

Серологическая диагностика

Цидильковская Э.С.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ (от лат. serum - сыворотка)

РЕАКЦИИ — реакции взаимодействия антигена и антитела, при которых один из ингредиентов неизвестен, протекают в две фазы:

1-я фаза - специфическая — образование комплекса антиген - антитело, видимого изменения нет;

2-я фаза — неспецифическая - комплекс антиген — антитело взаимодействует с неспецифическими факторами среды (электролиты - вещества, проводящие электрический ток [растворы солей]; комплемент - набор иммунных белков, содержащихся в сыворотке крови [кровь без форменных элементов], фагоцит. Результат взаимодействия виден невооруженным глазом (склеивание, растворение, помутнение).

Виды серологических реакций:

1. агглютинации,
2. преципитации,
3. нейтрализации,
4. связывания компонента,
5. РИФ,
6. ИФА (иммуноферментный анализ).

Применение серологических реакций:

1. Лабораторная диагностика инфекций:

- 1) для выявления антител в сыворотке больного (серодиагностика);
- 2) для определения вида антигена – выделенный микроорганизм (идентификация).

Реакция агглютинации — РА

- от лат. *agglutinatio* — склеивание
- реакция, при которой происходит связывание антителами корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов, нерастворимых частиц с адсорбированными на них антигенами).
- протекает при наличии электролитов, например изотонического раствора NaCl.
- **проявляется образованием хлопьев или осадка** (клетки, «склеенные» антителами, имеющими два или более антигенсвязывающих центра).

Использование реакции агглютинации

1) определение антител в сыворотке крови больных:

бруцеллез (реакции Райта, Хеддельсона),

брюшной тиф и паратифы (реакция Видаля)

2) определение возбудителя, выделенного от больного;

3) определения групп крови с использованием

моноклональных антител против алло-антигенов эритроцитов.

Варианты реакции агглютинации

1. развернутая,
2. ориентировочная,
3. непрямая

Для определения у больного количества антител - развернутая реакция агглютинации:

- к разведениям сыворотки крови больного добавляют диагностикум (взвесь убитых микробов),
- через несколько часов инкубации при 37 °С отмечают наибольшее разведение сыворотки (титр сыворотки), при котором произошла агглютинация, т. е. образовался осадок.

Характер и скорость агглютинации зависят от вида антигена и антител

- Р-ция агглютинации с **О-диагностикумом** (бактерии, убитые нагреванием, сохранившие термостабильный О-антиген) происходит в виде мелкозернистой агглютинации.
- Р-ция агглютинации с **Н-диагностикумом** (бактерии, убитые формалином, сохранившие термолабильный жгутиковый Н-антиген) — крупнохлопчатая и протекает быстрее.

Определить возбудитель, выделенный от больного - **ориентировочная реакция агглютинации**

- Применяют диагностические антитела (агглютинирующая сыворотка), т. е. проводят серотипирование возбудителя.
- Ориентировочную р-цию проводят на предметном стекле.
- К капле диагностической агглютинирующей сыворотки в разведении 1:10 или 1:20 добавляют чистую культуру возбудителя, выделенного от больного.
- Рядом ставят контроль: вместо сыворотки - капля р-ра NaCl

- При появлении в капле с сывороткой и микробами хлопьевидного осадка ставят развернутую реакцию агглютинации в пробирках с увеличивающимися разведениями агглютинирующей сыворотки, к которым добавляют по 2—3 капли взвеси возбудителя.
- Агглютинацию учитывают по количеству осадка и степени просветления жидкости.
- Реакция - положительная, если агглютинация - в разведении, близком к титру диагностической сыворотки.
- Одновременно учитывают контроли: сыворотка, разведенная изотоническим р-ром NaCl, должна быть прозрачной, взвесь микробов в том же растворе — равномерно мутной, без осадка.

Реакция непрямо́й (пассивно́й) гемагглютинации (РНГА, РПГА)

Основана на использовании эритроцитов (или латекса) с адсорбированными на их поверхности антигенами или антителами, взаимодействие которых с соответствующими антителами или антигенами сыворотки крови больных вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка.

При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговки».

- Обычно в РНГА выявляют антитела с помощью антигенного эритроцитарного диагностикума - эритроциты с адсорбированными на них антигенами.
- Иногда применяют антительные эритроцитарные диагностикумы на которых адсорбированы антитела.
- Например, можно обнаружить ботулинический токсин, добавляя к нему эритроцитарный антительный ботулинический диагностикум (р-ция обратной непрямой гемагглютинации — РОНГА).
- РНГА применяют для диагностики инфекционных болезней, определения гонадотропного гормона в моче при установлении беременности, для выявления повышенной чувствительности к лекарственным препаратам, гормонам.

РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Проводят в пробирках, наслаивая растворённый в электролите АГ на иммунную сыворотку. При оптимальном соотношении АГ и АТ на границе двух растворов образуется непрозрачное кольцо – преципитат. Отличие РП от РА - размер частиц антигена.

РП применяют для определения антигена при диагностике инфекций (сибирская язва, менингит); в судебной медицине — для определения видовой принадлежности крови, спермы; в санитарно - гигиенических исследованиях — при установлении фальсификации продуктов; с её помощью определяют филогенетическое родство животных и растений.

Схема реакции приципитации:

АТ (иммунная диагностическая сыворотка) + АГ (растворённый АГ или гаптен в изотоническом растворе) + = мутное кольцо (приципитат)

РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ.

РН основана на способности АТ иммунной сыворотки нейтрализовать действие микробов и их токсинов на клетки. РН проводят путём введения смеси АГ – АТ животным. При отсутствии у животных повреждающего действия говорят о нейтрализующем действии сыворотки. РН применяют для приготовления **антитоксических сывороток.**

Схема реакции приципитации: **АТ (иммунная диагностическая сыворотка) + АГ (м/о или их токсины) = нет повреждений** на животном (флокуляция – помутнение, хлопья в пробирке)

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

РСК основана на адсорбции (оседании) комплемента на комплексе АГ—АТ.

РСК применяют для идентификации и серодиагностики инфекций, вызванных спирохетами (реакция Вассермана), риккетсиями и вирусами.

Техника проведения РСК:

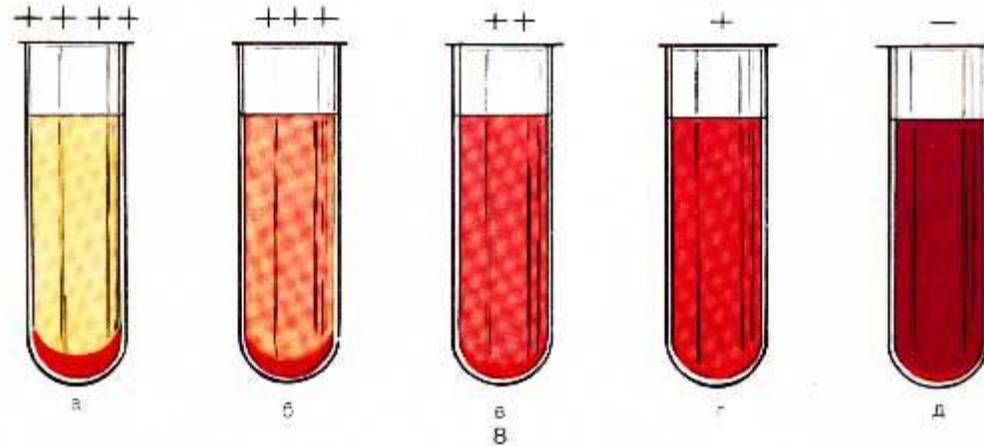
1 фаза (не различима глазом): инкубация смеси АГ (м/о) + АТ (иммунная сыворотка) + комплемент (сывороточная смесь от разных животных) + изотонический раствор

2 фаза: смесь [АГ + АТ + комплемент] + АГ (эритроциты барана) + гемолитическая сыворотка (АТ к эритроцитам барана) + изотонический раствор.

Учёт результатов:

Если комплемент присоединился к комплексу АГ – АТ в 1 фазе, то гемолиза эритроцитов барана нет, реакция положительная – в пробирке муть (комплекс АГ – АТ специфический).

РСК



Задержка гемолиза - реакция положительна; если комплемент свободен, наблюдается гемолиз - реакция отрицательна

Если в 1 фазе АГ не соответствует (не специфичен, не соединится) антителу, то и комплемент останется свободным. Свободный комплемент участвует во 2 фазе, вызывая гемолиз эритроцитов барана — результат отрицательный (в пробирках прозрачно — «лаковая кровь»).

- **РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ**
- К АТ иммунных сывороток присоединяют флюорохромы (люминесцирующие сыворотки). При взаимодействии АТ с АГ образуется светящийся комплекс, видимый с помощью люминесцентного микроскопа.

Метод высокочувствителен, прост, быстр (результат через 30мин), не требует выделения чистой культуры (обнаруживают микроорганизмы в кале при холере, мокроте при коклюше, мозговой ткани).

РИФ применяют для экспресс (ускоренной) диагностики инфекций.

Схема реакции приципитации: АТ (иммунная сыворотка) + флюорохромы + АГ (м/о) = свечение комплекса АТ - АГ

Иммуноферментный метод, или анализ (ИФА)

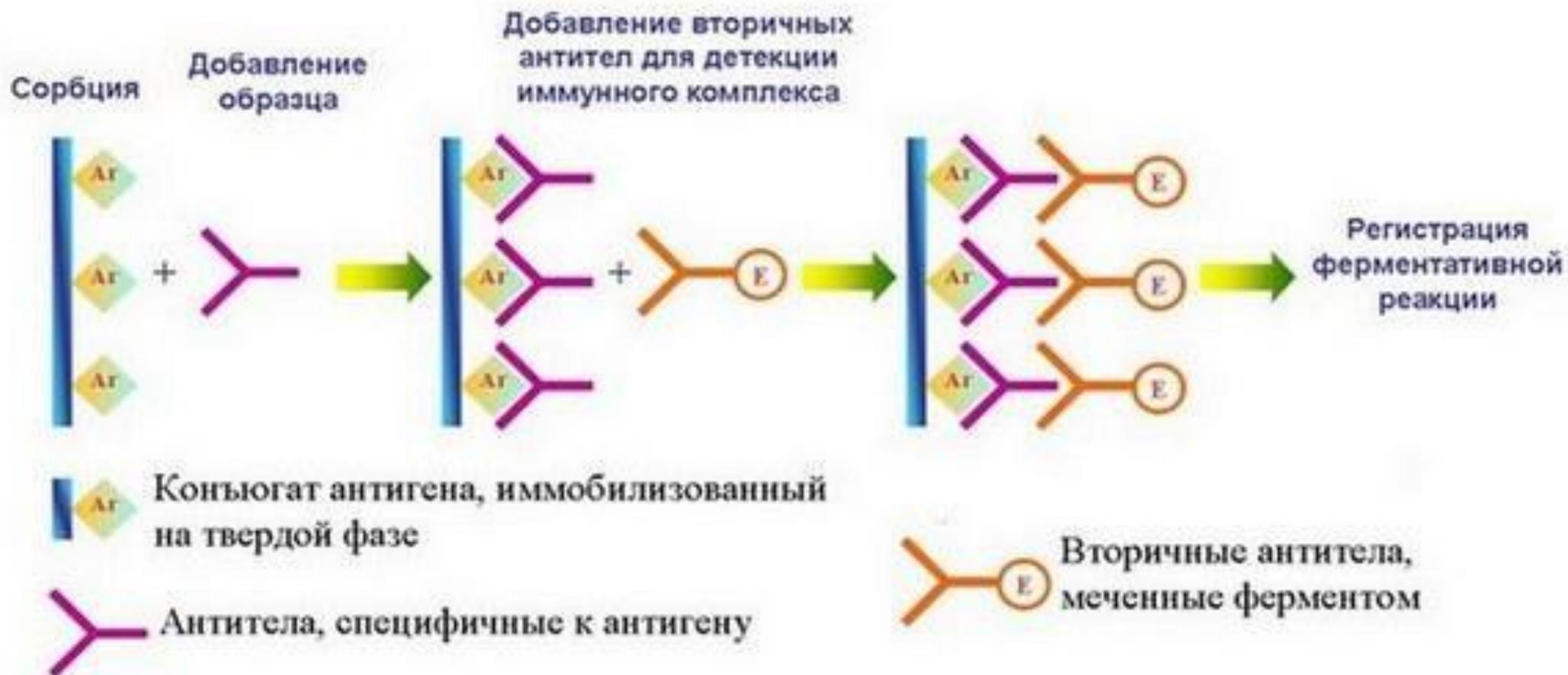
ИФА — выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой).

После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат/хромоген. Субстрат расщепляется ферментом, и изменяется цвет продукта реакции — интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Твердофазный ИФА

- один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитела) сорбирован на твердом носителе, например в лунках планшеток из полистирола.
- При определении антител в лунки планшеток с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больного, антиглобулиновую сыворотку, меченную ферментом, и субстрат (хромоген) для фермента.
- Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют несвязавшиеся реагенты путем тщательного промывания. При положительном результате изменяется цвет раствора хромогена.
- Твердофазный носитель можно сенсibilизировать не только антигеном, но и антителами - в лунки с сорбированными антителами вносят искомый антиген, добавляют иммунную сыворотку против антигена, меченную ферментом, а затем

Иммуноферментный анализ



Аллергодиагностика in vitro. Иммуноферментный анализ.



ИФА применяют

- для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней (ВИЧ-инфекций, гепатита В и др.)
- определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов,
- кардиомаркеров, онкомаркеров, цитокинов,
- аллергенов, аутоантител