реакции. Вне этих пределов, при значительном избытке АГ или АТ, реакции не наблюдается. Это явление получило название «феномена



прозоны». Появление прозоны в иммунных реакциях объясняется тем, что участвующие в них АГ, как правило, являются полидетерминантными, а молекулы IgG имеют два активных центра. При избытке АТ поверхность каждой частицы АГ покрывается молекулами АТ так, что не остается свободных детерминантных групп, поэтому второй, несвязанный активный центр антител не может взаимодействовать с другой антигенной частицей и связывать их друг с другом. Образование видимого агглютината или преципитата подавляется также при избытке АГ, когда не остается ни одного свободного активного центра АТ, и поэтому комплексы АГ + АТ + АГ не могут более укрупняться.

**Реакции прямой гемагглютинации.** Простейшая из подобных реакций - агглютинация эритроцитов или гемагглютинация, применяемая, в частности, для определения групп крови в системе АВ0. Для определения агглютинации (или её отсутствия) используют стандартные антисыворотки с анти-А и анти-В-агглютинидами. Реакция называется прямой, так как исследуемые АГ - естественные компоненты эритроцитов. Общие с прямой гемагглютинацией механизмы имеет **вирусная гемагглютинация** (рис. 10).

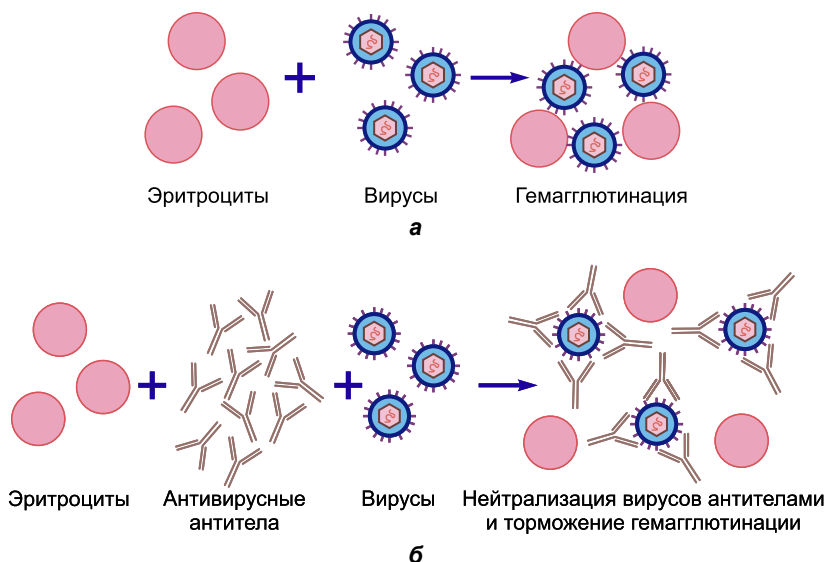


Рис. 10. Реакции вирусной гемагглютинации (а) и торможения гемагглютинации (б)

Многие вирусы способны спонтанно агглютинировать эритроциты птиц и млекопитающих, их добавление к суспензии эритроцитов вызывает образование агрегатов.

## Варианты реакций агглютинации

### Реакция пассивной гемагглютинации и ее варианты

Классическая реакция агглютинации предусматривает использование корпускулярных АГ. Однако в ней могут участвовать и растворимые АГ. Чтобы это стало возможным, такие АГ адсорбируют на иммунологически инертных частицах. В качестве носителя можно использовать частицы латекса или бентонита, однако в настоящее время наиболее часто применяют эритроциты животных или человека, улучшая их адсорбирующие свойства обработкой растворами танина, формалина или бензидаина. Эритроциты, адсорбировавшие на себе АГ (АТ), называются сенсibilизированными данным АГ (АТ), а иммунная реакция, в которой они участвуют, – **реакцией непрямой**, или **пассивной гемагглютинации** (РНГА или РПГА), так как эритроциты участвуют в ней пассивно (рис. 11).

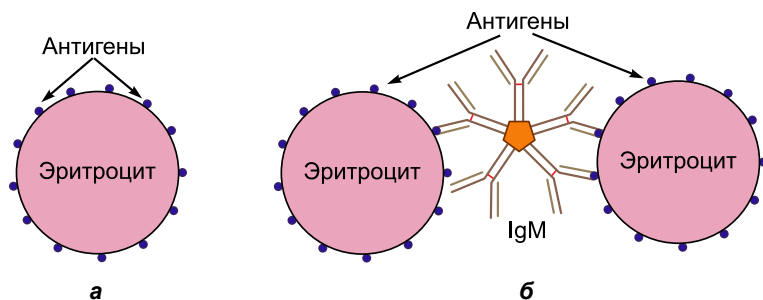


Рис. 11. **а** – антигенный эритроцитарный диагностикум; **б** – реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации

РПГА ставят в специальных полистироловых пластинках с луночками, имеющими полусферическое дно. В этих луночках готовят двукратные разведения в физиологическом растворе (ФР) исследуемой сыворотки, и затем добавляют к ней в качестве диагностикума взвесь сенсibilизированных эритроцитов. Учет результатов проводят через 2 часа инкубации при 37 °С по четырехкrestной системе. При положительной реакции агглютинировавшие эритроциты оседают на дно луночки и равномерно покрывают его в виде перевернутого зонтика. При отрицательной реакции эритроциты тоже оседают, жидкость становится прозрачной, осадок выглядит как маленький диск в центре луночки. Титром сыворотки в РПГА считается последнее ее разведение, которое еще дает ярко выраженную гемагглютинацию без значительных признаков наличия диска (рис.12).

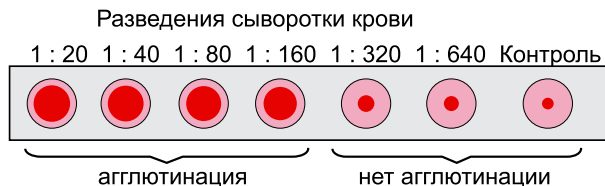


Рис. 12. Постановка и учет РПГА

Вариантами использования РПГА являются: реакция нейтрализации антигена (РНАг), реакция нейтрализации антител (РНАт), реакция торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА). Для этих реакций используют антигенные и антительные эритроцитарные диагностикумы.

**Реакция торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА)** контролирует специфичность РПГА. Включает три компонента: АГ (АТ), АТ (АГ) и АТ (АГ), адсорбированные на эритроцитах. Первоначально АГ (АТ) реагирует с определенным количеством АТ (стандартная антисыворотка) (АГ), затем в смесь вносят эритроциты, сенсibilизированные АТ (АГ). За счет уменьшения количества АГ (АТ) в исследуемом материале после связывания с АТ стандартной сыворотки (АГ), отмечается разница в титрах РПГА и РТПГА (торможение агглютинации). Учет результатов реакции аналогичен учету в РПГА.

**Реакция нейтрализации антител (РНАт)** – суспензию, содержащую искомым АГ, смешивают со специфической иммунной сывороткой, содержащей известные АТ в соответствующих объемах, и инкубируют при 37 °С. После этого добавляют антигенный эритроцитарный диагностикум. Смесь встряхивают и оставляют при комнатной температуре. Результаты учитывают через 3–4 ч и окончательно – через 18–24 ч. Если в исследуемом материале имеется АГ, он свяжет добавленные специфические АТ (нейтрализует их); и поэтому гемагглютинации не произойдет. При положительной реакции на дне луночки формируется диск, при отрицательной – «зонтик».

По такому же принципу ставят **реакцию нейтрализации антигена (РНАг)**. Только в этом случае в исследуемом материале обнаруживают АТ. Специфический АГ, добавленный к такому исследуемому материалу, будет связываться с антителами, содержащимися в нем, т. е. произойдет нейтрализация антигена антителами, и поэтому гемагглютинации при добавлении антительного эритроцитарного диагностикума не произойдет. Учет результатов реакции аналогичен учету в РНАт.

**Реакция коагглютинации.** Является одним из вариантов пассивной реакции агглютинации на стекле. В основу этой реакции положено уникальное свойство золотистого стафилококка, имеющего в составе

своей клеточной стенке белок А, связываться с Fc-фрагментами IgG и IgM (рис. 13).

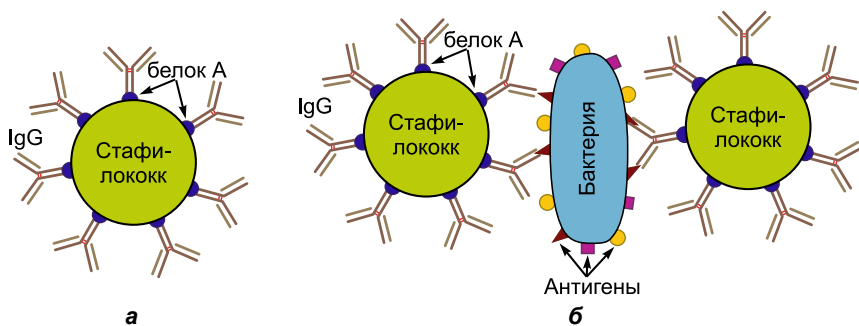


Рис. 13. а – антительный диагностикум; б – реакция коаггуляции

При этом активные центры АТ остаются свободными и могут взаимодействовать со специфическими детерминантами АГ. На предметное стекло наносят каплю 2%-ной взвеси стафилококков, сенсibiliзированных соответствующими АТ, и добавляют каплю взвеси исследуемых бактерий. При соответствии антигена антителам через 30–60 сек происходит четкая агглютинация нагруженных антителами стафилококков.

**Реакция агглютинации латекса (РАЛ).** Носителем иммунных реагентов в этой диагностической системе являются мелкие стандартные частицы латекса. У нас в стране используют полистироловые монодисперсные латексы с разным диаметром частиц (0,3; 0,66; 0,75; 0,8 мкм). РАЛ выполняют на стекле. Основным условием успешной постановки реакции является строгое соблюдение количественных соотношений компонентов системы. Специфичность контролируют с помощью 3-х контрольных тестов: заведомо + реакция, заведомо – и контроль качества латексной суспензии по взаимодействию несенсибилизированного латекса с исследуемым материалом. РАЛ можно использовать как для экспресс-детекции микроорганизмов или их АГ в исследуемом материале, так и выявления АТ в сыворотках.

**Иммуномагнитное обнаружение антигенов.** Один из вариантов ускоренной реакции агглютинации на стекле связан с применением супермагнитных полимерных частиц, покрытых специфическими АТ. Одна такая частица связывает до  $10^7$ – $10^8$  клеток микроорганизмов, благодаря чему чувствительность данного метода достигает 5 КОЕ/мл.

**Реакция агрегат-гемагглютинации (РАГА).** Позволяет быстро обнаружить в крови больных как свободно циркулирующие АГ (антиге-

немия), так и циркулирующие иммунные комплексы (АТ+АГ). Для РАГА используют эритроциты, сенсibilизированные соответствующими АТ. Добавление сыворотки крови больного, в которой содержатся АГ, к сенсibilизированным эритроцитам, на которых фиксированы АТ, приводит к склеиванию (агглютинации) эритроцитов и иммунных комплексов.

**Антиглобулиновая проба Кумбса** (реакция Кумбса). При помощи реакций прямой и пассивной агглютинации определяют полные (двухвалентные) АТ. Неполные (моновалентные, блокирующие) АТ не выявляются в этих реакциях, так как, соединяясь с АГ, блокируют его, но не могут вызвать агрегации АГ в крупные конгломераты. Неполными (блокирующими) называют антитела, у которых функционирует только один активный центр; второй активный центр по неизвестной причине не срабатывает. Для выявления неполных АТ применяют специальную реакцию Кумбса, в которой используются сыворотка больного, корпускулярный антиген-диагностикум, антиглобулиновая сыворотка, содержащая АТ к используемому (человеческому) глобулину. Реакция протекает в два этапа: 1. Взаимодействие АГ с неполными АТ. Видимых проявлений при этом нет. Первый этап заканчивают отмыжкой АГ от остатков сыворотки больного. 2. Взаимодействие антиглобулиновой сыворотки с неполными АТ, адсорбированными на АГ. В силу того, что антиглобулиновые АТ двухвалентны, они связывают два одновалентных АТ отдельных комплексов АГ + неполное АТ, что приводит к их склеиванию и появлению видимого осадка (схема).

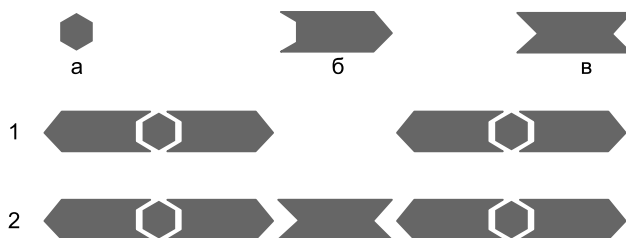


Схема реакции Кумбса для выявления неполных (моновалентных) АТ.  
а – антиген; б – неполное антитело; в – антитело против моновалентного антитела (антиглобулин); 1 – соединение неполных АТ с АГ (агглютинации не происходит); 2 – добавление антиглобулиновой сыворотки приводит к агглютинации АГ, блокированных неполными АТ.

Р. Кумбса применяют, например, при серологической диагностике бруцеллеза, при анализе групп крови, в диагностике аутоиммунных заболеваний и др.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Иммуносерологические методы исследования

В соответствии с решаемыми задачами иммуносерологические методы исследования применяются для серологической диагностики инфекционных болезней, идентификации неизвестной культуры микроорганизмов, выделенной от больных или из объектов внешней среды, выявления АГ в различных биологических образцах и др.

При серодиагностике инфекционных заболеваний с целью обнаружения специфических АТ исследуют сыворотку больного. Для получения сыворотки кровь у больного берут из вены при соблюдении правил асептики в количестве 3–10 мл в стерильную пробирку с этикеткой, на которой указаны фамилия больного, дата, предполагаемый диагноз и направляют в лабораторию. Кровь оставляют на 1 ч при комнатной температуре или помещают в термостат при 37 °С на 30 мин. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок пробирки пастеровской пипеткой или бактериологической петлей, пробирку помещают в холодильник для лучшего отделения сыворотки, которую затем отсасывают пипеткой, снабженной резиновым баллоном. При наличии форменных элементов крови сыворотку центрифугируют (500×g, 10 мин). Для удобства хранения и транспортировки кровь можно наносить на фильтровальную бумагу около 2 см диаметром, высушивать на воздухе и направлять в лабораторию. Перед исследованием пропитанную кровью бумагу мелко нарезают, помещают в пробирку и заливают 1 мл физиологического раствора. Пробирку ставят на 1–2 ч в термостат или оставляют на 5–6 ч при комнатной температуре для экстракции АТ. При необходимости длительного хранения сыворотку можно также консервировать (добавлением борной кислоты, мертиолата натрия, азида натрия, хинозола и т. д.), заморозить и хранить при низкой температуре (–20–70 °С) или лиофилизировать.

Для постановки серологических реакций в исследуемую сыворотку добавляют мертиолат натрия 1 : 10000, разводят ФР 1 : 10 и прогревают на водяной бане при 56 °С в течение 30 мин для инактивации комплемента и стабилизации иммуноглобулинов. Допускается инактивация сывороток при 60 °С в течение 5 мин.

В качестве АГ при исследовании сывороток используют стандартные диагностикумы в виде взвеси микробов или их водных или спиртовых экстрактов. Стандартные диагностикумы различных видов микроорганизмов выпускаются предприятиями-изготовителями в ампулах с этикетками и инструкциями по их применению. В не-

которых случаях в качестве АГ используют живую культуру микроорганизмов.

При идентификации исследуемой бактериальной культуры, определении ее серовара, изучении АГ, используют специфические диагностические сыворотки, полученные в производственных или экспериментальных условиях путем гипериммунизации животных (чаще кроликов или лошадей) соответствующим АГ. В качестве АГ для иммунизации применяют взвесь живых или убитых микробов, лизаты и экстракты клеток и тканей, растворимые АГ, эритроциты и т. д. У иммунных сывороток определяют титр, т. е. то наибольшее разведение, при котором реакция АГ+АТ еще учитывается. Полученную сыворотку разливают в ампулы, указывают на этикетке наименование и титр. В большинстве случаев сыворотку высушивают и перед употреблением растворяют, как указано на этикетке. Сыворотка может быть специфичной в пределах рода, вида, варианта (типа) и ее специфичность обусловлена тем, что она реагирует только с гомологичными АГ и не реагирует с гетерологичными. Неадсорбированные сыворотки обладают высоким титром, который достигает в РА 1 : 12800 и выше. Эти сыворотки не свободны от АТ к микробам, имеющим общие АГ в пределах группы, рода и семейства, в результате чего способны давать групповые реакции. Адсорбированные сыворотки отличаются строгой специфичностью, но обладают низкими титрами – 1 : 40 – 1 : 320. Адсорбированные сыворотки не подлежат разведению и в основном применяются в реакции агглютинации на стекле.

При установлении родовой, видовой принадлежности микроба и определении его серовара серологическим методом имеет значение концентрация микробной взвеси, которую определяют по отраслевому стандартному образцу (ОСО) мутности. **ОСО** выпускаются Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича в виде набора, к которому прилагается шрифтовая таблица и пробирки, соответствующие пробиркам эталона. **ОСО** на 10 ед. соответствует:  $0,93 \times 10^9$  клеток/мл микробов кишечной группы;  $11 \times 10^9$  клеток/мл микробов коклюшной группы;  $1,7 \times 10^9$  клеток/мл бруцелл;  $2,2 \times 10^9$  клеток/мл холерных вибрионов;  $5 \times 10^9$  клеток/мл туляремийного микроба. Для приготовления микробной взвеси используют 18–48-часовые культуры испытуемых штаммов, выращенные на плотной питательной среде. В стандартных пробирках готовят взвесь микробов, для чего в 3–5 мл ФР эмульгируют порциями культуру, сравнивая со стандартом мутности. Сравнение производят визуально в лучах падающего света на фоне шрифтовой таблицы.

Кроме того, для приготовления бактериальной суспензии определенной концентрации можно использовать стандарт мутности по Мак-Фарланду. При этом количественная характеристика исследуемой микробной взвеси определяется путем сравнения с ближайшими по мутности пробирками тем же способом, что и при использовании ОСО.

### Агглютинационные методы

**Реакция агглютинации (РА)** (синонимы: **классическая, развернутая, линейная, объемная, пробирочная**). Применяется для ускоренной идентификации микроорганизмов, а также для серодиагностики некоторых инфекционных заболеваний.

Компоненты:

1) АГ – исследуемый материал, содержащий инфекционный агент (при идентификации микробов) или бактериальный диагностикум (при серодиагностике);

2) АТ – известная агглютинирующая сыворотка (при идентификации микробов) или исследуемая сыворотка человека (животного) при серодиагностике заболевания;

3) разводящая жидкость – ЗФР рН 7,0–7,4.

Материалы: пробирки, штативы для пробирок, пипетки пастеровские и градуированные на 1, 5 и 10 мл, термостат на 37 °С, агглютиноскоп.

**Пробирочная РА.** На салфетку, смоченную дезинфицирующим раствором, ставят штатив с рядом пробирок, количество которых зависит от титра сыворотки. Работу начинают с приготовления основного разведения сыворотки, которое в зависимости от цели исследования может составлять 1 : 10, 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100 (табл. 1).

Таблица 1

**Приготовление основного разведения сыворотки**

Ингредиенты, мл	Разведение сыворотки			
	1:10	1:25	1:50	1:100
Физиологический раствор	1,8	2,4	4,9	9,9
Цельная сыворотка	0,2	0,1	0,1	0,1

Затем сыворотку титруют двукратно в объеме 0,5 мл (табл.2).



Таблица 2

**Схема постановки пробирочной реакции агглютинации**

Ингредиенты, мл	Разведение сыворотки (конечное)							Контроль	
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	АТ	АГ
Физиологический раствор (ФР)	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сыворотка 1:25	0,5	0,5	титрация по 0,5				0,5 (удалить)	0,5	–
Антиген	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5

В ряд пробирок, начиная со второй, вносят по 0,5 мл ФР. В первую и вторую пробирку вливают по 0,5 мл основного разведения сыворотки и, начиная со второй пробирки после тщательного перемешивания сыворотки с ФР, переносят 0,5 мл в третью пробирку, из третьей в четвертую и т. д. Из последней пробирки 0,5 мл сыворотки удаляют в дез. раствор для сохранения одинакового объема. В пробирку с контролем сыворотки вносят 0,5 мл ФР и 0,5 мл основного разведения сыворотки. В полученные разведения сыворотки добавляют по 0,5 мл АГ (диагностикума или взвеси микробов), взятого в концентрации  $1 \times 10^9$  м.к./мл. В пробирку с контролем АГ вносят 0,5 мл ФР и 0,5 мл АГ. В результате добавления АГ во всех пробирках объем жидкости равен 1 мл. Соответственно и разведение сыворотки в пробирках увеличивается в два раза. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37 °С на 2–4 ч (в отдельных случаях на 18–20 ч), затем сутки выдерживают при комнатной температуре.

**Пробирочная РА с высушенной кровью.** Участок фильтровальной бумаги, пропитанный двумя каплями крови, нарезают, переносят в пробирку с 1 мл ФР, выдерживают при 37 °С в течение 2 ч или 5–6 ч при комнатной температуре. Прозрачный раствор служит материалом для исследования. Две капли крови, нанесенной на бумагу, равняются 0,1 мл крови и соответственно 0,05 мл сыворотки в ней. Следовательно, основное разведение исследуемой сыворотки в 1 мл ФР будет 1 : 20. Из полученного разведения готовят последующие разведения сыворотки. В остальном исследование проводится, как при пробирочной РА.

*Учет и оценка результатов реакции:* предварительный визуальный учет производят через 2–4 ч и окончательный (с использованием агглютиноскопа), спустя 18–24 ч. Пробирки просматривают до встряхивания в проходящем свете, обращая внимание на форму и величину осадка и на просветление надосадочной жидкости. Затем пробирку осторожно встряхивают, наблюдая за распределением осадка, появле-

нием хлопьев и степенью помутнения жидкости. При положительной РА осадок покрывает все дно пробирки в виде зонтика. Надосадочная жидкость прозрачная. Осадок может состоять из легко разбивающихся хлопьев (Н-агглютинация), из плотных мелких зерен (О-агглютинация) или из хлопьев и зерен (ОН-агглютинация). В контроле сыворотки и контроле АГ не должно быть никаких хлопьев. Степень положительной РА оценивают по 4-крестовой системе: 4+ полная агглютинация (100%) – осадок в виде перевернутого зонтика, выстилающий все дно пробирки; при встряхивании распадается на крупные зерна и хлопья; надосадочная жидкость прозрачная; 3+ выраженная агглютинация (75 %) – осадок выстилает 3/4 дна пробирки; при встряхивании распадается на крупные и средней величины зерна и хлопья; надосадочная жидкость прозрачная, слегка опалесцирует; 2+ средняя агглютинация (50 %) – осадок занимает 1/2 площади дна пробирки; при встряхивании распадается на средней и мелкой величины зерна и хлопья; надосадочная жидкость опалесцирующая, слегка мутная; 1+ слабая (сомнительная) агглютинация (25 %) – осадок небольшой в центре дна пробирки; надосадочная жидкость мутная; – отрицательная РА – осадок очень маленький в центре дна пробирки, при встряхивании поднимается в виде змейки, равномерно распределяется в жидкости; надосадочная жидкость до и после встряхивания мутная.

При серологической идентификации микроорганизма РА должна быть положительной (не менее трех плюсов) с соответствующей диагностической сывороткой до ее титра или, по крайней мере, до 1/2–1/4 титра.

Определение диагностического титра исследуемой сыворотки большого носит весьма условный ориентировочный характер. Существенное значение имеет нарастание уровня АТ в динамике заболевания, для чего исследуют парные сыворотки, полученные в начале и в конце первой недели заболевания.

**Пластинчатая РА:** образование крупнодисперсных частиц агглютината в результате специфического взаимодействия корпускулярного микробного АГ с АТ иммунной сыворотки на плоской поверхности (предметные стекла, фотопластинки, чашки Петри). Пластинчатая РА по чувствительности уступает пробирочной. В этой реакции используют адсорбированные или неадсорбированные сыворотки в разведениях 1 : 10, 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100. Пластинчатая РА применяется для ускоренной ориентировочной сероидентификации микробов, для окончательной сероидентификации энтеробактерий, ускоренной серодиагностики некоторых инфекционных заболеваний, например, бруцеллеза (РА Хеддельсона) и др.

Компоненты:

- 1) АГ – суспензия убитых или живых бактерий ( $2-3 \times 10^9$  м.к./мл);
- 2) АТ – иммунная сыворотка;
- 3) разводящая жидкость – ЗФР рН 7,2–7,4.

Материалы: предметные стекла, чашки Петри, фотопластинки, пастеровские, градуированные пипетки на 1, 2 и 5 мл, стеклянные палочки, спиртовка, термостат на 37 °С.

Техника постановки реакции. На обезжиренное предметное стекло, а при работе с возбудителями особо опасных и высококонтагиозных заболеваний – в чашку Петри вносят каплю ЗФР (для контроля АГ) и такое же количество сыворотки, взятой в небольшом разведении (1 : 10, 1 : 25, 1 : 50 или 1 : 100) в зависимости от ее титра. Адсорбированная сыворотка используется без разведения. Изучаемую культуру эмульгируют бактериологической петлей в капле ЗФР. Затем микробную массу эмульгируют в капле сыворотки. Для реакции можно использовать микробную суспензию, приливая ее по 1–2 капли в опыт и контроль АГ. В этом случае смесь перемешивают стеклянной палочкой.

*Учет и оценка результатов реакции.* Спустя 3–5 мин производят учет РА невооруженным глазом или с помощью лупы. Основным критерием является степень просветления жидкости, величина и количество зерен агглютината. При положительной РА уже через 30–60 сек в опытной пробе начинают формироваться зерна агглютината, а жидкость постепенно просветляется. В контроле АГ – гомогенное помутнение.

При постановке пластинчатой РА с неадсорбированной иммунной сывороткой, взятой в невысоком разведении, результат реакции по идентификации выделенных микробов оценивается как предварительный, ориентировочный. В случае применения монорецепторной сыворотки, например, при серологической идентификации салмонелл или шигелл, результат регистрируется как окончательный, поскольку с помощью реакции определяется специфический АГ, присущий данному виду бактерий.

**Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА, РНГА).** РПГА применяют для серологической диагностики инфекционных заболеваний, определения титра иммунных сывороток, ускоренного обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды и различном биологическом материале. Реакция является достаточно специфичной и чувствительной:  $10^5-10^6$  м.к./мл.

Компоненты:

- 1) АГ – бактериальные, вирусные, тканевые, сывороточные АГ, взвеси органов и тканей, трупов животных, суспензия погадок;
- 2) АТ – исследуемая сыворотка или другой материал, содержащий АТ;

3) разводящая жидкость – 3ФР рН 7,2, содержащий 1 % нормальной кроличьей сыворотки (НКС). Вместо НКС можно использовать сыворотки других видов животных – лошадей, крупного рогатого скота и т. д. НКС можно заменить растворами различных высокомолекулярных полимерных соединений, например, поливинилпирролидона, полиглюкина, декстрана и др., растворами неионных детергентов – Твин-20, Твин-80 и т. д.;

4) взвесь эритроцитов дефибринированной крови барана, 3-кратно отмытых ФР;

5) диагностикум эритроцитарный антительный (антигенный).

Материалы: автоматические микропипетки, полистироловые пластины с полусферическим дном, пастеровские пипетки и пр. лабораторное оборудование.

Приготовление реактивов: 1% НКС – цельную кроличью сыворотку разводят 3ФР рН 7,2–7,4 1 : 2–1 : 4, инактивируют прогреванием при 56 °С в течение 30 мин и адсорбируют 3-кратно отмытыми бараными эритроцитами. Эритроциты осаждают центрифугированием (500 × g, 5 мин), после чего надосадочную жидкость разводят 3ФР 1 : 100.

*Подготовка проб к исследованию:* перед постановкой РПГА и РТПГА исследуемый материал обеззараживают нейтральным формалином, добавляя его в пробы до 4 % (0,2 мл на 2 мл пробы). Пробы оставляют при комнатной температуре на 1 ч, после чего ставят реакции. Формалин должен иметь нейтральный рН, т.к. в противном случае могут иметь место ложноположительные результаты.

Из пробы, предварительно обработанной формалином, часть жидкости (1–2 мл) отбирают и кипятят на водяной бане 15 мин с целью экстрагирования антигенов возбудителей сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, холеры. Оставшуюся часть пробы инактивируют на водяной бане при 56 °С 30 мин, если пробу исследуют на чуму, сеп, мелиоидоз. Далее в пробирки добавляют 50%-ную взвесь формализированных эритроцитов барана из расчета 1 капля взвеси на 1 мл пробы с целью устранения возможных неспецифических результатов РПГА. Смесь тщательно встряхивают, выдерживают 15 мин в термостате при 37 °С. Затем центрифугируют при 1000–2000 об/мин в течение 3–5 мин. Надосадочную жидкость отсасывают для постановки РПГА и РТПГА. Пробы воды, другие относительно малозагрязненные пробы, смывы чистой культуры с чашек можно не адсорбировать 50%-й взвесью эритроцитов.

*Подготовка исследуемых сывороток.* Перед постановкой опыта в исследуемые сыворотки добавляют мертиолат натрия 1 : 10000, разводят ФР 1 : 10 и прогревают при 56 °С в течение 20 мин, затем обрабатывают 50%-й взвесью формализированных эритроцитов барана (как описано выше).

**РПГА на обнаружение АГ.** В лунки верхнего ряда микропланшета (за исключением предпоследней лунки) автоматическим дозатором вносят 50 мкл ЗФР, содержащего 1 % НКС (разводящая жидкость). Затем в первую лунку вносят 50 мкл раствора АГ (инактивированного исследуемого материала), разведенного 1 : 10 насыщенным раствором хлорида натрия (для предотвращения возможной неспецифической реакции), и титруют, перемешивая содержимое лунок и перенося по 50 мкл из 1-й лунки во 2-ю, из 2-й в 3-ю и т.д. до 10 лунки включительно, из которой 50 мкл раствора АГ удаляют в дез. раствор. Предпоследняя лунка – контроль АГ, сюда вносят 50 мкл заведомо положительного АГ. Последняя лунка – контроль диагностикума. После серии двукратного разбавления исследуемого материала в каждую лунку ряда вносят по 1 капле антигенового эритроцитарного диагностикума, который предварительно встряхивают. Перемешивание исследуемого материала и диагностикума достигается завихрением жидкости при падении капли в лунку. Более интенсивное перемешивание происходит при легком встряхивании планшета на столе. Планшет оставляют на 2 ч при комнатной температуре или помещают при 37 °С на 30 мин. После этого учитывают результаты.

**РПГА на обнаружение АТ.** Техника постановки реакции аналогична варианту на обнаружение АГ, с той лишь разницей, что в качестве исследуемого материала применяют исследуемую сыворотку в разведении 1 : 10 и антигенный эритроцитарный диагностикум. Предпоследняя лунка – контроль АТ – содержит заведомо положительную сыворотку.

*Учет и оценка результатов реакции.* Через 2 ч с момента осаждения эритроцитов в контролях проводят предварительный учет результатов, окончательный учет результатов реакции через 12–18 ч. Характер осадков эритроцитов оценивают по 4-крестовой шкале:

«+ + + +» – агглютинировавшие эритроциты ровным слоем выстилают все дно лунки, образуя по форме перевернутый купол (зонтик);

«+ + +» – по окружности равномерно агглютинировавших эритроцитов отмечается тонкое («фестончатое») кольцо;

«++» – на фоне равномерно агглютинировавших эритроцитов отмечается кольцо меньшего диаметра с более ровным краем;

«+» – четкое кольцо малого диаметра на слабаразличимом фоне агглютинировавших эритроцитов;

«–» – агглютинация эритроцитов отсутствует, на дне лунки образуется маленькое кольцо с четким ровным краем или компактный диск (пуговка).

Реакцию учитывают только при отсутствии гемагглютинации в контролях диагностикума. РПГА считают положительной, если в лунках с исследуемым материалом имеется гемагглютинация не менее

чем на 3 креста. РНГА считают отрицательной, если во всех лунках гемагглютинация отсутствует. При наличии гемагглютинации как в опытной, так и контрольной лунке реакцию следует повторить с разведением исследуемого материала 1 : 5 и 1 : 10. Если и в этом случае эритроциты также будут агглютинировать во всех лунках, реакцию считают неспецифической и ее результаты не учитывают.

### **Реакция торможения пассивной (непрямой) гемагглютинации (РТПГА, РТНГА).**

Принцип. Взаимодействие гомологичных АГ и АТ приводит к их нейтрализации, в результате чего тормозится агглютинация эритроцитов, сенсibilизированных специфическими АТ (АГ). Если АГ (АТ) гетерологичны, то их взаимодействие не произойдет и свободные АГ (АТ) вызовут агглютинацию индикаторных эритроцитов. РТПГА используется в качестве контроля специфичности РПГА, эти реакции ставятся параллельно.

**РТПГА на обнаружение АГ.** Компоненты и материалы те же, что в РПГА. Дополнительно – специфическая иммунная сыворотка активностью 8–16 СЕ.

В лунки верхнего ряда планшета вливают по 25 мкл разводящей жидкости. В первую лунку вносят 25 мкл исследуемого материала и титруют по 25 мкл до предпоследней лунки, из которой 25 мкл жидкости удаляют в дез. раствор. Во все лунки добавляют по 25 мкл специфической сыворотки в количестве 8–16 СЕ. За 1 СЕ принимают предельное разведение сыворотки, в котором еще регистрируется полное склеивание эритроцитов, определяемое предварительно в РПГА. Планшет выдерживают 30 мин при 37 °С и добавляют во все лунки по 25 мкл антительного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 ч до оседания эритроцитов. Реакцию сопровождают контролем эритроцитарного диагностикума (25 мкл разводящей жидкости и 25 мкл антительного эритроцитарного диагностикума).

**РТПГА на обнаружение АТ.** Компоненты и материалы те же, что в РПГА. Дополнительно – взвесь убитой культуры активностью 8–16 антигенных единиц (АЕ).

В лунки микротитровальной пластины вливают по 25 мкл разводящей жидкости. В первую лунку вносят 25 мкл исследуемой сыворотки или другого материала, содержащего АТ, и титруют по 25 мкл до предпоследней лунки, из которой 25 мкл жидкости удаляют в дезраствор. Во все лунки вносят по 25 мкл гомологичного АГ в количестве 8–16 АЕ. 1 АЕ – минимальное разведение АГ, в котором регистрируется полное склеивание эритроцитов в РПГА. Пластины встряхивают, выдерживают 30 мин при 37 °С и добавляют во все лунки 25 мкл антигенного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и оставляют при комнатной

температуре на 2 ч до оседания эритроцитов. Реакцию сопровождают контролем диагностикума.

*Учет и оценка результатов РТПГА* проводится по феномену гемагглютинации аналогично учету в РПГА. Если активность материала в РТПГА отсутствует или снижается на несколько лунок по сравнению с активностью того же материала в РПГА, то «+» результат РПГА признается специфическим.

### **Реакция нейтрализации АТ (РНАт) на обнаружение АГ.**

Компоненты:

- 1) исследуемый материал – АГ – бактериальные, вирусные, тканевые, сывороточные АГ, взвеси органов и тканей, трупов животных, суспензия погадок;
- 2) специфическая иммунная сыворотка активностью 2 СЕ;
- 3) разводящая жидкость – ЗФР рН 7,2, содержащий 1 % НКС;
- 4) диагностикум эритроцитарный антигенный.

Материалы: автоматические микропипетки, U-образные полистироловые пластины, пастеровские пипетки и пр. лабораторное оборудование.

В лунки верхнего ряда планшета вливают по 25 мкл разводящей жидкости. В первую лунку вносят 25 мкл исследуемого материала (АГ) и титруют по 25 мкл до предпоследней лунки, из которой 25 мкл жидкости удаляют в дезраствор. Последняя лунка – контроль диагностикума. Во все лунки добавляют по 25 мкл специфической сыворотки активностью 2 СЕ. Планшет выдерживают 30 мин при 37 °С и добавляют во все лунки по 25 мкл антигенного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 ч до оседания эритроцитов. Реакцию сопровождают контролем эритроцитарного диагностикума (25 мкл разводящей жидкости + 25 мкл специфической сыворотки (2 СЕ) и 25 мкл антигенного эритроцитарного диагностикума).

Если в исследуемом материале содержится АГ, то он нейтрализует 2 СЕ сыворотки, и последняя не сможет агглютинировать антигенный диагностикум (пуговка). В противном случае АТ сыворотки останутся свободными и в результате сенсibilизированные АГ эритроциты окажутся агглютинированными (зонтик). Под титром материала в РНАТ принимают крайнее разведение исследуемого АГ, при котором полностью отсутствует агглютинация эритроцитов (пуговка).

### **Реакция нейтрализации АГ (РНАг) на обнаружение АТ.**

Компоненты:

- 1) исследуемый материал – АТ (исследуемая сыворотка, спинномозговая жидкость или другой материал, содержащий АТ);
- 2) раствор АГ в количестве 2 АЕ;
- 3) разводящая жидкость – ЗФР рН 7,2, содержащий 1 % НКС;

4) диагностикум эритроцитарный антительный.

Материалы: автоматические микропипетки, U-образные полистироловые пластины, пастеровские пипетки и пр. лабораторное оборудование.

В лунки верхнего ряда планшета вливают по 25 мкл разводящей жидкости. В первую лунку вносят 25 мкл исследуемого материала (АТ) и титруют по 25 мкл до предпоследней лунки, из которой 25 мкл жидкости удаляют в дез. раствор. Последняя лунка – контроль диагностикума. Во все лунки добавляют по 25 мкл раствора АГ в количестве 2 АЕ. Планшет выдерживают 30 мин при 37 °С и добавляют во все лунки по 25 мкл антительного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 ч до оседания эритроцитов. Реакцию сопровождают контролем эритроцитарного диагностикума (25 мкл разводящей жидкости + 25 мкл раствора АГ (2 АЕ) и 25 мкл антительного эритроцитарного диагностикума).

Если в исследуемом материале содержатся АТ, то они нейтрализуют 2 АЕ антигена, и последний не сможет агглютинировать антительный диагностикум (пуговка). В противном случае АГ останется свободным и в результате сенсibilизированные АТ эритроциты окажутся агглютинированными (зонтик). Под титром материала в РНАт принимают крайнее разведение исследуемого материала (АТ), при котором полностью отсутствует агглютинация эритроцитов (пуговка)

**Контрольные вопросы:**

1. Антигены. Характеристика АГ, антигенные детерминанты.
2. Антитела, характеристика. Классы иммуноглобулинов.
3. Строение молекулы IgG.
4. Специфичность АТ.
5. Взаимодействие АТ с АГ.
6. Иммуносерологические реакции, используемые для обнаружения АТ.
7. Иммуносерологические реакции, используемые для обнаружения АГ.
8. Развернутая и ориентировочные РА.
9. РПГА и РТПГА.
10. РНАт и РНАг.
11. Реакция Кумбса.

## **РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ И ЕЕ ВАРИАНТЫ**

Преципитацией называют процесс, когда происходит агрегация АТ с растворимыми АГ; если АГ представлен корпускулами, специфическая агрегация таких АГ описывается как агглютинация. Появление преципитата при реакции АГ+АТ определяется не только возникновением решетки, образуемой ее участниками, но и особой ролью Fc-фрагмента



иммуноглобулина, изменение конформации которого приводит к утрате этим комплексом растворимости в солевых растворах. В связи с этим в реакции преципитации используют неразведенную или слабо разведенную сыворотку. Для постановки реакции преципитации необходимы: АТ – испытуемая сыворотка больного или иммунная диагностическая сыворотка (при идентификации выделенных микробов); АГ; физиологический раствор как источник электролитов.

Существует множество модификаций этой реакции, которые подразделяют на две группы: преципитация в жидкой среде (реакция флоккуляции и реакция кольцепреципитации) и преципитация в геле. **Реакция флоккуляции** представляет собой преципитацию, при которой растворы АГ и АТ смешивают в пробирке. Учет реакции производят с помощью измерения мутности получаемой системы на фотоэлектроколориметре, что позволяет определить концентрацию исследуемого АГ (рис. 14).

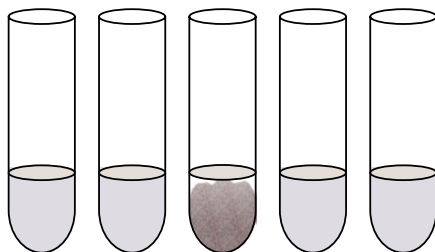


Рис. 14. Реакция флоккуляции

Для постановки **реакции кольцепреципитации** в тонкие преципитационные пробирки наливают сначала неразведенную преципитирующую сыворотку и сверху на нее наслаивают, не допуская перемешивания, раствор АГ. В случае гомологичности АТ и АГ на границе между этими растворами в течение 3–10 мин появляется кольцо преципитата. В отличие от реакции агглютинации, титр преципитирующей сыворотки определяют с помощью разведения не сыворотки, а АГ (рис. 15).

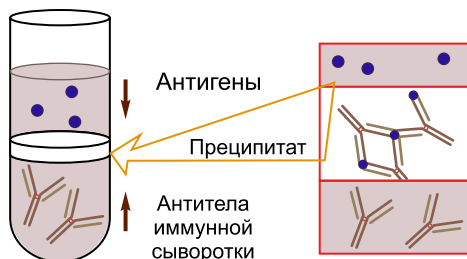


Рис. 15. Реакция кольцепреципитации

**Реакция преципитации в геле** является одним из наиболее эффективных методов анализа. Явление иммунопреципитации в геле широко используется в целом ряде важных методик, применяющихся для изучения АТ, а также для обнаружения и количественного определения растворимых АГ. Иммунопреципитация основана на очень простом принципе. В толще геля существует водная фаза, через которую легко диффундирует большинство макромолекул. Когда сложный АГ перемещается в область, содержащую АТ, то при оптимальном соотношении концентраций взаимодействующих компонентов образуются видимые линии преципитации. Реакцию обычно проводят в расположенных горизонтально тонких слоях агарового геля на стеклянных подложках.

В 1948 г. Е. Оухтерлони разработал простой и удобный метод встречной двумерной диффузии в геле, позволяющий проводить прямое сравнение различных АГ и сывороток. Для реакций иммунодиффузии АГ и АТ вносят в лунки, вырезанные в геле напротив друг друга. Известны различные модификации метода иммунодиффузии: иммунодиффузия АГ в агаровом геле, содержащем АТ (или наоборот), приводящая к образованию колец преципитации, их диаметр пропорционален концентрации АГ (АТ); **иммуноэлектрофорез** – метод, объединяющий электрофоретическое разделение смеси АГ и встречную диффузию по Оухтерлони на одной и той же пластинке агарового геля. Преципитирующую сыворотку при этом наливают в канавку, вырезанную в геле параллельно направлению электрофоретического разделения. Образующиеся в результате реакции линии преципитации имеют вид дуг, вытянутых в направлении электрофоретического движения фракций АГ (рис. 16). Иммуноэлектрофорез позволяет определять состав сложных смесей растворимых АГ, содержащих до 30 компонентов, и является ценным диагностическим методом.

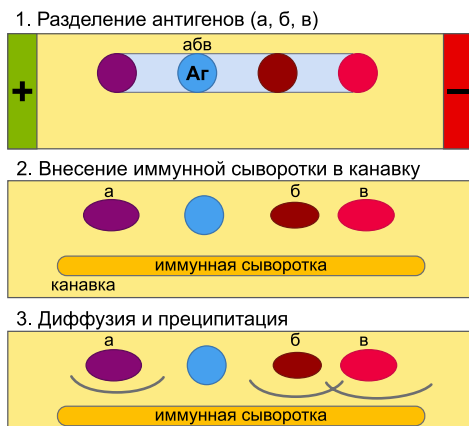


Рис. 16. Иммуноэлектрофорез

### Двойная радиальная иммунодиффузия по Оухтерлони.

В слое агарового геля равномерной толщины на определенном расстоянии друг от друга вырезают лунки для АГ и антисыворотки и заполняют их соответствующими растворами. АГ и АТ диффундируют в гель, соединяются друг с другом и образуют иммунные комплексы, которые преципитируют в гранулах геля, становясь видимыми как линии преципитации. Двойную радиальную иммунодиффузию применяют главным образом для качественного анализа, например для определения числа АГ в различных жидкостях (в сыворотке крови, цереброспинальной жидкости), для оценки чистоты препаратов при выделении АГ, для сравнения известных АГ и АТ с неизвестными, а также с целью наблюдения за ходом иммунизации животных.

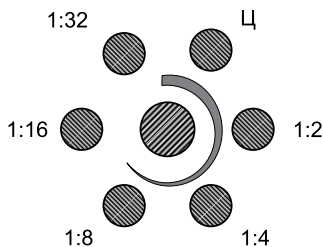


Рис. 17. РИД. Определение титра сыворотки

Для титрования антисыворотки лунки располагают как показано на рис. 17. Готовят последовательные двукратные разведения антисыворотки и равные объемы каждого из них вносят в лунки, расположенные по периферии. Центральную лунку заполняют раствором АГ. При оценке результатов иммунодиффузии учитывают: расстояние, отделяющее линию преципитации от центральной и периферической лунок; интенсивность и ширину полос преципитации; последнее разведение антисыворотки, при котором еще можно видеть преципитат.

**Оценка результатов.** При оптимальном соотношении между АГ и АТ линия преципитации располагается почти посередине между лунками. Количественное преобладание одного из реагентов сдвигает линию преципитации к лунке другого реагента. АГ и АТ образуют видимые преципитаты при концентрациях белка от 5 до 50 мкг/мл.

**Сравнительный анализ.** Для сравнения АГ обычно в геле вырезают три лунки, расположенные треугольником. В две из них помещают сравниваемые растворы АГ, а в третью – антисыворотку. Принципиально возможны три варианта расположения линий преципитации. 1. Обе линии полностью сливаются. Это говорит об **идентичности антигенов в обеих лунках**. 2. Одна из линий длиннее другой и, выходя из последней, образует так называемую шпору. Шпора часто бывает тоньше,

чем основные линии преципитации. Вторая линия сливается с линией, образовавшей шпору. В данном случае это свидетельствует о **частичной идентичности антигенов**. Оба АГ имеют некоторые общие детерминанты, которые, соединяясь с АТ, дают сливающиеся линии преципитации. Однако у первого АГ имеются еще и детерминанты, которых нет у второго. 3. Линии пересекаются, либо не сливаются и не пересекаются. Это указывает на **неидентичность антигенных детерминант** и, следовательно, на различие молекул исследуемых АГ. (рис. 18).

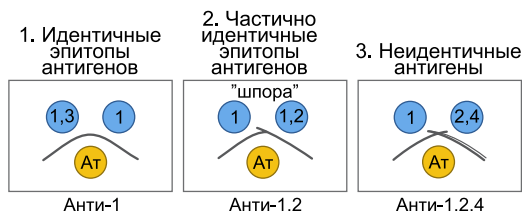


Рис. 18. Реакция иммунодиффузии

**Простая радиальная иммунодиффузия по Манчини:** используют в основном для количественного определения АГ. Чаще всего исследуют белковые АГ: белки сыворотки крови, цереброспинальной жидкости, секретов желез, экстрактов из органов и т.д. Метод получил широкое распространение в клинических биохимических лабораториях. На ровную поверхность равномерным слоем наносят гель, содержащий АТ. В геле вырезают лунки и заполняют их раствором АГ. Молекулы АГ радиально диффундируют из лунки и, встретившись с АТ, образуют кольцо преципитации. До тех пор пока в лунке сохраняется избыток АГ, диаметр кольца преципитации постепенно увеличивается. Оценку результатов проводят путем измерения колец преципитации на влажных и окрашенных препаратах с помощью окулярного микрометра, который прикладывают к обратной стороне стекла (рис. 19).

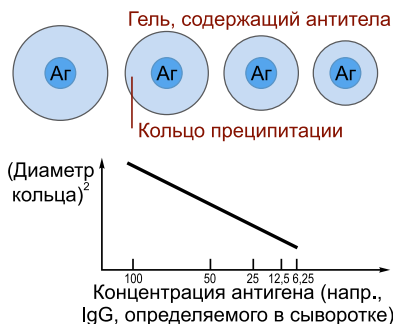


Рис. 19. Реакция радиальной иммунодиффузии по Манчини

*Сушка и хранение препаратов.* Для длительного хранения препараты высушивают. До этого их отмывают от непрореагировавших компонентов в физиологическом растворе, инкубируя 2–3 сут при 3–5 его сменах.

*Окрашивание препаратов.* Препараты окрашивают красителями, выявляющими белок. Чаще всего применяют амидо-черный, кумасси ярко голубой, бромфеноловый синий и др. Для этого стекла с отмытым и высушенным гелем помещают на 1–5 мин в краситель и держат до тех пор, пока окрашенный преципитат не будет отчетливо виден на фоне окружающего геля. В качестве обесцвечивающего раствора используют растворитель самой краски.

**Иммуноэлектрофорез (ИЭФ).** Принцип ИЭФ: вначале проводят электрофоретическое разделение смеси белков в забуференном агаровом геле. Затем в канавку, которая идет в направлении миграции белков, вносят преципитирующую иммунную сыворотку. АГ и антисыворотка диффундируют в геле навстречу друг другу, и в месте их взаимодействия возникают дуги (линии) преципитации. Число, положение и форма этих линий дают представление о составе исходной смеси антигенов. ИЭФ – один из широко распространенных методов качественного анализа АГ. В клинике ИЭ чаще всего используют при диагностике иммунодефицитных состояний. Он незаменим как метод последовательного наблюдения за процессом очистки белковых препаратов.

*Приготовление гелей.* Гель готовят так же, как для иммунодиффузии, за исключением того, что вместо ФР используют подходящий буферный раствор, чаще всего – барбиталовый или боратный буфер pH от 6–9.

**Ракетный иммуноэлектрофорез:** гель агарозы смешивают с моноспецифической антисывороткой и равномерным слоем распределяют по поверхности стекла. В полученном геле вырезают лунки и заполняют их исследуемым АГ. В электрическом поле молекулы АГ мигрируют в гель и взаимодействуют с АТ. По мере продвижения молекулы АГ постепенно связываются АТ, образуя вытянутый в длину остроконечный преципитат. В стандартных условиях (концентрация геля, толщина его слоя, содержание в нем антисыворотки, напряжение и сила тока) длина такого преципитата прямо пропорциональна концентрации АГ. Впервые был предложен К. Лореллом в 1966 г., обычно используется для количественного определения белка в жидкостях организма. Его существенным преимуществом по сравнению с иммунодиффузией по Манчини является быстрота получения результатов.

**Перекрестный иммуноэлектрофорез:** на первом этапе проводят электрофоретическое разделение смеси белков (например, сыворотки) в геле агарозы. Затем разделенные белки вновь подвергают электрофорезу в направлении, перпендикулярном первому этапу. При этом

гель содержит АГ, образующие с исследуемыми белками преципитаты в форме пиков. Высота или площадь этих пиков прямо пропорциональна концентрации соответствующих АГ в исследуемой смеси. Площадь пиков зависит также от концентрации антител в геле.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Преципитационные методы

#### Основные рекомендации при постановке реакции иммунодиффузии в геле (РИД)

*Приготовление гелей:* чаще всего в качестве гелеобразующих агентов применяют агар или агарозу. Разнообразные фирменные типы агаров сильно различаются по степени чистоты. Некоторые марки агаров могут быть использованы без очистки, такие как Difco Vacto Agar, Difco Special Agar, Oxoid Ion Agar, Behringwerke Rein Agar, Litex, Pharmacia. Готовить агар желательно только для одного эксперимента или, в крайнем случае, для нескольких опытов, поскольку многократное разогревание перед каждым опытом приводит к испарению жидкости и изменению концентрации и, следовательно, физико-химических свойств агара. Отвешивают определенное количество агара, переносят его в колбочку и добавляют необходимый объем ФР или буфера. Колбочку со смесью ставят в кипящую водяную баню до полного растворения агара. Затем в раствор добавляют один из консервантов для предотвращения роста микроорганизмов: 0,01–0,05%-й азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ), 0,1–0,12%-й мертиолат натрия или 0,1%-й фенол. Необходимо следить за тем, чтобы агар был не только стерильным, но и максимально прозрачным. Он не должен содержать посторонних механических примесей, особенно ворсинок от марли или ваты. Для улучшения формирования иммунопреципитатов иногда добавляют 2–4%-й полиэтиленгликоль или декстраны. *Подготовка стекол и заливка агара:* иммунодиффузию проводят на стеклах, чаще всего предметных, или фотопластинках. Обезжиренные стекла желательно покрыть тонким слоем 1%-го водного агара и высушить при комнатной температуре или при 70 °С. К таким стеклам хорошо прилегает гель. Для получения одинаковой толщины агара стекла помещают на строго горизонтальную поверхность. Залитые агаром стекла помещают во влажную камеру, например, в эксикатор, на дно которого наливают воду с антисептиком. Стекла можно поместить в эксикатор во влажной чашке Петри. *Приготовление лунок:* для просечения лунок в агаре применяют стандартные штампы, состоящие из трубок-пробойников. В зависимости от поставленной задачи используют штампы, содержащие 4, 5 или

7 трубок-пробойников. Наружные диаметры трубок могут варьировать от 3 до 5 мм. Для постановки иммунодиффузии по Манчини используют отдельные трубки-пробойники или инъекционные иглы со сточенным концом. В этом случае под стекло с агаром кладут трафарет и пробойником просекают контуры лунок. Агаровые пробки отсасывают с помощью вакуумного насоса. *Температура*: результаты иммунодиффузии существенно не зависят от температуры. Опыт может быть поставлен при 4, 20 или 37 °С. Удобнее всего работать при комнатной температуре. Следует лишь избегать резких колебаний температуры в ходе инкубации. *Электролиты*: в качестве электролитов используют 0,15 М NaCl либо фосфатный или барбиталовый буфер. *Постановка опыта*: для того чтобы избежать подсыхания агара, опыт на одном стекле должен быть поставлен в максимально короткие сроки (10–15 мин). В лунки в зависимости от их диаметра вмещается от 2 до 40 мкл раствора реагента. При заполнении лунок доверху жидкость не должна переливаться через край. Сразу же после заполнения лунок реагентами стекло помещают в эксикатор. Иммунодиффузия может продолжаться от 2 до 7 сут в зависимости от задачи.

### **Реакция кольцепреципитации РКП (Асколи, 1906)**

Поочередное наслаивание друг на друга прозрачных растворов АГ и АТ сопровождается взаимодействием реагентов на границе их соприкосновения и постепенном образовании серовато-мутного преципитата в виде плавающего диска. РКП применяется при серодиагностике сибиреязвенного АГ в животном сырье, индикации патогенных микроорганизмов и в судебно-медицинской практике.

Компоненты:

- 1) АГ – раствор исследуемого материала;
- 2) стандартный АГ (для положительного контроля);
- 3) АТ – преципитирующая сыворотка;
- 4) нормальная сыворотка того вида животного (человека), материал от которого подлежит исследованию (для отрицательного контроля);
- 5) разбавитель – ФР.

Материалы: преципитационные пробирки (внутренний диаметр 3,0–4,0 мм, высота 70–90 мм), пастеровские пипетки, градуированные пипетки (автоматические дозаторы с наконечниками), микроштативы, лист черной бумаги.

*Техника постановки реакции*: в чистые прозрачные преципитационные пробирки вносят 0,3 мл реагента с большим удельным весом (как правило, это преципитирующая сыворотка) и осторожно по внутренней стенке пробирки наслаивают пастеровской пипеткой с тонко

оттянутым капилляром реагент с меньшим удельным весом, т. е. АГ, который используют в различных разведениях. В момент наслаивания пробирку с сывороткой фиксируют в наклонном положении (под углом примерно 45°). После наслаивания АГ пипетку не спеша извлекают, не отрывая от стенки пробирки. Пробирку переводят в вертикальное положение. К каждому опыту ставится ряд контролей (табл. 3).

Таблица 3

Схема постановки РКП по Асколи

Ингредиенты, мл	Опыт	Контроли		
		1	2	3
Специфическая преципитирующая сыворотка	0,3	0,3	0,3	–
Нормальная сыворотка (того же вида животного или человека)	–	–	–	0,3
Исследуемый экстракт	0,3	–	–	0,3
Специфический стандартный экстракт	–	0,3	–	–
Физиологический раствор	–	–	0,3	–
Результат	+	+	–	–

*Учет и оценка результатов реакции:* реакцию учитывают через 10–15 мин по феномену образования диска преципитата на границе двух сред. Реакция считается достоверной, если 1-й контроль положительный, а 2-й и 3-й – отрицательные.

### Реакция иммунодиффузии в геле

Принцип: диффузия растворов АГ и АТ, залитых в противостоящие лунки агарового геля, в случае их соответствия приводит к образованию в месте встречи линий преципитации.

Компоненты:

- 1) 1%-й агар, содержащий 0,05 % азидата натрия; АГ – исследуемый (либо известный) антиген;
- 2) АТ – специфическая иммунная сыворотка (либо кратные разведения сыворотки);
- 3) разбавитель – ЗФР рН 7,2–7,4.

Материалы: гель агара, предметные стекла, чашки Петри, пробирки, автоматические микропипетки с наконечниками, пробойники, водяная баня, термостат, горизонтальный уровень.



*Техника постановки реакции.* Реакцию проводят на чистых, обезжиренных предметных стеклах или стеклах от фотопластинок (9 × 12 см), либо в маленьких пластиковых чашках Петри на которые наносят подогретой пипеткой слой в 1,5–2,0 мм 1%-ного осветленного агара, подогретого до 70 °С. Стекла и чашки Петри размещают на горизонтальном столике с уровнем для формирования на них слоя геля равной толщины. Специальным пробойником в агаре вырезают лунки. В штампах «пятерка» и «семерка» одна из трубок является центральной, а остальные расположены по окружности на равном расстоянии друг от друга. Наружный диаметр трубок составляет 3–5 мм, а расстояние между центральной и периферическими трубками – от 5 до 10 мм. Из просеченных лунок агар осторожно извлекают, отсасывая его металлической трубкой, соединенной через шланг с вакуумным насосом. Для герметизации дна лунок пастеровской пипеткой с тонко оттянутым концом осторожно вносят на донышко по 1 микрокапле горячего агара и сразу удаляют его. Растворы АГ и АТ при помощи автоматических микропипеток заливают в соответствующие лунки, не переливая жидкость через края и не касаясь их. Стекла помещают во влажную камеру, либо на крышку чашки Петри наклеивают смоченную водой фильтровальную бумагу. Реакцию проводят при 37 °С в течение 4–16 ч либо при комнатной температуре – 24–48 ч.

*Учет и оценка результатов реакции.* Через 24, 48, 72 ч учитывают количество и расположение полос преципитации в агаровом геле в проходящем и падающем свете, а также при косом освещении на темном фоне с помощью лупы.

### **Встречный иммуноэлектрофорез (ВИЭФ)**

**Принцип.** При встречном электрофорезе образование иммунных преципитатов в поддерживающей среде происходит в результате миграции АГ и АТ навстречу друг другу под действием электрического поля. Молекулы различных белков обладают различным зарядом и поэтому движутся при электрофорезе в щелочном буфере не только с разной скоростью, но и в разных направлениях – одни к аноду, другие к катоду.

**Компоненты:**

- 1) исследуемый материал (АГ или АТ);
- 2) АГ – стандартный бактериальной, вирусной и др. природы;
- 3) АТ – известная иммунная сыворотка;
- 4) разбавители: дистиллированная вода, ЗФр pH 7,2–7,4.

**Материалы и оборудование:** очищенный агар или агароза, консервант (мертиолат натрия), камера для электрофореза, блок питания, система охлаждения для поддержания постоянной температуры в геле,

контактные мостики из агара, поролона или фильтровальной бумаги, обеспечивающие связь буфера с гелем, предметные стекла или стеклянные пластинки, штатив для стеклянных пластинок, пластмассовые ванночки объемом 1–2 л, горизонтальный столик, водяная баня, магнитная мешалка с электронагревателем, пипетки, пробойники, трафарет, скальпели, пробирки, колбы на 50, 100, 500 мл, сигнальные часы, фен.

Реактивы: буферные растворы: барбиталовый, мединаловый, ацетатный, фосфатный или др.

*Приготовление геля.* Расплавляют 1 г агара или агарозы в 100 мл буфера на кипящей водяной бане. В качестве консерванта используют 2 мл 0,1%-ного раствора мертиолата натрия. Горячий прозрачный раствор можно разлить на порции однократного потребления (по 20, 50 или 100 мл) и хранить при 4 °С в течение нескольких месяцев.

*Техника проведения ВИЭФ.* На подогретую обезжиренную стеклянную пластинку наносят несколько миллилитров раствора агарозы и осторожно проводят кромкой другой пластинки, наклоненной под углом 45°. Струей горячего воздуха из фена гель высушивают в тонкую пленку. Затем на стекло, помещенное в кювету на горизонтальном столике с уровнем, выливают приготовленный гель из расчета 0,15–0,2 мл на 1 см<sup>2</sup> и дают ему застыть. С помощью пробойника и трафарета в геле вырезают лунки диаметром 2–5 мм, располагая их попарно на расстоянии друг от друга от 2–4 мм до 5–8 мм. Расстояние от краев пластинки должно быть не менее 1,5 см. Гелевые цилиндры удаляют с помощью водоструйного насоса. При использовании пластинок без агаровой пленки производят герметизацию доньшка лунки, внося в них микрокаплю горячего агара (70–90 °С) и сразу его удаляя. В лунки с катодной стороны вносят по 0,01 мл АГ, а с анодной – такой же объем сыворотки (АТ). Опыт обязательно сопровождают отрицательным (ФР или гетерологичный АГ) и положительным (АГ стандартный) контролями. Оба отделения камеры для электрофореза заполняют буфером. Пластины с гелем укладывают в соответствии с расположением полюсов и замыкают электрическую цепь полосками бумаги, смоченными буферным раствором. Включают охлаждение и ток и ведут ВИЭФ при напряжении 10 В/см<sup>2</sup> в течение 45–60 мин.

*Учет и оценка результатов.* Просмотр и изучение линий преципитации проводят в проходящем и падающем свете, а также при косом освещении на темном фоне с помощью лупы. От непреципитирующих белков гель отмывают путем погружения стекол 2–3 раза на 12 ч в ванночку с 0,15 М раствором NaCl. Затем поверхность геля накрывают фильтровальной бумагой, смоченной в дистиллированной воде, и высушивают при комнатной температуре. Оценку осуществляют путем сравнительного изучения опытных и контрольных полос преципитации.

**Контрольные вопросы:**

1. Реакция коаггуляционной
2. Реакция иммунодиффузии в геле
3. Иммуноэлектрофорез

**МЕТОДЫ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ**

В 1950 г. Кунс и Каплан продемонстрировали возможность ковалентного связывания флуоресцентных красителей с АТ без утраты последними способности реагировать с АГ. В результате был разработан метод, сочетающий чувствительность и специфичность иммунологических реакций с топографической точностью микроскопии. Специальное оборудование позволяет визуально регистрировать свет, испускаемый ничтожным количеством флуорохрома. Флуоресцентные метки пригодны для методики двойного окрашивания, т.е. обработки образца двумя препаратами, различающимися по специфичности и метке АТ, которые окрашивают области локализации соответствующих АГ в разные цвета. Первая работа, включившая ИФ в арсенал лабораторных методов, была выполнена с применением конъюгатов, меченых флуоресцеином. Флуоресцеин и сейчас остается наиболее распространенным флуорохромом. Максимум светопоглощения конъюгатов, меченных флуоресцеином, регистрируется при 495 нм. Для них характерна интенсивная флуоресценция изумрудно-зеленого цвета, не свойственная аутофлуоресценции большинства тканей млекопитающих и с высокой чувствительностью воспринимаемая сетчаткой глаза. Для конъюгации с белками обычно применяют флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), изомер 1. Он легко присоединяется к белкам, образуя стабильные конъюгаты с заданным содержанием метки. Основной альтернативой флуоресцеину может служить родамин. Конъюгаты, меченные этим красителем, имеют максимум светопоглощения при 555 нм, а их оранжевая флуоресценция хорошо контрастирует с флуоресцеином. Поэтому родамин применяют главным образом в качестве второй метки при двойной иммунофлуоресценции. Флуорохром используют обычно в виде тетраметилродаминизотиоцианата. Еще один флуорохром с оранжево-красной флуоресценцией – это техасский красный. Максимум светопоглощения этого красителя (596 нм) в еще большей степени, чем у родамина, контрастирует с соответствующим значением флуоресцеина.

Флуоресцентные реагенты готовят из обладающих достаточной активностью и специфичностью препаратов АТ или АГ, которые конъюгируют с оптимальным количеством флуорохрома. Методически процедура конъюгации одноэтапна, предполагает инкубирование

в течение определенного времени иммунного реагента с красителем и последующее промыванием полученного препарата от не связавшегося красителя. При наличии подходящих иммунных реагентов можно самостоятельно приготовить конъюгат, не уступающий по качеству коммерческим образцам. Свободный флуорохром может вызвать неспецифическое окрашивание и дает высокий уровень фоновой флуоресценции даже при незначительной (5 мкг/мл) концентрации свободного ФИТЦ. Кроме того, при длительном хранении конъюгаты могут диссоциировать на иммунный реагент и свободный краситель, что усиливает неспецифическое окрашивание. Это особенно свойственно конъюгатам с родаминовой меткой, этому во всех подозрительных случаях диагностиком проверяют на присутствие свободного красителя с помощью хроматографической методики (гель-фильтрация). Лучший метод удаления свободного красителя из препаратов конъюгата – гель-фильтрация на сефадексах G25 и G50. Пик меченого белка выходит в свободном объеме.

Мерой активности иммунофлуоресцентного препарата служит то максимальное его разведение, при котором еще сохраняется способность к специфическому окрашиванию. Это свойство важно не только с точки зрения экономии препарата, но и потому, что оптимальной эффективности окрашивания можно достигнуть лишь с высокими разведениями конъюгата, при которых соотношение между интенсивностью сигнала и фона достаточно велико. При невысоких разведениях конъюгата регистрируется сильная неспецифическая флуоресценция.

Различают прямую и непрямую иммунофлуоресценцию. В основе прямой иммунофлуоресценции лежит серологическая реакция между искомым АГ и видоспецифическим флуоресцирующим иммуноглобулином (рис. 20).

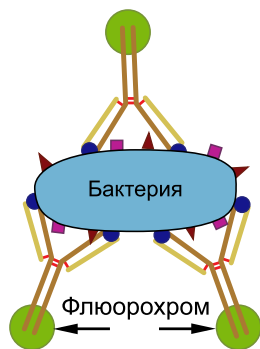


Рис. 20. Прямой МФА

Образующийся в результате комплекс АГ – флуоресцирующее АТ приобретает способность светиться в УФ-лучах. С помощью МФА можно в течение 1–2 ч обнаружить наличие возбудителей инфекционных заболеваний в исследуемой пробе. Чувствительность метода  $5 \times 10^4$ – $10^5$  м.к./мл. Непрямая иммунофлуоресценция основана на применении антиглобулиновых конъюгатов, которые позволяют обнаружить участки связывания предварительно нанесенных немеченых антител (рис. 21).

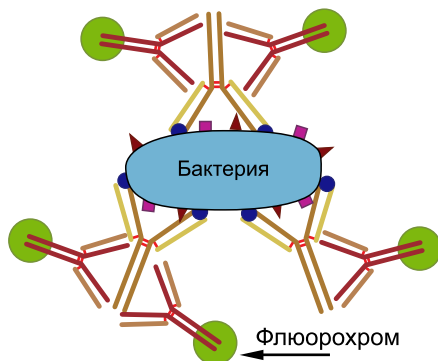


Рис. 21. Непрямой МФА

Преимуществом непрямого МФА является то, что при его использовании отпадает необходимость иметь большой набор различных специфических флуоресцирующих АТ. В качестве антиглобулиновых АТ обычно используют сыворотку козы или барана, иммунизированных сывороткой кролика, морской свинки, мыши и т.д.. Непрямой МФА применяют не только для ускоренного обнаружения возбудителя (АГ), но и для обнаружения АТ в сыворотке больного.

Одна из наиболее важных особенностей МФА состоит в возможности одновременной идентификации двух разных АГ даже при их локализации в одной и той же области (двойная иммунофлуоресценция). В наиболее простом варианте для этого служит прямая иммунофлуоресценция с двумя различными по специфичности конъюгатами, один из которых содержит флуоресцеин, другой – родамин.

Оптимальные условия распознавания АГ в МФА определяются двумя факторами, зависящими от свойств конъюгата: интенсивностью специфической флуоресценции и ее контрастом с фоновым уровнем. Важно отметить, что нежелательная (фоновая) флуоресценция может быть связана, во-первых, с истинным неспецифическим окрашиванием, обусловленным электростатическими взаимодействиями, и, во-вторых, с нежелательным, но *специфическим* окрашиванием, обусловленным пе-

рекрестной реактивностью меченых АТ к другим тканевым АГ. Оба вида нежелательной флуоресценции нужно свести к минимуму без заметного снижения уровня специфической реакции. Это достигается путем одновременной окраски мазков флуоресцирующими конъюгатами в сочетании с контрастирующим сывороточным альбумином, обеспечивающим отличное по цвету свечение фона (посторонних примесей, клеточных элементов, гетерологичных микробов и т.п.). Перспективным для снижения неспецифической флуоресценции в препаратах является и метод окраски мазков Fab-фрагментами флуоресцирующих иммуноглобулинов без применения контрастирующих альбуминов.

Для индикации ПБА в исследуемых пробах в качестве основного следует применять прямой метод флуоресцирующих АТ. Непрямые модификации более трудоемки и требуют большей затраты времени. Их используют либо для выявления и титрования АТ в сыворотках крови людей и животных, либо для идентификации чистых культур возбудителей.

**Прямой МФА для специфической индикации ПБА:** для специфической индикации ПБА применяют прямой МФА в сочетании с контрастированием неспецифического свечения. С этой целью для окраски мазков используют смесь, состоящую из равных объемов специфических флуоресцирующих АТ, меченных флуоресцеин-5-изотиоцианатом (излучающим зеленый цвет), и контрастирующего альбумина нормальной сыворотки (лошадиной, бычьей, кроличьей), конъюгированного с родаминовым красителем (обладающим оранжевой люминесценцией). При окраске препаратов такой смесью специфический флуоресцирующий Ig сообщает зеленое свечение только гомологичному АГ, тогда как остальные компоненты препарата (тканевые элементы, гетерологичные микроорганизмы и их АГ, прочие примеси) приобретают способность светиться оранжево-красным цветом благодаря неспецифической физико-химической сорбции меченого альбумина.

**Непрямой МФА (НМФА):** в основе иммунофлуоресцентной серодиагностики (выявления и титрования специфических АТ в сыворотках крови) лежит применение непрямого метода флуоресцирующих антител как в модификации иммунофлуоресцентной окраски видовых сывороточных глобулинов, так и окраски комплемента морских свинок. При этом искомым в комплексе АГ + АТ + флуоресцирующий антисывороточный иммуноглобулин или АГ + АТ + комплемент + флуоресцирующий антикомплементарный глобулин являются АТ исследуемых сывороток людей или животных. Обработка мазков, содержащих заведомо известные микроорганизмы (диагностикумы), нисходящими разведениями исследуемых сывороток позволяет не только выявить специфические АТ, но и определить их титр.

При идентификации с помощью НМФА выделенных микроорганизмов используют наборы заведомо известных нефлуоресцирующих иммунных сывороток (иммуноглобулинов), которые берут для обработки мазков в различных (в зависимости от их активности) разведениях. Искомыми в этом случае оказываются АГ бактерий, риккетсий, хламидий или вирусов, содержащиеся в мазке и подлежащие идентификации.

*Идентификация микроорганизмов с помощью НМФА.* Для идентификации микроорганизмов с помощью НМФА необходимо располагать набором нефлуоресцирующих иммунных сывороток, специфичных в отношении различных бактерий, риккетсий или вирусов. Эти сыворотки используются на первом этапе обработки мазков, приготовленных из взвесей подлежащих идентификации микроорганизмов (клеточных культур, инфицированных вирусом). На втором этапе обработанные специфической сывороткой препараты докрашиваются антивидовым флуоресцирующим иммуноглобулином, гомологичным в отношении белков сыворотки, использованной на первом этапе (например, при обработке мазков на первом этапе специфической нефлуоресцирующей кроличьей сывороткой для второго этапа используют люминесцирующий иммуноглобулин к сывороточным глобулинам кролика). Техника люминесцентной микроскопии препаратов, окрашенных НМФА, аналогична применяемой при прямом варианте МФА.

Раньше неизбежное «выцветание» флуоресцентной метки при микроскопии было для МФА неотъемлемой и неразрешимой проблемой. Оно уменьшало популярность данного метода и способствовало более широкому применению других, нефлуоресцентных индикаторных систем для иммуноспецифического определения локализации антигенов. Позднее было описано применение парафенилендиамина, который значительно замедлял выцветание флуоресцентной метки, но был подвержен быстрому окислению на свету. Кроме того, он активно сенсibilизировал кожу. Более подходящий реагент – 1,4-дiazобизциклооктан (ДАБЦО). Он менее активно замедляет выцветание флуоресцентной метки, но более стабилен, дешевле, не сенсibilизирует кожу, не диссоциирует на ионы и может храниться без дополнительной защиты.

*Микроскопия.* Для получения правильных результатов МФА необходимо до начала исследования тщательно сцентрировать всю осветительную систему микроскопа и подобрать опытным путем оптимальную комбинацию первичных и запирающих светофильтров. При использовании флуоресцирующих Ig, меченных ФИТЦ, чаще всего применяют возбуждающие светофильтры СС-4, СС-8 или СЗС-7 в комбинации с запирающим светофильтром типа ЖС-18. Просмотр мазков под микроскопом рекомендуется проводить в отраженных лучах, падающих на мазок

через объектив. При иммунофлуоресцентном исследовании препаратов используют иммерсионные системы. При этом для выявления бактерий, риккетсий, грибов применяют масляную иммерсию (нефлуоресцирующее иммерсионное масло или диметилфталат). Для выявления вирусов в препаратах из клеточных культур или в мазках-отпечатках органов животных целесообразно использовать водно-иммерсионные системы). Специальное нефлуоресцирующее масло (в случае его отсутствия – диметилфталат или трис-глицериновую смесь) наносят перед микроскопией на мазок. При использовании водно-иммерсионной системы на окрашенные препараты предварительно наносят трис-глицериновую смесь, затем препарат накрывают покровным стеклом, на которое сверху наносят каплю дистиллированной воды. При просмотре таких мазков объектив микроскопа погружают в каплю воды. При микроскопии окрашенных препаратов обычно используют окуляры 7× или 5×.

Для получения достоверных результатов исследования рекомендуется рассматривать под микроскопом не менее 20–25 полей зрения в каждом мазке (если морфологически типичные возбудители встречаются почти в каждом поле зрения, можно ограничиться просмотром меньшего числа полей зрения). В мазках, приготовленных из жидкой фазы пробы, особое внимание следует обращать на края капли (мазка), где чаще концентрируются клетки возбудителя.

*Учет и оценка результатов.* При оценке результатов учитывают специфичность свечения и морфологию микроорганизмов. Специфически люминесцирующие микроорганизмы должны обладать характерной морфологией, иметь увеличенные размеры (по сравнению с их размерами в световом микроскопе) и более яркое свечение периферической части клетки. Неспецифическая флуоресценция характеризуется равномерным свечением всего тела клетки. Морфологические и структурные особенности микроорганизмов позволяют отчетливо дифференцировать их от бесструктурных люминесцирующих конгломератов, которые могут наблюдаться в препаратах.

Результаты МФА считаются положительными, если в мазке обнаруживаются хотя бы единичные (для мелких бактерий и риккетсий не менее 10 особей) морфологически типичные микроорганизмы либо пораженные вирусом (или риккетсиями) тканевые клетки (не менее 3–5 в препарате), специфически флуоресцирующие на 3–4 креста, при отрицательных контролях.

*Контрольные исследования при постановке МФА.* При исследовании любого неизвестного материала основным контролем специфичности являются все остальные мазки (препараты) данной пробы, которые оказались окрашенными гетерологичными по отношению к выяв-



ленному в пробе агенту флуоресцирующими иммуноглобулинами. Наряду с этим, МФА должен сопровождаться микроскопией препаратов, приготовленных из не содержащих микроорганизмы материалов (незараженные клеточные культуры, отпечатки органов здоровых животных) и окрашенных теми же специфическими люм. препаратами. Специфическая зеленая флуоресценция во всех контрольных мазках должна отсутствовать.

В заключение следует отметить, что методы, основанные на иммунофлуоресценции, не могут быть полностью стандартизованы. Многие детали методики, определяющие чувствительность, весьма переменны. Они включают, наряду с другими, свойства выбранного субстрата, активность реагентов, уровень фоновой флуоресценции, возможности микроскопа и квалификацию исследователя.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Метод флуоресцирующих антител

**Прямой МФА:** взаимодействие специфических АГ и АТ приводит к образованию комплекса АГ+АТ, выявляемого по флуоресцентной метке одного из компонентов в люминесцентном микроскопе.

Компоненты:

1) АГ – исследуемый материал, содержащий микробы, риккетсии, вирусы, грибки и т. п.;

2) АТ – флуоресцирующая иммунная сыворотка (иммуноглобулин) против определенного вида АГ;

3) разбавители: ЗФР рН 7,2–7,4, дистиллированная вода.

Материалы: нелюминесцирующее иммерсионное масло, забуференный глицерин (1 объем ЗФР рН 7,2–7,6 и 9 объемов глицерина), люминесцентный микроскоп, предметные и покровные стекла, пипетки, чашки Петри, емкость для промывки препаратов, длинный пинцет, сигнальные часы и прочее лабораторное оборудование.

**Техника постановки реакции.** На тщательно обезжиренное предметное стекло наносят каплю исследуемого материала и растирают бактериологической петлей для получения тонкого мазка. Из органов и тканей животных и секционного материала от людей делают, по возможности, тонкие мазки-отпечатки. Мазки подсушивают на воздухе и фиксируют 30 мин в этаноле, либо смеси Никифорова или охлажденном ацетоне. После фиксации препараты вновь подсушивают на воздухе.

Сухую люминесцирующую сыворотку растворяют в указанном на этикетке ампулы объеме дистиллированной воды. Непосредственно

перед окраской препаратов люминесцирующую сыворотку разводят ЗФР до рабочего разведения (указано на этикетке ампулы), которое предварительно перепроверяют. Для этого микроскопируют мазки из эталонных культур микроорганизмов (диагностикумов), окрашенных люм. сывороткой, взятой в разных разведениях (обязательно на 1–2 разведения выше и ниже рабочего титра, указанного на этикетке). Максимальное разведение сыворотки, которое обеспечивает яркое (на 4+ и 3+) флуоресцентное окрашивание микробных клеток, называют ее красящим титром. В качестве рабочего разведения сыворотки, используемого для окрашивания исследуемых препаратов, применяют удвоенный красящий титр. Например, если красящий титр сыворотки оказался 1 : 32, то ее рабочее разведение будет 1 : 16.

На фиксированный мазок наносят 1–2 капли люминесцирующей сыворотки в рабочем разведении. Препарат помещают во влажную камеру (чашку Петри, кювету с крышкой с увлажненной фильтровальной бумагой, ватой) при 37 °С на 30 мин или при комнатной температуре на 30–40 мин. Затем препарат промывают в 3 сменах ЗФР в течение 5–10 мин с последующим ополаскиванием в дистиллированной или проточной водопроводной воде в течение 1–2 мин. Препараты высушивают на воздухе в вертикальном положении, не применяя фильтровальную бумагу.

*Учет и оценка результатов.* Учет результатов проводят визуально на основе выявления морфологических особенностей и локализации возбудителя, а также оценки интенсивности и специфичности (структуры) его свечения. Оценка интенсивности специфической флуоресценции объекта проводят с учетом ее структурных особенностей по следующей шкале: «++++» – яркая сверкающая флуоресценция изумрудно-зеленого цвета, четко выявляются морфологические особенности микроорганизма, вокруг корпускулярных агентов может наблюдаться ярко светящийся ободок; «+++» – яркая флуоресценция зеленого цвета, морфологические особенности микроорганизма выявляются достаточно отчетливо, нередко хорошо видны периферические ободки; «++» – слабая флуоресценция желтовато-зеленого цвета, морфологические особенности микроорганизмов выявляются еще достаточно четко, периферические ободки почти не видны; «+» – очень слабая флуоресценция неопределенного цвета, микроорганизмы различаются с трудом; «–» – флуоресценция объекта отсутствует.

Положительным результатом считается люминесценция клеток на 4+ и 3+ при наличии не менее 3–5 специфически светящихся клеток в препарате.

### Прямой МФА для специфической индикации ПБА:

*Приготовление мазков.* На тщательно обезжиренное предметное стекло наносят каплю исследуемого материала и растирают бактериологической петлей для получения тонкого мазка. Из органов и тканей делают тонкие мазки-отпечатки. Мазки подсушивают на воздухе и фиксируют в течение 30 мин. в 96° этаноле, смеси Никифорова или охлажденном ацетоне. После фиксации препараты вновь подсушивают на воздухе (не обжигают) и подвергают окрашиванию. Для спорообразующих видов микроорганизмов фиксатором служит 96° этанол с 10 % формалина или с 3 % перекиси водорода.

*Окраска препаратов флуоресцирующими Ig:* на фиксированные и высушенные мазки наносят пипеткой рабочую смесь специфического флуоресцирующего иммуноглобулина и контрастирующего альбумина так, чтобы вся площадь мазка была покрыта конъюгатом. Обработку мазков проводят во влажной камере при 37 °С в течение 30 мин. Затем конъюгат смывают ЗФР, мазки дважды промывают по 10 мин ЗФР, после чего ополаскивают дистиллированной водой и высушивают при комнатной температуре.

До начала работы флуоресцирующие иммуноглобулины и контрастирующий альбумин растворяют дистиллированной водой в объеме, указанном на этикетке ампулы. К использованию пригодны лишь те конъюгаты, которые легко и без осадка растворяются в течение 1–2 мин. Растворенные препараты могут затем храниться при 2–4 °С в течение 2–3 недель, будучи плотно закрытыми. Окраску мазков производят так называемой рабочей смесью конъюгатов, которую готовят также заблаговременно, но срок ее хранения при 2–4 °С не должен превышать семи дней.

Важнейшим условием правильного составления рабочей смеси конъюгатов является оптимальный подбор в ней соотношения флуоресцирующего Ig, меченого ФИТЦ, и альбумина, меченого родамином. Эти соотношения для каждой новой партии флуоресцирующих конъюгатов подбирают опытным путем, поскольку указанные на этикетке ампулы рабочие разведения являются ориентировочными. Титрование флуоресцирующих конъюгатов целесообразно проводить на контрольных мазках, содержащих гомологичные флуоресцирующим иммуноглобулинам микроорганизмы или их АГ.

*Определение красящего титра контрастирующего альбумина.* Из цельного раствора альбумина, меченого родамином, готовят ряд двукратных разведений в стерильном ЗФР рН 7,2 от 1 : 2 до 1 : 128, наносят на контрольные «грязные» мазки (с посторонней микрофлорой)

и инкубируют во влажной камере при 37 °С в течение 30 мин. Затем мазки промывают дважды по 10 мин ЗФР, ополаскивают дистиллированной водой, подсушивают на воздухе и микроскопируют. В полевых условиях вместо ЗФР мазки можно промывать проточной водой, а затем ополаскивать дистиллированной водой. Последнее разведение контрастирующего альбумина, дающее оранжево-красное свечение микробных клеток в мазке на 1–2 креста, принимают за красящий титр. Соответственно рабочее разведение меченого альбумина будет в 2 раза выше красящего титра (табл. 4).

Таблица 4

**Пример титрования флуоресцирующего альбумина**

Препараты	Интенсивность свечения клеток в мазках при разведении альбумина						Красящий титр	Рабочее разведение
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128		
Мазок-отпечаток с тампона (смыв)	+++	+++	+++	+++	++	–	1 : 64	1 : 32
Мазок-отпечаток селезенки мыши	+++	+++	+++	++	–	–	1 : 32	1 : 16
Перевиваемые клетки амниона человека	+++	+++	+++	++	+	–	1 : 64	1 : 32

**Условные обозначения:**

«+++» – отчетливо выраженное оранжево-красное или красно-бурое свечение

«++» – красное свечение различных оттенков

«+» – серо-желтое (бурое) свечение

«–» – свечение отсутствует или видна аутолюминесценция

*Определение красящего титра специфических флуоресцирующих Ig в смеси с контрастирующим альбумином, меченым родамином.* Двукратные разведения испытуемого конъюгата специфических флуоресцирующих Ig смешивают с двойным рабочим разведением контрастирующего альбумина и окрашивают контрольные мазки, приготовленные из взвеси гомологичных микроорганизмов, как сказано выше. Последнее разведение, обеспечивающее яркое зеленое изумрудное специфическое свечение микробов на 3–4+ на оранжево-красном фоне препарата, является красящим титром испытуемого специфического Ig. Для дальнейшей работы смешивают в равных объемах удвоенные рабочие разведения альбумина и специфического флуоресцирующего Ig (табл. 5).

Таблица 5

**Пример титрования флуоресцирующего иммуноглобулина  
в присутствии альбумина**

Препараты	Характер флуоресценции	Интенсивность свечения при различных разведениях специфического конъюгата в смеси с альбумином, взятым в рабочем разведении 1 : 16					Красящий титр флуоресцирующего иммуноглобулина	Рабочее разведение иммуноглобулина в смеси с альбумином
		1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64		
Мазок из смыва	Специфическая зеленая	++	++++		+++	+	1 : 32	1 : 16
	Неспецифическая красная	+	++	++	++	++		
Мазок-отпечаток селезенки мыши	Специфическая зеленая	++++	++++	++++	+++	++	1 : 32	1 : 16
	Неспецифическая красная	+	++	++	++	++		
Монослой перевиваемых клеток амниона человека	Специфическая зеленая	++++	++++	++++	+++	+	1 : 32	1 : 16
	Неспецифическая красная	–	+	++	++	++		

**Примечание.** Красящий титр флуоресцирующего иммуноглобулина в этом примере равен 1 : 32. Однако для окраски мазков специфический конъюгат, как и контрастирующий альбумин, используется в рабочем разведении, которое должно быть в два раза концентрированное его красящего титра. Следовательно, рабочая смесь конъюгатов, выбранная на основании приведенных в данном примере результатов, должна состоять из разведенного 1 : 16 специфического флуоресцирующего иммуноглобулина и контрастирующего альбумина, взятого в разведении 1 : 16. Чтобы получить в рабочей смеси эти оптимальные соотношения, оба конъюгата должны быть сначала разведены 1 : 8, а затем смешаны в равных объемах.

## Непрямой МФА

*Подготовка мазков для проведения серологических анализов.* Мазки с заведомо известными микроорганизмами (бактериями, риккетсиями) готовят либо из стандартных корпускулярных АГ и диагностикумов (например, из корпускулярных антигенов для реакции агглютинации), либо из взвесей 1–2-суточных культур живых аттенуированных вакцин (EV, СТИ, туляреминой, бруцеллезной и др.). Для выявления противовирусных АТ используют пластинки с монослоем культуры клеток, инфицированных соответствующим вирусом. Взвеси из корпускулярных

АГ или живых культур вакцинных штаммов бактерий готовят на ФР концентрацией примерно 500 млн м.к./мл (по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Взвеси, приготовленные из сухих корпускулярных АГ, целесообразно предварительно выдержать в течение 2–4 ч при температуре 4–10 °С для более полной регидратации и только потом использовать их для приготовления мазков. Это снижает в ряде случаев неспецифическую сорбцию на АГ сывороточных протеинов и позволяет избежать ошибок при интерпретации результатов анализа. Мазки готовят на специальных графленых предметных стеклах со шлифованной поверхностью на одном конце (для маркировки стекла). Микробную взвесь (АГ) наносят на стекло тонкой пастеровской пипеткой (по 6–8 капель на каждом стекле). Затем мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре и фиксируют в течение 15 мин на холоде ацетоном или 96° этиловым спиртом. Мазки из микробной взвеси или корпускулярного АГ можно готовить впрок. При условии хранения при температуре не выше 0 °С они могут быть пригодны для использования в течение месяца. Монослой инфицированных вирусом клеточных культур, длительному хранению не подлежат и должны быть использованы в течение ближайших 2–3 дней.

*Подготовка исследуемых сывороток:* исследуемые с помощью НМФА сыворотки людей и животных какой-либо предварительной специальной обработке не подвергаются. Их инактивацию проводят путем прогревания при 56 °С в течение 30 мин. Для определения титра специфических АТ испытуемые сыворотки разводят ФР в пределах от 1 : 10 до 1 : 1280 и более (в случае необходимости). Используемые контрольные сыворотки (заведомо нормальная или гетерологичная содержащимся в мазке антигенам) берут в разведении 1 : 20 – 1 : 40.

*Подготовка антивидовых флуоресцирующих иммуноглобулинов.* При выявлении АТ в сыворотках крови с помощью НМФА используют (в зависимости от применяемой кодификации метода) либо антивидовые флуоресцирующие иммуноглобулины, гомологичные белкам исследуемой сыворотки, либо флуоресцирующие иммуноглобулины к комплементу морской свинки. Сухие конъюгаты растворяют дистиллированной водой в объеме, указанном на этикетке ампулы (обычно в 0,5 мл). К использованию годны лишь те конъюгаты, которые легко и без осадка растворяются в течение 1–2 мин. Для обработки мазков готовят рабочие смеси, состоящие из равных объемов флуоресцирующего антивидового (антикомплементарного) иммуноглобулина и контрастирующего альбумина, взятых в рабочих разведениях. Поскольку указанные на этикетках ампул рабочие разведения флуоресцирующих конъюгатов являются ориентировочными, рекомендуется предвари-

тельно (для каждой новой серии препаратов) определить их красящий титр и рабочее разведение. Методика титрования конъюгатов и выбора оптимальных соотношений при составлении рабочей смеси аналогична используемой при подготовке препаратов для прямого варианта МФА.

При титровании антивидового (антикомплементарного) флуоресцирующего иммуноглобулина на первом этапе обработки мазков используют заведомо положительную (гомологичную содержащемуся в мазке АГ) нефлуоресцирующую сыворотку в разведении 1 : 5 – 1 : 10.

*Техника титрования исследуемых сывороток.* Исследование сывороток с помощью НМФА включает в себя два этапа обработки мазков, содержащих заведомо известные микроорганизмы (АГ). На первом этапе в зависимости от избранной модификации метода на мазки наносят последовательные двукратные разведения испытуемых сывороток (иммунофлуоресцентная окраска сывороточных иммуноглобулинов) или смеси равных объемов комплемента морской свинки, взятого в разведении 1 : 10 (сухой комплемент) или 1 : 20 (свежий, жидкий комплемент), и последовательных двукратных разведений испытуемой сыворотки (иммунофлуоресцентная окраска комплемента). При нанесении и распределении по мазку соответствующих разведений сыворотки (или их смесей с комплементом) не следует допускать их слияния и перемешивания. Мазки с нанесенными на них разведениями сыворотки инкубируют 20 мин во влажной камере при температуре 37 °С, затем в течение нескольких секунд промывают под легкой струей воды, отмывают в двух сменах (по 10 мин каждая) ЗФР и ополаскивают дистиллированной водой. После отмывки препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре. На втором этапе окраски на высохшие мазки наносят по капле рабочей смеси соответствующего антивидового (антикомплементарного) флуоресцирующего иммуноглобулина и контрастирующего альбумина. Мазки вновь выдерживают 20 мин во влажной камере при температуре 37 °С. После этого с мазков стряхивают остатки смеси конъюгатов, отмывают в двух сменах (по 10 мин каждая) буферного раствора и споласкивают дистиллированной водой. В полевых условиях вместо ЗФР мазки можно промывать 10 мин проточной водой, а затем ополаскивать дистиллированной водой. Окрашенные мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре.

*Учет и оценка результатов микроскопии.* О наличии специфических антител в исследуемых сыворотках (серодиагностика) судят по степени яркости свечения микроорганизмов в окрашенных препаратах. За титр сыворотки принимают то наибольшее ее разведение, которое еще обеспечивает свечение гомологичных микроорганизмов интенсивностью не менее чем на 2 креста при отрицательных результатах

в контроле. При оценке диагностического значения положительных результатов, анализа обращают внимание не только на высоту титра обнаруженных АТ, но и на динамику их нарастания при исследовании парных сывороток. Повышение титра АТ в сыворотках, взятых повторно через 7–10 дней, указывает на инфекционный процесс. Отсутствие динамики может свидетельствовать об анамнестическом характере выявленных АТ. При идентификации с помощью НМФА выделенных микроорганизмов о видовой (групповой) принадлежности последних судят по результатам титрования заведомо известных диагностических сывороток. Гомологичные микроорганизмы реагируют со специфическими сыворотками в максимальном разведении, близком к их титру.

*Контрольные исследования.* Контрольные исследования при иммунофлуоресцентной серодиагностике предусматривают: 1) исследование препаратов, обработанных на первом этапе заведомо, «отрицательной» сывороткой и докрашенных соответствующим ей антивидовым флуоресцирующим иммуноглобулином; 2) исследование препаратов, обработанных непосредственно (без первого этапа) смесью флуоресцирующего антивидового иммуноглобулина с контрастирующим альбумином. В обоих случаях специфическая флуоресценция должна отсутствовать.

При иммунофлуоресцентной идентификации выделенных микроорганизмов препараты обрабатывают на первом этапе серией нефлуоресцирующих специфических сывороток, а затем докрашивают соответствующими рабочими смесями конъюгатов. Специфическое свечение при этом может наблюдаться лишь в одном из окрашенных препаратов, а именно в обработанном на первом этапе гомологичной изучаемому агенту сывороткой. Все остальные препараты являются контрольными. Специфическая флуоресценция в них должна отсутствовать

***Контрольные вопросы:***

1. *Принцип МФА, характеристика основных флуорохромов*
2. *Прямой МФА*
3. *Прямой МФА для специфической индикации ПБА*
4. *Непрямой МФА*

## **ВАРИАНТЫ ИММУНОСОРЕБЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ТВЕРДОЙ ФАЗЕ**

Твердофазные методы исследования предполагают использование твердой фазы в качестве основы для сорбции на ней иммунных реагентов: АТ (АГ). Все этапы реакции протекают на границе 2-х фаз: твердой и жидкой. Не прореагировавшие компоненты удаляются с помощью



отмывания. Чувствительность этих методов превышает аналогичный показатель агглютинационных реакций.

**Иммуноэритроадсорбционный метод (ИЭАМ).** Принцип иммуноэритроадсорбционного метода обнаружения АГ (АТ) состоит в том, что специфические АТ (АГ), адсорбированные на стенках U-образной лунки твердой фазы, специфически взаимодействуют с искомым АГ (АТ), а последний затем иммунологически связывается со специфическими АТ (АГ), мечеными эритроцитами. Меченые эритроцитами АТ (АГ), вступившие во взаимодействие с АГ (АТ), остаются на стенках иммуносорбента (с образованием регистрируемого визуально «зонтика»), при отсутствии АГ (АТ) в исследуемом материале эритроциты под действием силы тяжести скатываются на дно лунки, формируя «пуговку». В качестве твердой фазы в ИЭАМ используют 60-луночные микрокамеры с объемом лунок 20 мкл – камеры Терасаки (рис. 22). Используемые в ИЭАМ эритроцитарные конъюгаты могут также применяться в РПГА в качестве антительного (антигенного) диагностикума.

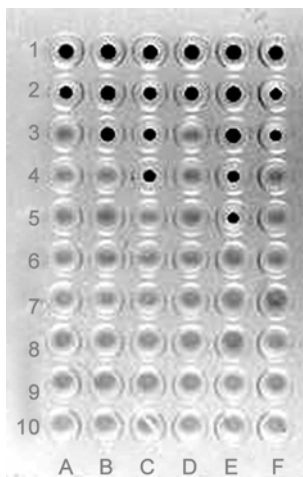


Рис. 22. Камера Терасаки с результатами реакции в ИЭАМ

**Радиоиммунный анализ (РИА)** – метод, в котором в качестве маркера АТ (АГ) используются радионуклиды –  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  и т.д. После взаимодействия АГ с АТ отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (бета- или гамма-излучение): при этом интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул АГ или АТ.

**Иммуноферментный анализ (ИФА). ИФА (ELISA)** – (от англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – метод, в котором в качестве маркеров АТ (АГ) используют ферменты. Благодаря простоте и высокой чувствительности твердофазные иммуноферментные системы удобны для выявления АГ, АТ и иммунных комплексов. Проблемы специфичности ИФА по характеру и сложности те же, что и у других иммунологических методов. Они могут быть сведены к минимуму путем постоянного контроля качества реагентов и стандартизации методических приемов. Применение в ИФА моноклональных антител, обладающих строго определенной специфичностью и одинаковой аффинностью, позволяет повысить качество исследований (специфичность).

Твердофазными носителями для проведения ИФА могут быть различные материалы. В ранних разработках, как правило, использовали пластмассовые пробирки, на смену которым быстро пришли панели для титрования с лунками, имеющими плоское прозрачное дно, и удобные для измерения оптической плотности продуктов реакции на специальных приборах – ИФА-ридерах (от англ. *to read* – читать). Последние модификации в качестве твердой фазы предусматривают использование палочек и шариков, а также нитроцеллюлозных мембран, активно сорбирующих белки. Модификация с использованием мембран получила название «дот»-ИФА. Планшетный вариант ИФА на протяжении еще многих лет останется наиболее распространенным для решения большинства научных и прикладных задач.

**Основные принципы твердофазного ИФА.** Возможность проведения иммуноферментного анализа независимо от его модификации основана на следующих четырех принципах.

1. Различные ферменты, наибольшее распространение из которых получили пероксидаза хрена (ПХ) и щелочная фосфатаза (ЩФ), можно ковалентно присоединить к АГ или АТ различными химическими методами в таких условиях, когда оба компонента конъюгата сохраняют свою биологическую активность (способность взаимодействовать с субстратом и антигенсвязывающую активность).

2. Большинство АГ, в том числе белки, пептиды, полисахариды и бактериальные липополисахариды, самопроизвольно сорбируются на поверхности пластика. АТ, будучи белками, тоже сорбируются на пластике и при этом сохраняют антигенсвязывающую активность. Именно на этом принципе основан первый этап реакции, заключающийся в «сенсibilизации» панелей АГ или АТ. Адсорбированные на твердой фазе АГ и АТ уже не смываются буфером, содержащим детергент, тогда как не связавшиеся реагенты легко удаляются отмыванием.

Таблица 6

## Ферменты и субстраты к ним

Фермент	Конъюгирующий реагент	Растворимый субстрат	Рекомендуемая длина волны при фотометрии	Нерастворимый субстрат
Пероксидаза хрена (ПХ)	1. Глутаральдегид (двухэтапный метод) 2. Мета-периодат натрия 3. N-сукцинимидил – 3 (2-пиридилдитно) пропинат (СПДП)	Орто-фенилдиаминдигидрохлорид (ОФД) Тетраметилбензидин 2,2'-азино-ди (3-этил) бензотиазолсульфоновая кислота (АБТС) 5-Аминосалициловая кислота (АСК)	492 450 650 (и 405 после установившейся реакции) 450	диаминобензидин 4-хлоро-1-нафтол 3-амино-4-этилкарбазол (АЭК)
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	Глутаральдегид (одноэтапный метод)	N-л-нитрофенилфосфат щелочной (ПНФФ)	402–412	Нафтол As-пх фосфат + диазоль синий 2С (НАФДС) Нафтол As-пх фосфат + диазоль красный TR (НАФДК) 5-бromo-4-хлоро-3-водил-фосфат (БХНФ)
β-галактозидаза (β-Г)	Мета-малеимидобензол – N-гидроксисукцинимидный эфир (МБГС)	Орто-нитрофенил-β-D галактозид (ОНФГ)	420	
Уреаза	Глутаральдегид (одноэтапный метод)	Бромкрезоловый пурпурный (БП)	558	
Пенициллиназа	Глутаральдегид (одноэтапный метод)	Иод и крахмал	Визуальный учет обесцвечивания синей окраски	

3. В «сенсibilизированных» лунках инкубируют исследуемый образец и стандартные реагенты. При этом на поверхности твердой фазы формируются иммунные комплексы, состоящие из одного или нескольких слоев. Не связавшиеся компоненты на каждом этапе удаляют отмыванием, что позволяет добиться высокой специфичности анализа в реакции входящего в состав конъюгата фермента с индикаторным субстратом.

4. При связывании конъюгата АТ = фермент или АГ = фермент с иммобилизованным иммунным комплексом активный центр фермента остается доступным для взаимодействия с субстратом. Инкубация субстрата в лунках с иммобилизованным конъюгатом приводит, как правило, к развитию цветной реакции. Эту реакцию останавливают на нужной стадии, а выраженность окрашивания оценивают визуально, сравнивая со стандартами, или инструментально по оптической плотности. Некоторые варианты метода, например «дот»-ИФА и «метод индикаторной полоски», предполагают окрашивание самой твердой фазы. В этих случаях используют хромогенные субстраты, дающие продукты в виде нерастворимых, иммобилизованных на твердой фазе окрашенных преципитатов (табл. 6).

### **Методические варианты ИФА для определения антител и антигенов**

Для выявления и количественного определения АТ и АГ используют различные модификации ИФА с сенсibilизацией твердой фазы соответствующим иммунным реагентом.

### **«Сэндвич»-вариант ИФА для определения АГ и иммунных комплексов**

Благодаря методической простоте, специфичности и высокой чувствительности широкое распространение получил так называемый «сэндвич»-вариант ИФА. Его несложно модифицировать в «дот»-ИФА. В соответствии со схемой данного варианта анализа АТ (лучше моноклональные или высокоаффинные), адсорбированные на твердой фазе, инкубируют с исследуемым образцом (а также с положительным и отрицательным контрольными образцами и разведениями стандартного АГ). После отмыwania в лунки вносят меченные ферментом АТ к тому же АГ и далее раствор субстрата к используемому в конъюгате ферменту. Через определенное время развившуюся цветную реакцию останавливают ингибитором фермента.

### **Непрямой ИФА для выявления АТ**

Этот вариант ИФА наиболее удобен для повседневного анализа образцов сывороток на наличие специфических АТ. Для проведения анализа в лунках панелей адсорбируют АГ (экстракт из бактерий, паразитов или

вирусов), далее в них инкубируют образцы сывороток или другого материала (например, молока, слюны, спинномозговой жидкости). Специфические АТ, связавшиеся с сенсibilизированными АГ, выявляют с помощью антиглобулиновых антител, либо стафилококкового белка А, меченых ферментом. Стафилококковый белок А = Ф является универсальным конъюгатом, с помощью которого можно исследовать на наличие специфических АТ сыворотки крови людей и любых видов животных (кроликов, мышей, баранов, лошадей и т.д.). Визуализация реакции происходит при добавлении в лунки соответствующего ферменту раствора субстрата.

Для постановки ИФА важное значение имеют следующие моменты:

1. *Панели для ИФА и их способность адсорбировать АТ или АГ.* Полистироловые и полихлорвиниловые панели, выпускаемые различными производителями, могут сильно различаться по способности адсорбировать иммунные реагенты. Серьезные различия возможны и между отдельными партиями панелей одной марки. Лучше всего использовать высококачественные панели, предназначенные специально для ИФА. В этом случае «краевые» эффекты и различия в адсорбционной способности между отдельными планшетами и партиями сведены к минимуму, а оптические свойства лунок обеспечивают высокую точность учета результатов.

2. *Оптимальная концентрация АТ или АГ для сенсibilизации панелей.* Подбор оптимальной концентрации АТ или АГ для сенсibilизации панелей – один из наиболее ответственных этапов в ИФА. От него во многом зависят результаты проведения анализа. Сенсibilизация панелей недостаточным количеством АТ или АГ снижает чувствительность анализа и создает условия для неспецифической адгезии конъюгата непосредственно на пластике, неэкранированном сенситином. Это приводит, в конечном счете, к повышению фонового уровня реакции и неверной оценке результатов. Сенсibilизация чрезмерным количеством АТ или АГ может привести к неспецифическому связыванию реагентов с иммобилизованным сенситином.

3. *Неспецифическое связывание и свойства конъюгата.* Для высокочувствительного ИФА необходимо использование конъюгатов с возможно более высоким соотношением между уровнем сигнала (положительный результат) и шума (фоновый уровень). Высокое неспецифическое связывание может быть вызвано большими размерами полимеров конъюгатов. Для этого целесообразно использовать не концентрированные растворы конъюгатов, а разведенные до рабочего титра. Кроме того, неспецифическое связывание удастся уменьшить, блокируя ответственные за этот процесс участки твердой фазы слабым раствором инертного белка в буфере для сенсibilизации. С этой целью обычно рекомендуют бычий сывороточный альбумин (БСА). После сенсibilизации твердой

фазы соответствующими иммунными реагентами раствор БСА инкубируют в лунках панелей (30-45 мин) при комнатной температуре. Панели затем отмывают и проводят последующие этапы анализ.

4. *Свойства субстрата.* Ортофенилендиамин (ОФД), применяемый в качестве субстрата для ПХ, светочувствителен и на свету в смеси с перекисью водорода ( $H_2O_2$ ) спонтанно окрашивается в желтый цвет. Поэтому субстрат готовят непосредственно перед постановкой реакции в сосуде, полностью обернутом фольгой. Панели после внесения раствора субстрата инкубируют в темноте. Реакцию следует остановить в тот момент, когда оптическая плотность (ОП) положительного контроля достигнет оптимального уровня при отсутствии окрашивания в отрицательных образцах. Для обеспечения стандартности результатов необходимо точно знать время оптимального развития цветной реакции и температуру ее проведения.

5. *Хранение сенсibilизированных панелей.* Панели, сенсibilизированные АТ и некоторыми АГ, после отмывания и тщательного высушивания можно хранить в герметичной упаковке с вложенным влагопоглотителем (гранулами силикагеля) при температуре 4 °С. Устойчивость разных АГ к высушиванию и хранению после иммобилизации на пластике неодинакова.

#### **Интерпретация результатов ИФА**

*При визуальной оценке.* Интенсивность окрашивания в лунках с отрицательными контролями должна быть низкой. Ее оценивают как отрицательную (-) или неопределенную ( $\pm$ ). В тех лунках, где прошла положительная реакция, степень окрашивания оценивают по четырехбалльной шкале: от 4+ до 1+. Образцы, при титре которых получены неясные пограничные результаты, необходимо исследовать вновь в меньших разведениях, проводя повторно отрицательные контроли.

*При спектрофотометрической оценке.* Оценка результатов по пороговому уровню реакции. В простейшем случае результат считают положительным, если ОП исследуемого образца превышает максимальную ОП в лунках с отрицательными контролями.

#### **Варианты твердофазного иммуноферментного анализа**

Известно несколько методических вариантов ИФА, различающихся по типу твердой фазы.

##### **ИФА на стрипах**

ИФА обычно проводят в планшетах для микротитрования. Помимо целых панелей выпускаются и отдельные полоски (стрипы) с одним рядом лунок, из которых затем можно собрать панель необходимого размера и добиться таким образом экономии оборудования. Результаты анализа в таких сборных панелях учитывают визуально или на обычном ИФА-ридере.

### **ИФА со стержнями**

Эта модификация заключается в том, что в каждую лунку панели погружают стержень, сенсibilизированный АГ или АТ. Таким образом, иммунные комплексы формируются на стержнях, а окрашивание растворимого субстрата обычно происходит в лунках. Результаты реакции учитывают так же, как и при традиционном ИФА в панелях. Вместо растворимого субстрата при осуществлении данного варианта ИФА можно использовать нерастворимый – в этом случае окрашивание регистрируют на «стержнях». Такой вариант, однако, менее удобен для точного количественного учета.

### **ИФА в кюветах**

Кюветы имеют больший объем по сравнению с лунками панелей и, следовательно, большую адсорбционную емкость, а также оптически прозрачные боковые стенки для измерения ОП на специальном ридере с горизонтальным направлением луча, что позволяют достичь более высокой чувствительности анализа. Однако данный вариант ИФА более дорогой, так как из-за больших объемов кювет происходит значительный расход реагентов. ИФА в кюветах применяют главным образом для проведения одноэтапного гомогенного анализа низкомолекулярных веществ.

### **ИФА с нейлоновыми нитями или бусами**

Нити или шарики помещаются в лунки планшета и используются в качестве твердой фазы. Благодаря увеличению площади связывания иммунных реагентов повышается чувствительность ИФА, однако возникают большие неудобства при постановке анализа, в частности, при проведении процедур отмывания от не связавшихся компонентов.

### **Дот-ИФА**

ИФА можно проводить на листах или узких полосках мембран, обладающих адсорбционной активностью, в частности нитроцеллюлозной, с применением нерастворимого субстрата. Лучшими реагентами для тест-систем, основанных на данной модификации, служат высокоаффинные моноклональные антитела. Методика точечной реакции на нитроцеллюлозной мембране получает все более широкое распространение под названием «дот»-ИФА. При осуществлении «дот»-ИФА АГ (АТ) в очень небольшом объеме ~ 1–2 мкл адсорбируют в виде пятен на нитроцеллюлозной мембране (рис. 23).

В качестве диагностикума в дот-ИФА используется тот же ферментный конъюгат, что и в планшетном варианте. Однако ферментные метки имеют ряд недостатков: значительная потеря активности фермента и лиганда в процессе получения конъюгата; необходимость хранения самого фермента и препаратов на его основе при низких температурах или в консерванте; подверженность результатов анализа влиянию в исследуемом образце примесей, способных инактивировать фермент

или провоцировать спонтанную реакцию; токсичность отдельных компонентов проявляющей системы.

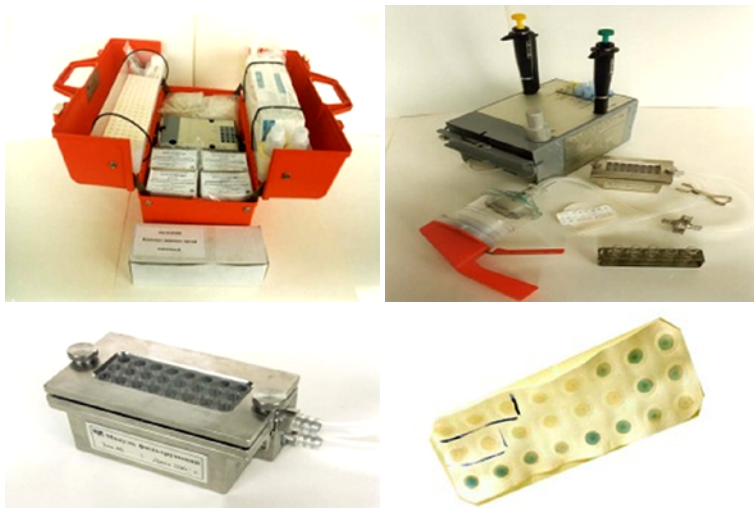


Рис. 23. Комплект для дот-ИФА

В связи с этим все более широкое распространение в настоящее время приобретают в качестве альтернативы ферментным меткам неорганические хромогенные маркеры: металлы - платина, золото, серебро, медь, кобальт, железо, палладий и неметаллы - селен, теллур, сера, кремний, углерод и др. Преимуществом указанных меток являются простота получения коллоидных частиц, связывание золя с иммунореактантами щадящим сорбционным способом, стабильность в относительно широком диапазоне физико-химических условий, безопасность для здоровья персонала (рис. 24)

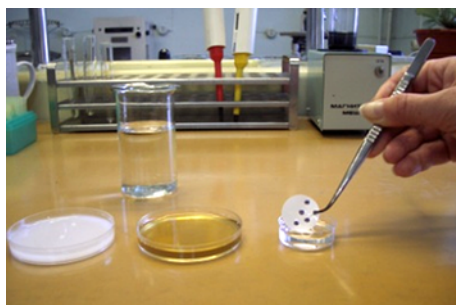


Рис. 24. Этапы постановки дотиммуноанализа с коллоидным серебром



**Иммунохроматография.** Иммунохроматографический метод анализа, появившийся в конце 1980-х годов (Zuk R.F. *etc.*, 1978), хорошо зарекомендовал себя как экспресс-метод выявления возбудителей инфекционных заболеваний и токсинов. Небольшое время анализа (несколько минут), отсутствие промежуточных стадий подготовки образца, возможность визуальной регистрации результатов анализа, высокая специфичность метода и достаточно высокая чувствительность делают его весьма привлекательным (рис. 25).



Рис. 25. ЭКСПРЕСС-ТЕСТЫ: Singlepath & Duopath

Принцип работы Singlepath показан на рисунке 26

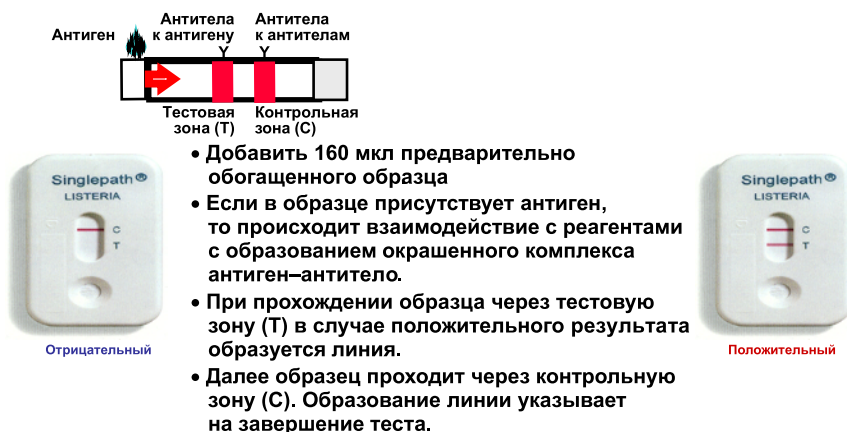


Рис. 26. Принцип действия Singlepath

На основе иммунохроматографического (ИХ) метода с использованием частиц коллоидного золота разработаны иммунохроматографические индикаторные элементы для выявления спор сибирской язвы, возбудителей чумы, туляремии, сапа, холеры, ботулинического токсина типа А и других инфекционных болезней. Создана производственная техноло-

гическая линия на базе Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии. Прошли процесс госрегистрации в ФС Росздравнадзора РФ иммунохроматографические индикаторные тест-системы для лабораторной диагностики чумы (2), туляремии, сибирской язвы (споры). Данные наборы тест-систем выпускаются в виде хаузенг-стрипов (индивидуальная пластиковая упаковка для каждого анализа) или готовых к использованию мембранных ИХ-полосок, упакованных по 10 20 штук в пластиковую пробирку (рис. 27, 28).

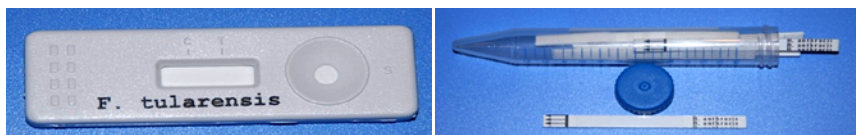


Рис. 27. Внешний вид иммунохроматографических индикаторных тест-систем



Рис. 28. Внешний вид иммунохроматографических индикаторных тест-систем

ИХ – простой и удобный метод определения патогенных микроорганизмов, в отличие от традиционного ИФА, не требующий проведения процедур отмывки и других манипуляций. Основная проблема практического использования ИХ-тестов связана с повышением их чувствительности. С этой целью проводятся исследования по использованию систем концентрирования образца с применением магнимоносорбентов, иммунофльтрации, а также использованию флуоресцентных маркеров иммунных реагентов с соответствующей детекцией флуоресценции специальными индикаторами. Параллельно идут исследования по разработке детектирующего оборудования для документирования результатов и программного обеспечения ИХ-исследований.

### **Мультиплексный фосфоресцентный микроанализ**

Современные тенденции в развитии методов лабораторной диагностики инфекций связаны с повышением не только чувствительности

и специфичности, но и мультиплексности разрабатываемых тестов, то есть возможности одновременного определения нескольких маркеров в одной пробе без разделения последней на отдельные порции. Создание таких тестов является актуальным в связи с существованием «сочетанных» природных очагов и «смешанных» инфекций и составляет основу разработки комплексного подхода к одновременному выявлению всего спектра потенциально возможных заболеваний при проведении скрининговых сероэпидемиологических исследований эндемичных территорий. Для реализации такого подхода возможно использование диагностической технологии на основе фосфоресцентного мультикомпонентного микроанализа (ФОСФАН). В настоящее время разработана биочип-технология ФОСФАН для индикации возбудителей особо опасных инфекций (рис. 27).

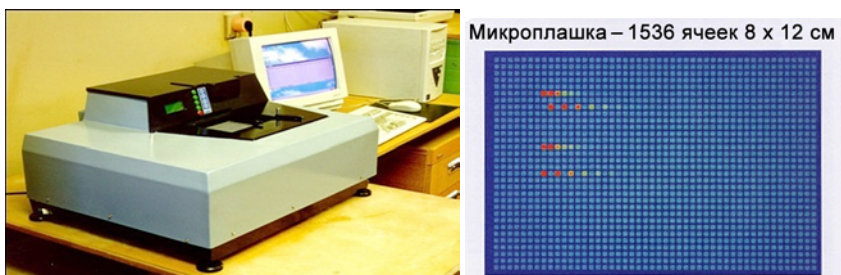


Рис. 29. Фосфоресцентный микроанализатор ФОСФАН

В отличие от иммуночипов, формируемых на стекле, предлагаемый подход позволяет одновременно анализировать до 96 образцов и использовать для анализа стандартное оборудование (шейкеры, промыватели и т.п.). Комплект состоит из индикатора фосфоресценции (ИФИС), укладки для отбора проб и набора реагентов (тест-систем) для обнаружения и идентификации возбудителей сибирской язвы, чумы, туляремии, венесуэльского энцефаломиелиита лошадей, заболеваний ортопоксвирусной природы, Крымской геморрагической лихорадки, сыпного тифа, клещевой пятнистой лихорадки, токсинов ботулинического типа А и стафилококкового типа В. Принцип построения индикационных тестов универсален. На твердой фазе дна лунки полистиролового микропланшета сорбируют в виде отдельных микрозон специфические АТ. Формирование микрозон осуществляется контактным способом с помощью роботизированных наноплоттеров. Стадии анализа включают инкубацию анализируемой пробы в лунках микропланшета, промывку лунок для удаления не связавшихся компонентов реакции, биоспецифическое связывание выявляемого в пробе патогена или его

АГ с индикаторными АТ, конъюгированными с биотином. «Проявление» реакции осуществляют с помощью универсального фосфоресцирующего реагента - конъюгата стрептавидина с Рт копропорфирином. Сигнал фосфоресценции регистрируют при последовательном сканировании отдельных участков дна лунки микропланшета светодиодом с длиной волны излучения 380 нм. Чувствительность системы детекции составляет около  $10^6$  молекул Рт копропорфирина в освещаемой площадке сканирования диаметром около 1 мм. Результаты сканирования регистрируют как число фотоимпульсов от каждой из микрозон. После компьютерной обработки графическая картина распределения сигнала в микрозонах представляется в виде объемных цветных гистограмм или окрашенных пятен. Интенсивность сигнала в виде цветовой шкалы отражает концентрацию патогена в исследуемой микрозоне.

В ходе анализа обеспечиваются требования противоэпидемического режима. Индикатор фосфоресценции размещается в боксированной зоне и управляется радиосвязью через персональный компьютер. После завершения иммунной реакции адсорбированный биоматериал сохраняет стабильный уровень фосфоресценции в течение нескольких месяцев. Это позволяет архивировать микропланшеты и, при необходимости, осуществлять повторное измерение сигнала. Технология ФОСФАН сочетает преимущества твердофазного микропланшетного сэндвич-иммуноанализа с потенциалом биочип-технологий. По сравнению с классическими схемами твердофазного ИФА она имеет ряд очевидных преимуществ благодаря возможности осуществления мультикомпонентного анализа. Микропланшетный формат выгодно отличает ее и от традиционных биочип-технологий на слайдах. Это обусловлено более благоприятными условиями для дозирования проб и реагентов и, как следствие, возможностью создания количественных тестов и многократного повышения производительности лабораторных исследований. Следует также добавить ряд важных экономических моментов, создающих очевидные конкурентные преимущества для данной технологии: уменьшение расхода АТ, используемых для сорбции на твердой фазе (почти в 100 раз); снижение расхода иммунореагентов (конъюгатов, биотинилированных АТ и стрептавидина) в 5–10 раз за счет обработки только дна лунок микропланшета. Благодаря высокой стабильности фосфоресцентной метки, дополнительным преимуществом метода является возможность отсроченного и (или) повторного измерения результатов анализа биоматериала в высушенных и герметично упакованных планшетах, которые могут храниться в архиве в течение длительного периода времени (месяцев, лет).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

### Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

#### Сэндвич-вариант ИФА для обнаружения АГ

Принцип метода. Взаимодействие АГ с АТ, меченым ферментом. Учет реакции осуществляется измерением ферментативной активности реакционной смеси, что дает возможность оценить количество искомого АГ в исследуемых образцах. Высокая чувствительность ИФА связана с каталитическими свойствами ферментов, одна молекула которых может реагировать с большим количеством (несколько тысяч) молекул субстрата.

Компоненты:

- 1) исследуемый материал, содержащий АГ
- 2) ЗФР pH 7,2, содержащий 1 % БСА;
- 3) специфические АТ;
- 4) конъюгат специфических АТ, меченых ферментом (в рабочем разведении)
- 5) раствор субстрата;
- 6) 0,05 М карбонатно-бикарбонатный буфер pH 9,6 (КББ);
- 7) разводящий и отмывающий раствор – ЗФР pH 7,2, содержащий 0,05 % твин-20 (ЗФР-тв);
- 8) ингибитор реакции фермент-субстрат.

Материалы: планшеты для ИФА, автоматические микропипетки объемом 100 мкл, наконечники, диспенсер или градуированные пипетки на 10 мл.

Реактивы: а) 0, М КББ pH 9,6: 5,25 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и 4,2 г  $\text{NaHCO}_3$  доводят дистиллированной водой до объема 1 л. На 1 л  $\text{NaHCO}_3$  требуется 300 мл  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Хранят в холоде не более 2 недель.

б) ЗФР pH 7,2: 8 г  $\text{NaCl}$ , 0,2 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 г  $\text{KCl}$  и 2,9 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 1 л дистиллированной воды, pH доводят  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

в) отмывающий раствор: к 100 мл ЗФР pH 7,2 добавляют 50 мкл Твина-20.

г) 1%-й БСА: в 100 мл ЗФР pH 7,2 растворяют 1 г БСА

д) субстрат: 10 мг дианизидина или диаминобензидина растворяют в 1 мл метанола, добавляют последовательно 99 мл дистиллированной воды и 0,1 мл 3%-ной перекиси водорода. Раствор должен оставаться прозрачным. Готовить в химически чистой посуде!

е) Стоп-реагент: 3%-й азид натрия: В 100 мл дистиллированной воды растворяют 3 г азид натрия.

Материал для исследования в ИФА обрабатывается так же, как для гемагглютинационных методов исследования.

*Техника проведения анализа.* Подготовка твердой фазы: в каждую лунку двух вертикальных рядов микропланшета вносят по 100 мкл специфического к искомому АГ иммуноглобулина концентрацией 50 мкг/мл в 0,05 М КББ рН 9,6, закрывают крышкой и помещают в термостат при 37 °С на 2–3 ч, либо на 16–18 ч в холодильник при 4 °С. Перед постановкой реакции раствор АТ из лунок сливают в дез. раствор и трижды отмывают ЗФР-тв, оставляя отмывающий раствор в лунках каждый раз на 2–3 мин. После заключительного отмывания микропланшет встряхивают для избавления от капелек отмывающей жидкости и слегка подсушивают на воздухе. Далее в сенсibilизированные антителом лунки вносят по 100 мкл 1 %-ного раствора БСА для забивки возможных оставшихся свободных участков на твердой фазе, выдерживают 30 мин при 37 °С, после чего планшет освобождают от раствора инертного белка и трижды промывают ЗФР-тв. Отмывающую жидкость удаляют, в каждую подготовленную лунку вносят по мкл ЗФР-тв, затем в 3-ю лунку первого вертикального ряда добавляют 100 мкл исследуемого материала и титруют в объеме 100 мкл, перенося из 1-й лунки во 2-ю, из 2-й в 3-ю и т.д. до 7-й лунки второго вертикального ряда включительно, из которой 100 мкл раствора раститрованного АГ удаляют в дез. раствор. 8-я лунка второго вертикального ряда – положительный контроль – заведомо известное количество положительного АГ. Первые две лунки первого вертикального ряда – отрицательный контроль – гетерологичный АГ, либо суспензия органов от здоровых животных, или иной материал, не содержащий специфический АГ. После часовой инкубации при 37 °С содержимое лунок удаляют в дез. раствор и трижды отмывают ЗФР-тв, как сказано ранее. Затем во все лунки добавляют по 100 мкл рабочего разведения раствора конъюгата (специфические АТ = Фермент). Инкубируют 1 ч при 37 °С, трижды отмывают ЗФР-тв. После заключительного отмывания в каждую лунку вносят по 100 мкл раствора субстрата. Реакцию проводят 15–30 мин при комнатной температуре, после чего в каждую лунку добавляют по 1 капле стоп-реагента. При положительном результате в лунках развивается оранжево-коричневое окрашивание. В отрицательном – раствор прозрачен.

### **Непрямой вариант ИФА для обнаружения АТ**

*Техника проведения анализа.* Подготовка твердой фазы: в каждую лунку двух вертикальных рядов микропланшета вносят по 100 мкл раствора АГ концентрацией 50 мкг/мл в 0,05 М КББ рН 9,6, закрывают крышкой и помещают в термостат при 37 °С на 2–3 ч, либо на 16–18 ч в холодильник при 4 °С. Перед постановкой реакции раствор АГ из лунок удаляют в дез. раствор и трижды отмывают ЗФР-тв, оставляя отмывающий раствор в лунках каждый раз на 2–3 мин. После заключительного отмывания

микропланшет встряхивают для избавления от капелек отмывающей жидкости и слегка подсушивают на воздухе. Далее в сенсibilизированные антигеном лунки вносят по 100 мкл 1%-го раствора БСА для забивки возможных оставшихся свободных участков на твердой фазе, выдерживают 30 мин при 37 °С, после чего планшет освобождают от раствора инертного белка и трижды промывают ЗФР-тв. Отмывающую жидкость удаляют, в каждую подготовленную лунку вносят по 100 мкл ЗФР-тв, затем в 3-ю лунку первого вертикального ряда добавляют 100 мкл исследуемой сыворотки (разведенной заранее ЗФР-тв 1 : 100) и титруют в объеме 100 мкл, перенося из 1-й лунки во 2-ю, из 2-й в 3-ю и т.д. до 7-й лунки второго вертикального ряда включительно, из которой 100 мкл раствора раститрованной сыворотки удаляют в дез. раствор. 8-я лунка второго вертикального ряда – положительный контроль – заведомо положительная сыворотка больного человека или животного. Первые две лунки первого вертикального ряда – отрицательный контроль – гетерологичная сыворотка, либо сыворотка от здоровых животных или человека. После часовой инкубации при 37 °С содержимое лунок удаляют в дез. раствор и трижды отмывают ЗФР-тв, как сказано ранее. Затем во все лунки добавляют по 100 мкл рабочего разведения раствора конъюгата (антивидовые АТ = Фермент). Инкубируют 1 ч при 37 °С, трижды отмывают ЗФР-тв. После заключительного отмывания в каждую лунку вносят по 100 мкл раствора субстрата. Реакцию проводят 15–30 мин при комнатной температуре, после чего в каждую лунку добавляют по 1 капле стоп-реагента. При положительном результате в лунках развивается оранжево-коричневое окрашивание. В отрицательном – раствор прозрачен.

*Учет и оценка результатов ИФА.* Учет результатов реакции можно проводить визуально и инструментально (с помощью ИФА-ридера). Визуально реакцию учитывают по наличию соответствующего окрашивания содержимого лунок в опытных пробах и положительном контроле и отсутствию такового в отрицательных контролях. При наличии слабого окрашивания в отрицательных контрольных образцах (что иногда имеет место при технических погрешностях: некачественной отмывке лунок планшета, использовании концентрированного раствора конъюгата, загрязнении субстрата и т. д.) реакцию учитывают по разнице в окраске отрицательных контрольных и опытных проб.

Инструментальный учет результатов реакции осуществляют на ИФА-ридерах, определяя оптическую плотность продукта реакции фермент-субстрат при соответствующей длине волны. Оптическая плотность положительных образцов должна как минимум в 1,5–2 раза превышать таковую в контрольных пробах.

**Контрольные вопросы:**

1. Характеристика твердофазных иммуносорбентных методов
2. ИФА для обнаружения антигенов
3. ИФА для обнаружения антител
4. Дот-иммуноанализ

**Серологические реакции, протекающие с участием комплемента**

**Реакция бактериолиза.** Используется для серологической диагностики холеры. Феномен бактериолиза легко удается наблюдать *in vitro*. Исследуемую сыворотку наносят в последовательном двукратном разведении каплями на поверхность питательной среды, на которую предварительно засевают культуру вибриона. Чашку с посевами инкубируют при 37 °С в течение 18–20 ч. Под влиянием имеющихся в сыворотке АТ и комплемента холерные вибрионы разрушаются (лизируются), и в местах нанесения капель образуются стерильные пятна. АТ, разрушающие вибрионы, называют вибриоцидными. Титром вибриоцидных АТ считается максимальное разведение сыворотки, при котором она еще вызывает отчетливый лизис бактерий.

**Реакция иммобилизации трепонем.** Применяется для диагностики сифилиса. Живые трепонемы в присутствии имеющихся в исследуемой сыворотке специфических АТ и комплемента теряют свою подвижность.

**Реакция гемолиза.** Литическое действие иммунной сыворотки в присутствии комплемента особенно четко проявляется в отношении эритроцитов. Если кролика иммунизировать эритроцитами другого вида животных (барана), кроличья сыворотка приобретает специфическую гемолитическую активность, т.е. способность вызывать гемолиз эритроцитов, использованных для иммунизации. Этот эффект абсолютно зависим от комплемента. Инактивация последнего путем прогревания сыворотки при 56 °С приводит к утрате ею гемолитической активности. Таким образом, наличие или отсутствие активного комплемента в гемолитической сыворотке очень четко выявляется по результатам ее взаимодействия с гомологичными эритроцитами: при наличии комплемента – гемолиз, образование «лаковой крови»; при его отсутствии – гемагглютинация, эритроциты выпадают на дно пробирки, образуя осадок в виде зонтика, жидкость бесцветна.

**Реакция связывания комплемента.** Уникальная способность комплемента специфически связываться с различными по своей природе комплексами АГ + АТ нашла широкое применение в реакции связывания комплемента (РСК). Особое преимущество РСК состоит в том, что природа АГ, участвующего в ней (корпускулярный или растворимый), не имеет



значения, так как комплемент связывается с Fc-фрагментом любого АТ, относящегося к IgG и IgM, независимо от его антительной специфичности. Кроме того, РСК очень чувствительна: она позволяет обнаружить количество антител в 10 раз меньше, чем, например, в реакции преципитации. РСК была предложена в 1901 г. Ж. Борде и О. Жангу. В ее основе лежат два свойства комплемента: 1) способность связываться с комплексом АГ + АТ; 2) лизирование эритроцитов, использованных для получения гемолитической сыворотки. РСК ставят в два этапа, и в ней соответственно участвуют две системы – опытная, или диагностическая, и индикаторная (рис. 30).

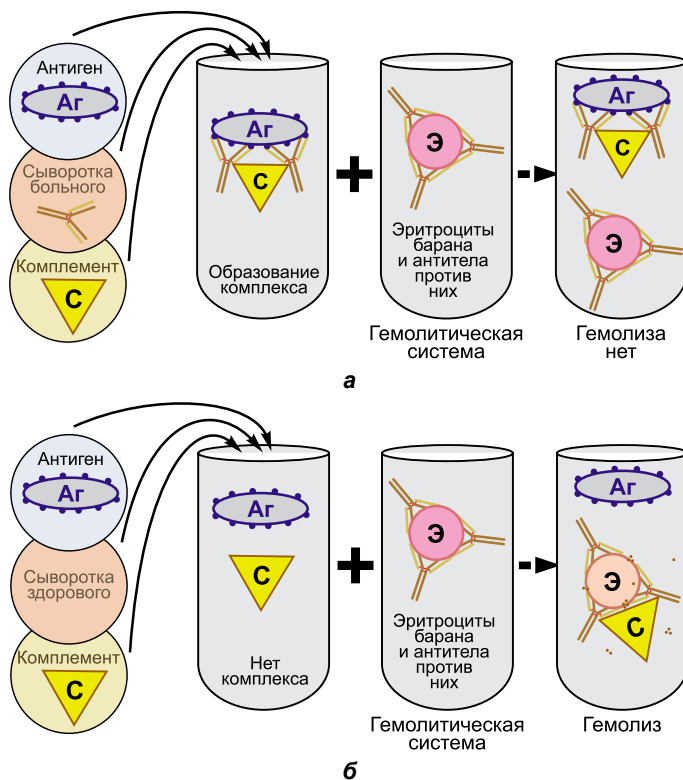


Рис. 30. Схема РСК с сывороткой больного (а) и здорового (б)

Диагностическая система состоит из исследуемой (или диагностической) сыворотки, которую перед постановкой реакции прогревают при 56 °С в течение 30 мин для инактивации имеющегося в ней комплемента, и АГ. К этой системе добавляют стандартный комплемент. Его источником служит свежая или высушенная сыворотка морской свинки.

Смесь инкубируют при 37 °С в течение одного часа. Если в исследуемой сыворотке имеются АТ, произойдет их взаимодействие с добавленным АГ, и образующиеся комплексы АГ + АТ свяжут добавленный комплемент. Если же в сыворотке АТ отсутствуют, образования комплекса АГ + АТ не произойдет, и комплемент останется свободным. Никаких видимых проявлений связывания комплемента на этой стадии реакции обычно нет. Поэтому для выяснения вопроса, произошло или нет связывание комплемента, добавляют вторую, индикаторную систему (инактивированная гемолитическая сыворотка + эритроциты барана), и смесь всех компонентов РСК вновь инкубируют при 37 °С в течение 30–60 мин, после чего оценивают результаты реакции. В случае если комплемент связался на первой стадии, в диагностической системе, т. е. в сыворотке больного имеются АТ, и произошло связывание комплемента комплексом АТ + АГ, лизиса эритроцитов не будет – РСК положительна: жидкость бесцветна, на дне пробирки осадок эритроцитов. Если же в сыворотке специфические АТ отсутствуют и связывания комплемента в диагностической системе не произойдет, т. е. РСК отрицательна, то неизрасходованный в диагностической системе комплемент связывается с комплексом эритроциты + АТ индикаторной системы и произойдет гемолиз – в пробирке «лаковая кровь», осадка эритроцитов нет. Интенсивность РСК оценивают по четырехкрестной системе в зависимости от степени задержки гемолиза и наличия осадка эритроцитов. Реакция сопровождается соответствующими контролями: контроль сыворотки (без АГ) и контроль АГ (без сыворотки), так как некоторые сыворотки и некоторые АГ обладают антикомплементарным действием. Перед постановкой РСК все компоненты, участвующие в ней, за исключением исследуемой сыворотки или АГ, подвергаются тщательному титрованию. Особенно важно ввести в реакцию точную дозу комплемента, так как его нехватка или избыток могут привести к ложным результатам! Титром комплемента является то его минимальное количество, которое в присутствии рабочей дозы гемолитической сыворотки обеспечивает полное растворение эритроцитов. Для постановки основного опыта берут дозу комплемента, увеличенную на 20–25 % по сравнению с установленным титром. Титром гемолитической сыворотки является то ее максимальное разведение, которое, будучи смешано с равным объемом 10%-ного раствора комплемента, полностью гемолизует соответствующую дозу эритроцитов в течение 1 ч при 37 °С. В основной опыт берут сыворотку, разведенную до 1/3 своего титра.

**Непрямая реакция гемолиза** используется как ускоренный метод обнаружения специфических АТ. В качестве носителя АГ используют эритроциты. При наличии в сыворотке больного специфических АТ сенсibilизированные эритроциты в присутствии комплемента лизируются.

## Серологические реакции, протекающие с участием фагоцитов

**Определение опсонического индекса.** АТ, стимулирующие фагоцитарную активность лейкоцитов, получили название опсопинов (от *греч.* *orsoniazō* – снабжать пищей, питать), или бактериотропинов. Различают термолабильные и термостабильные опсопины. К последним относятся антитела классов IgG1, IgG3, IgM. На первом этапе опсонизации АТ прикрепляются к детерминантным группам бактерий, а затем с помощью Fc-фрагментов присоединяются к Fc-рецепторам макрофагов, способствуя поглощению ими бактерий (патогенов). Опсоническая активность АТ резко возрастает в присутствии термолабильных опсопинов, в том числе молекул C3b, образующихся при активации системы комплемента. Молекулы C3b, осаждаваясь на поверхности бактериальных клеток, способствуют прикреплению макрофагов в этих участках (эффект «иммунного прилипания»). Таким образом, опсопины и комплемент способствуют более эффективному прикреплению чужеродных частиц к макрофагам, поглощению и перевариванию их последними, а также, процессингу и представлению АГ. Для количественной оценки фагоцитарной активности, обусловленной опсопинами, используют определение опсонического индекса, опсоно-фагоцитарного индекса и титра опсопинов.

Под опсоническим индексом понимают отношение фагоцитарного числа исследуемой крови к фагоцитарному числу нормальной крови. Для определения фагоцитарного числа оба образца крови смешивают со стандартным количеством соответствующих живых или убитых бактерий. После 30 мин инкубации при 37 °С из каждого образца крови готовят препараты-мазки, фиксируют по способу Никифорова и окрашивают метиленовым синим. Затем под микроскопом подсчитывают общее количество бактерий, фагоцитированных; например, 50 фагоцитами, и находят фагоцитарное число. Опсонический индекс является показателем того, насколько активно стимулируется фагоцитоз опсопинами и системой комплемента.

**Опсоно-фагоцитарная реакция** – способ оценки активности действия опсопинов сыворотки на эффективность фагоцитоза бактерий или других корпускулярных АГ, обработанных этой сывороткой. Для определения опсоно-фагоцитарного индекса, как и при определении опсонического, готовят и окрашивают мазок из смеси исследуемой крови с бактериями. Под микроскопом в нем просматривается 25 фагоцитов, и каждый из них в зависимости от числа поглощенных ими бактерий относят к определенной группе. Конкретный пример такого подсчета представлен в таблице 7.

Таблица 7

**Оценка опсоно-фагоцитарной реакции (пример)**

Количество фагоцитированных микробов в одном фагоците	Оценка фагоцитоза	Количество фагоцитов	Вычисление опсоно-фагоцитарного индекса
0	0	2	$2 \times 0 = 0$
1–20	+	5	$5 \times 1 = 5$
21–40	++	4	$4 \times 2 = 8$
более 41	+++	14	$14 \times 3 = 42$
		Итого:	$0 + 5 + 8 + 42 = 55$

Интенсивность фагоцитоза характеризуют цифровым, показателем, представляющим собой сумму произведений, полученных путем умножения количества фагоцитов на, число соответствующих им плюсов. Максимально возможный показатель равен 75 ( $25 \times 3 = 75$ ). Условно считают, что показатель, равный 10–24, соответствует слабо положительной опсоно-фагоцитарной реакции, 25–49 – положительной, а 50–75 – резко положительной. У людей, не имевших контакта с данным возбудителем, опсоно-фагоцитарный индекс обычно невелик (1–5). Существуют различные варианты этой реакции, но из-за громоздкости их используют относительно редко.

**Тип опсононов** характеризует количественно силу опсонической активности по отношению к данному возбудителю. Активность опсононов проверяют в опытах с использованием фагоцитов здоровых людей.

**Реакции нейтрализации**

Этот тип иммунологических реакций основан на способности АТ специфически подавлять (нейтрализовать) биологическую активность возбудителя или его токсинов в различных тест-системах -организме животных, в куриных эмбрионах, культурах клеток или каким-то иным способом. Это зависит от природы возбудителя и цели исследования. Например, для оценки эффективности иммунизации против дифтерии и столбняка определяют уровни анитоксинов в сыворотке крови привитых по их способности нейтрализовать биологическое действие определенной дозы токсина (реакция Шика). Широкое применение они получили в диагностике ботулизма, в вирусологической практике как для серологической диагностики вирусных заболеваний, так и для идентификации вирусов. С этой целью используют реакции нейтрализации роста вирусов в культуре ткани, подавления бляшкообразования, гемадсорбции, торможения гемагглютинации (РТГА) и др.

## НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ И ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. – СПб.: ООО «Издательство СпецЛит», 1998. – часть 5
3. Кирдей Е.Г. Иммунология. – Иркутск: Изд. ИГМУ, 2000. – 231 с.
4. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Жилина Н.Я. и др. Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму. – Волгоград, 2004. – 233 с.
5. Практикум по микробиологии // Под ред. Нетрусова. – М., 2005. – 603 с.
6. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии // Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова. – М.: МИА, 2003. – 233 с.
7. Практикум по иммунологии / Под ред. И.А. Кондратьева, А.А. Ярилина. – М.: ECADEMA, 2004. – 272 с.
8. Галактионов В.Г. Иммунология: Учебник. – М.: «РИЦ МДК», 2005.
9. Галактионов В.Г. Иммунологический словарь. – М.: ECADEMA, 2005. – 154 с.
10. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 600 с.
11. Осин Н.С., Помелова В.Г., Соколов А.С. и др. Биочипы с фосфоресцентной детекцией для индикации патогенов // Материалы VIII Межгосударственной научно-практической конференции. – Саратов, 2007. – С. 263–264.
12. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга I / Под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волиной. – М.: Изд-во БИНОМ, 2008. – 1800 с.
13. Поздеев О.К. Медицинская микробиология // Под ред. акад. РАМН В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 768 с.
14. Бикетов С.Ф., Баранова Е.В., Соловьев П.В. и др. Апробация экспериментального иммунохроматографического теста для обнаружения токсигенных штаммов *Vibrio cholerae*. Молекулярная диагностика. сб. трудов / Под ред. В.И. Покровского. – т. 1 – М.: Киселева Н.В., 2010. – С. 364–365.
15. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство / Под. ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко, акад. РАМН В.В. Кутырева – 2013. – 560 с.
16. Сборник нормативно-методических документов по порядку организации и проведения лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней / Сост.: А.Ю. Попова [и др.]; ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. – Саратов: ООО «Буква», 2014. – 344 с.
17. Специфическая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний: учебно-методическое пособие для врачей всех спец., студ. мед. вузов

(бакалавриат), врачей-интернов и клинических ординаторов / В.Н. Городин, Г.Н. Наумов и др. – Краснодар: [б. и.], 2015. – 114 с.

18. Лабораторная диагностика инфекционных болезней: справочник / Под ред. В.И. Покровского, М.Г. Твороговой, Г.А. Шипулина. – М.: «Изд-во БИНОМ», 2016. – 648 с

19. Сбойчаков В.Б. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований: учебник для средних мед. учебных завед. / В.Б. Сбойчаков. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: Специальная Литература, 2017. – 712 с.

20. Приказ №1116 от 01.12.2017 О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации.

## **ИММУНОСЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

**Учебное пособие для врачей-бактериологов**

Корректор *Булкина С.В.*  
Оригинал-макет *Арсентьев Л.И.*  
Художник *Фалеев К.А.*

---

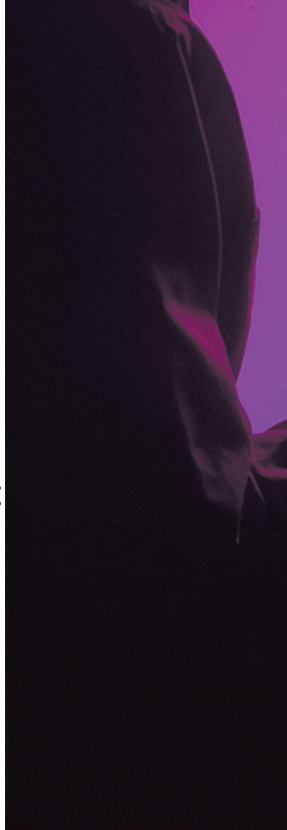
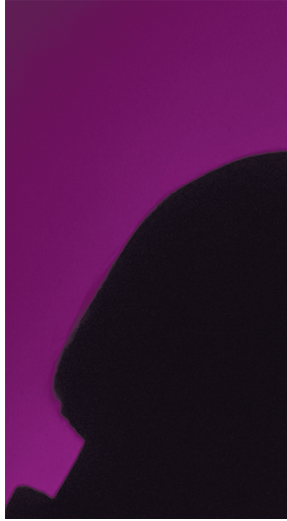
Сдано в набор 02.06.2022. Подписано в печать 17.06.2022. Бумага офсетная.  
Формат 60x84<sup>1/16</sup>. Гарнитура Cambria.  
Усл. печ. л. 5,12. Тираж 130 экз. Заказ № 031-22.

---

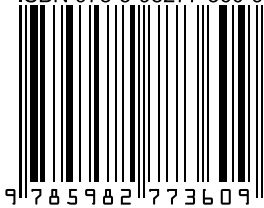
ИНЦХТ  
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. (395-2) 29-03-37.  
E-mail: arleon58@gmail.com



УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ



ISBN 978-5-98277-360-9



9 78 5 982 77 360 9