

Куб ГАУ

**кафедра микробиологии,
эпизоотологии и
вирусологии**

**Ведущий преподаватель
доктор биологических наук,
профессор**

Нино Нодариевна Гугушвили

Лабораторные занятия
по общей микробиологии
для факультета
ветеринарной медицины

Тема

Серологические реакции.

Задание

1. Ознакомиться с сущностью, компонентами, методами постановки и учёта серологических реакций.
2. Реакция агглютинации (РА) и её модификации, реакция преципитации (РП), реакция диффузной преципитации (РДП), реакция иммунофлуоресценции (МФА), реакция нейтрализации.

1. **Ознакомиться с сущностью, компонентами, методами постановки и учёта серологических реакций.**

Характеристика серологических реакций

Соединение антигена с антителом. Выяснение механизмов соединения антигенов с антителами дает возможность понять сущность многообразных иммунологических процессов и реакций, возникающих в организме под влиянием патогенных и непатогенных агентов. В настоящее время наиболее обосновывается следующая теория. Это в основном исходит из современных представлений о наличии у антигенов нескольких детерминантных групп и двух активных центров в молекуле антитела.

Детерминантные группы
антигена несут
определенный
электрический заряд. В
процессе индукции антител
они определяют
специфичность
формирующихся антител.

Концевые части полипептидных цепей антител имеют заряд, противоположный заряду детерминантной группы антигена.

Полярные группы антигена и антитела, обладающие противоположными зарядами, соединяются между собой.

Прочность образования комплекса зависит от количества реагирующих групп и полноты совпадения структуры полярных групп антигена и антитела.

Чем больше количество реагирующих групп и совпадения структуры полярных групп, тем прочнее соединение и наоборот.

При оптимальном соотношении антитела с антигеном происходит полное взаимное насыщение всех валентностей и образуются прочные комплексы, выпадающие в осадок.

Если имеется избыток антител, часть активных центров остается свободной и образование комплекса задерживается.

В случае, если есть избыток антигена, возникают рыхлые комплексы и замечается выпадение осадка.

При максимальном избытке антигена, когда связаны все активные центры антитела, образование комплексов прекращается, и осадка не выпадает.

антителом.

Специфичность антител, обуславливающая механизм их взаимодействия с антигеном, связана конфигурацией активных центров, которые должны строго соответствовать детерминантным группам антигена. В основе всех иммунологических реакций лежит взаимодействие антигена с антителом.

Реакция между антителом и антигеном протекает в две стадии:

первая невидимая – специфическая (непосредственное соединение активного центра антитела с антигенной детерминантой),

вторая видимая – неспецифическая, когда образовавшийся комплекс антиген-антитело выпадает в осадок.

Если антигены корпускулярны происходит **агглютинация** – склеивание со специфическими антителами.

Антитела, участвовавшие в реакции агглютинации, называют агглютинаинами, антигены – **агглютиногенами**, а образующийся комплекс – **агглютинатом**.

Когда в реакции с антителами участвуют растворимые (молекулярные) антигены (белки или их комплексы с углеводами и липидами различного происхождения, бактериальные экстракты, лизаты и фильтраты бульонных культур), наблюдается феномен **преципитации – осадждения антигена.**

Название образовавшегося осадка – **преципитат**, антител – **преципитины**, антигенов – **преципитиногены.**

Все серологические реакции в ветеринарии и медицине применяют как методы диагностики: определение антител и антигенов по известным сывороткам.

2. Реакция агглютинации (РА)

Существует несколько методов постановки РА: пробирочный (объемный), капельный (на стекле, пластинчатый), антиглобулиновый тест (реакция) Кумбса, метод адсорбции агглютининов (РА по методу Кастеллани), кольцевая реакция с молоком (КР), кровяно-капельный, гемагглютинации, торможения гемагглютинации.

РА на стекле

1. На обезжиренное предметное стекло наносят отдельно каплю известной агглютинирующей диагностической сыворотки и каплю физ. Раствора (контроль). Затем бактериологической петлёй берут бактериальную массу изучаемой культуры из колоний в чашке Петри или с поверхности скошенного МПА в пробирке и суспендируют отдельно в иммунной сыворотке и физ. Растворе до получения гомогенной взвеси.

Учёт результатов:

Результат учитывают через 2-4 мин. В контрольной пробе изменения должны отсутствовать. При специфическом соответствии культуры бактерий иммунной сыворотки появляются хлопья агглютината (положительный результат).

Реакция используется для идентификации микроорганизмов.

2. На предметное стекло наносят 0,3 мл исследуемой сыворотки крови животного и 0,03 мл специфически окрашенного антигена клеток возбудителя. Компоненты тщательно перемешивают покачиванием стекла и через 4 мин учитывают результат.

При положительной реакции появляются окрашенные хлопья агглютината.

Реакция используется для выявления антител к возбудителю в сыворотке крови животного.

Капельный (пластинчатый) метод РА

На чистую стеклянную пластинку наносят микропипеткой исследуемую сыворотку по 0,04; 0,02; 0,01 и 0,05 мл. В каждой сыворотке добавляют по одной капле антигена определённой концентрации, постепенно смешивают чистой стеклянной палочкой начиная с наименьшего количества. Условно считают, что сыворотка в первой капле соответствует разведению 1:100, в третьей – 1:200, в четвертой – 1:400. через 2-3 минуты производят учет.

Для ускорения реакции стекло слегка подогревают высоко над пламенем горелки. Положительный результат проявляется образованием в капле сыворотки комплекса антиген-антитело в виде крупинок, хлопьев, жидкость становится прозрачной. При отрицательном результате капля смеси сыворотки и антигена остаётся равномерно мутной (отсутствие в сыворотке антител).

Кровяно-капельный метод РА

На обезжиренное предметное стекло наносят каплю цельной крови, в неё добавляют каплю соответствующего антигена и смешивают стеклянной палочкой.

В положительных случаях РА (когда в крови имеются специфические антигену антитела) через 30-60 сек. В капле смеси появляются глыбки, хлопья склеенного антигена (агглютинат).

Реакция Кумбса

К эритроцитам животного
специфическую
антиглобулиновую
(содержащую антитела против
глобулинов сыворотки).
Эритроциты агглютинируют.

больного
добавляют
сыворотку
сыворотки).

Пробирочная РА

Исследуемые сыворотки разводят в чистых сухих пробирках с ровным сферическим дном. Для каждой сыворотки берут отдельную пипетку. В отдельной пробирке готовят основное (исходное) разведение сыворотки – 1:25, смешивая 0,1 мл испытуемой сыворотки с добавлением 2,4 мл физ. раствора.

В опытные пробирки разливают по 1 мл физ. раствора. Затем из исходного разведения 1 мл жидкости переносят в первую пробирку, смешивают с физ. Раствором (разведение 1:50) и 1 мл переносят во вторую пробирку. Из второй – в третью и т.д. Из последней пробирки 1 мл выливают в дез. раствор, чтобы в каждой пробирке осталось по 1 мл. разведённой сыворотки. Во все пробирки добавляют по 2 капли стандартного антигена, смешивают встряхиванием и выдерживают в термостате 4-6 часов при 37°C а затем при комнатной температуре 14-16 ч. Ставят контроли (контроль антигена и контроль сыворотки)

Учет результатов:

Проводят невооружённым глазом или с помощью агглютиноскопа, начиная с контрольных пробирок. Результат РА принято выражать количеством крестов:

++++ полное просветление жидкости, образовавшийся агглютинат в виде перевёрнутого зонтика, при встряхивании разбивается в глыбки, хлопья разной величины, жидкость остаётся прозрачной.

+++ неполное просветление жидкости, характер агглютината в виде перевернутого зонтика, при встряхивании разбивается на более мелкие глыбки, комочки.

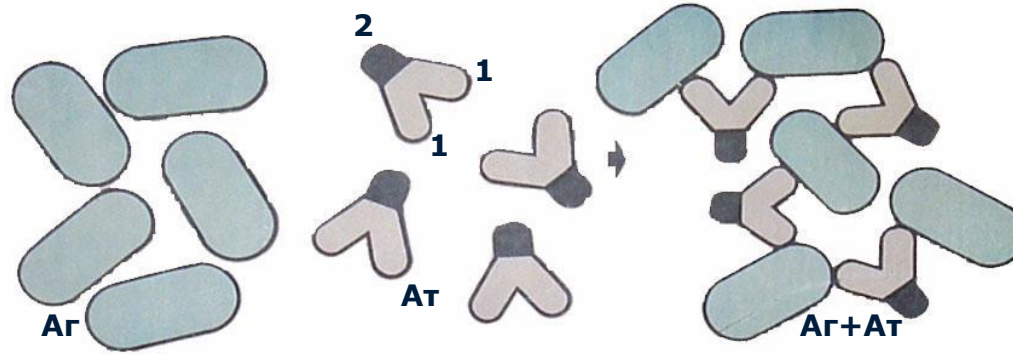
++ обозначают РА неполную, с неполным просветление жидкости, агглютинат в виде зонтика, но при встряхивании разбивается на хлопья разной величины, жидкость мутная.

+ наличие небольшого нехарактерного осадка в виде «пуговки», жидкость мутная. При встряхивании осадок легко разбивается, увеличивая мутность.

- вся жидкость в пробирке мутная, на дне пробирки небольшой осадок антигена с ровными краями в виде «пуговки». При встряхивании разбивается в равномерную муть.

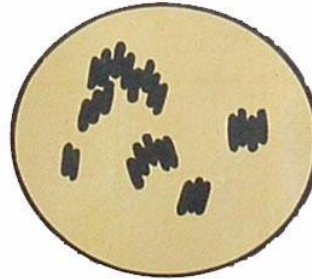
Реакция агглютинации

механизм реакции

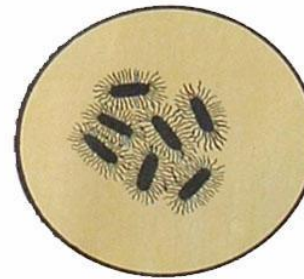


Виды агглютинации

О-агглютинация

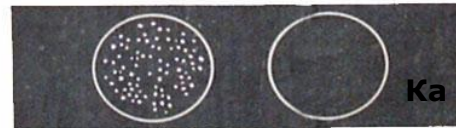


Н-агглютинация

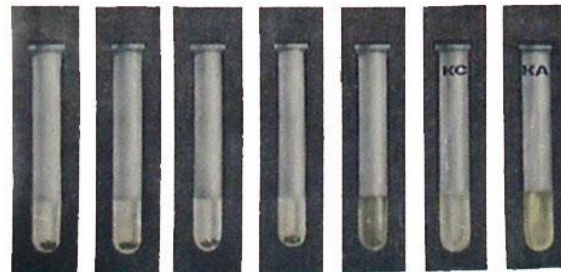


Способы постановки

На стекле



Развёрнутая реакция



Аг – антиген

Ат – антитело (1-FAВ-фрагмент, 2-Fc-фрагмент)

Аг+Ат – комплекс антиген+антитело

КА – контроль антигена

КС – контроль сыворотки

Реакция преципитации (РП)

Использую две модификации РП:
реакция кольцепреципитации и
реакция диффузной преципитации
(преципитация в геле).

Реакция кольцепреципитации (РКП)

В Уленгутовские пробирки (диаметр 2-3 мм) вносят Пастеровской пипеткой с тонким капилляром, не смачивая стенок пробирки 0,3-0,4 мл иммунной преципитирующей сыворотки. Затем по стенке пробирки осторожно наслаивают на поверхность сыворотки 0,1-0,2 мл растворимого исследуемого антигена (преципитиногена). Смешивание компонентов не происходит благодаря различию плотности сыворотки и экстракта.

Учет результатов

проводят на фоне тёмной бумаги. Через 1-2 минуты в зоне взаимной диффузии антигена и антител, на границе контакта компонентов, происходит помутнение среды, видимое сбоку как серо-белый диск (преципитат, кольцо).

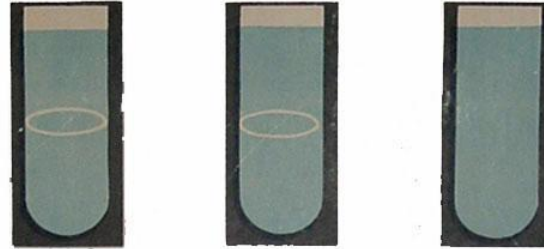
Реакция диффузной преципитации (РДП)

Осуществляют путём наслаивания антигена на поверхность агара, содержащего специфическую сыворотку (по Удену), или путём внесения сыворотки в специальные лунки в агаре, содержащем антиген (по Аутерлони). Оба компонента в луночках, на поверхности агара, сыворотка и исследуемый материал, диффундируют во встречном направлении в слое агарового геля. На месте встречи специфических антиген-антитела выпадает серовато-белый преципитат.

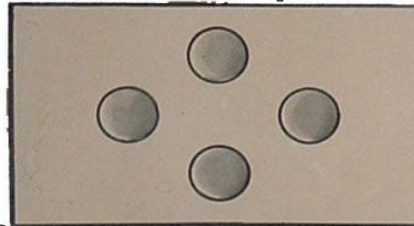
Реакция преципитации

Способы постановки

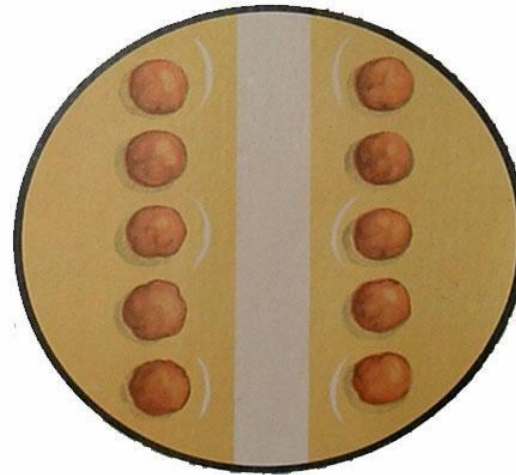
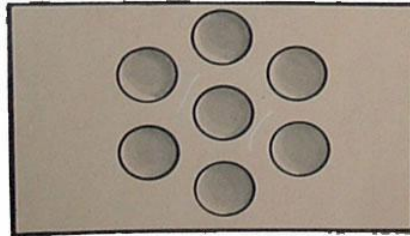
Реакция кольцепитации



Преципитация в геле

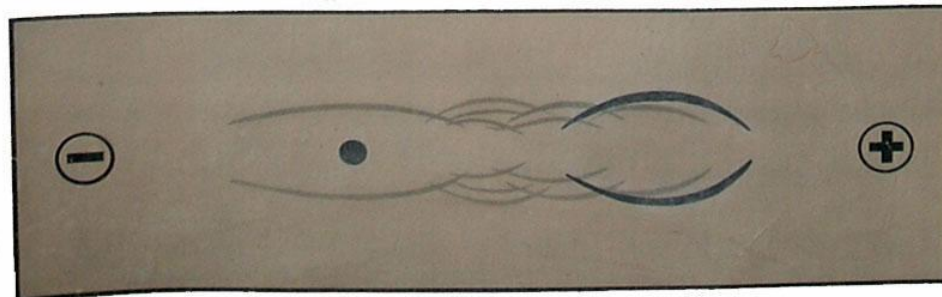


Реакция по Сухтерлону

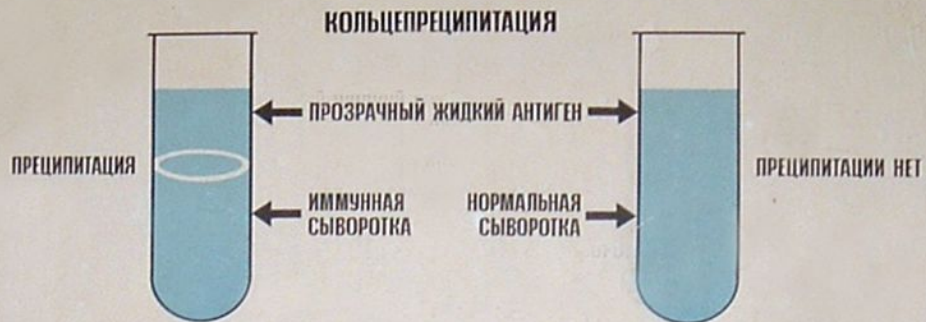


Реакция
нейтрализации
токсина
антитоксическ
ой сывороткой

Иммуноэлектрофорез



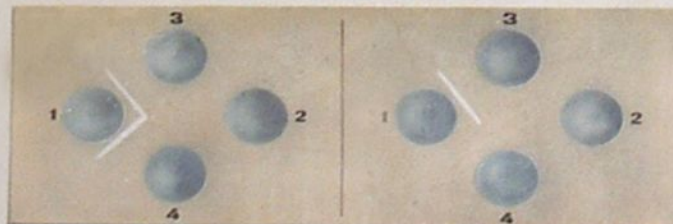
РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ



ПРЕЦИПИТАЦИЯ В АГАРОВОМ ГЕЛЕ «МЕТОД ДВОЙНОЙ ДИФфуЗИИ ПО ОУХТЕРПОНИ»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДА АНТИГЕНА

ОБНАРУЖЕНИЕ И ТИТРОВАНИЕ АНТИТЕЛ



РЕАКЦИЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ

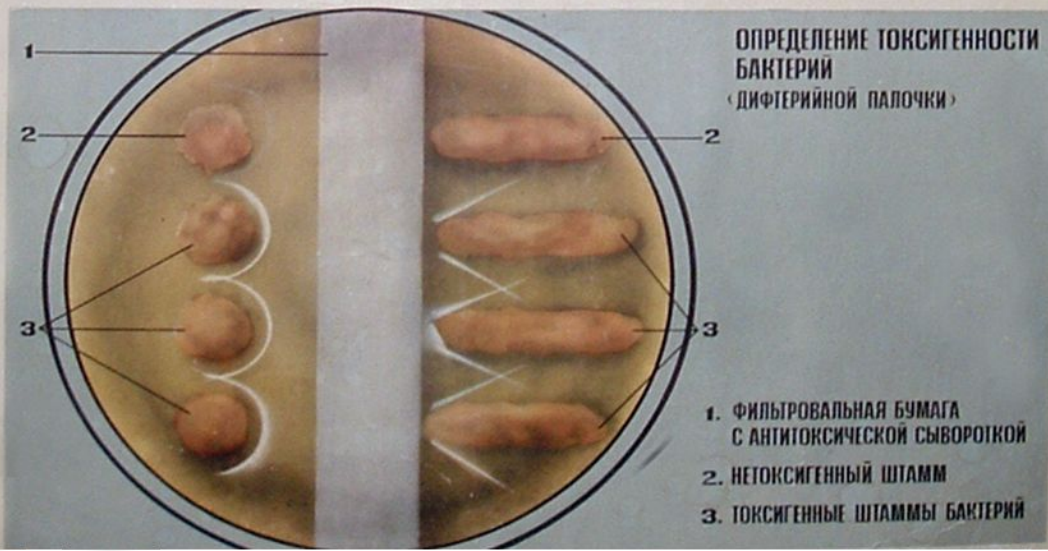
РЕАКЦИЯ ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ

1. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУННАЯ СЫВОРОТКА
2. НОРМАЛЬНАЯ СЫВОРОТКА
3. ИЗВЕСТНЫЙ АНТИГЕН
4. НЕИЗВЕСТНЫЙ АНТИГЕН



РЕАКЦИЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ

ЦЕНТРАЛЬНАЯ ЛУНКА - ИЗВЕСТНЫЙ АНТИГЕН
ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ ЛУНКИ - РАЗВЕДЕНИЯ СЫВОРОТКИ



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИГЕННОСТИ БАКТЕРИИ «ДИФТЕРИЙНОЙ ПАЛОЧКИ»

1. ФИЛЬТРОВАЛЬНАЯ БУМАГА С АНТИТОКСИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКОЙ
2. НЕТОКСИГЕННЫЙ ШТАММ
3. ТОКСИГЕННЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИИ

Реакции иммунофлюоресценции (МФА)

Это комплексный метод, сочетает в себе серологическую реакцию, при которой происходит специфическое взаимодействие антигена и антитела с образованием иммунного комплекса и микроскопического исследования, с помощью которого этот комплекс обнаруживают. В реакции МФА используют антитела, к которым присоединен флуорохром (чаще – флуоресцеин-изотиоцинат). Такие антитела сохраняют способность специфически реагировать с антигеном и благодаря флуорохрому светиться под воздействием УФЛ.

Существует 2 метода постановки МФА:

1. Прямой МФА
2. Непрямой МФА
 - А) двухступенчатый МФА
 - Б) трёхступенчатый МФА

Прямой МФА

На предметное стекло с фиксированным антигеном наносят каплю люминесцирующей иммунной сыворотки в рабочем разведении, содержащей антитела против искомого антигена. Чтобы избежать высыхания, препарат помещают во влажную камеру (чашку Петри с фильтровальной бумагой, смоченной водой) и выдерживают в термостате при 37-38°C 15-30 мин. затем препарат 5-10 мин. промывают от несвязавшихся иммуноглобулинов проточной водой с рН не ниже 7. промытый препарат просушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Прямой МФА используют только для идентификации неизвестного антигена, к его недостатку относят необходимость приготовления люминесцирующей сыворотки для каждого вида идентифицируемого микроорганизма.

Оценка результатов МФА

Учитывают яркость свечения, цвет, локализацию структуры свечения. Интенсивность свечения оценивают по 4-х крестовой системе:

++++ очень яркая флуоресценция по периферии микробной клетки, чётко контрастирующая с темной центральной частью клетки.

+++ яркая флуоресценция периферии клетки

++ слабое свечение периферии клетки

+ нет контрастного свечения периферии и центральной части микробной клетки.

- Отсутствие специфического свечения

Реакция нейтрализации

Используется только для установления видовой принадлежности бактериальных токсинов в исследуемом материале и для определения активности антитоксических сывороток.

В пробирки с равным количеством антигена 1 мл добавляют равный объем убивающего количества специфической гипериммунной сыворотки. Смесь токсин-антитоксин помещают в термостат на 1-2 часа. Затем из каждой пробирки смесь вводят лабораторным животным (по 2 животных на каждую дозу). Животные, получившие смесь, где произошла нейтрализация токсина, остаются живыми. Наименьшее количество сыворотки, нейтрализовавшее токсин, принимается за единицу активности антитоксической сыворотки. Чем меньше это количество, тем активнее сыворотка.

Благодарю за внимание!