

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

**КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ ФГБОУ ВО
ТГМУ 2016Г**

ПЛАН

- 1. Серологические реакции, которые используются для серологической диагностики.
- 2. Серологические реакции, которые используются для серологической идентификации.
- 3. Современные методы Иммунологических исследований при инфекционных болезнях: (Иммунолюминесцентный и Иммуноферментный анализ, генодиагностика, полимеразная цепная реакция).
- 4. Серологические реакции, которые используются в вирусологии.
-

РЕАКЦИИ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ С ДВОЯКОЙ ЦЕЛЬЮ:

- для выявления антител в сыворотке больного с помощью стандартных антигенов-диагностикумов – для серологической диагностики инфекционной болезни;**
- для определения неизвестных антигенов (бактерий, грибов, вирусов) за известными стандартными сыворотками-антителами – для серологической идентификации возбудителей.**

КЛАССИФИКАЦИЯ

- ❑ **Иммунные реакции подразделяются на простые и сложные. Для их постановки необходимы основные два компонента: антиген и антитело.**
- ❑ **К простым реакциям, применяемым для диагностики, относятся реакции агглютинации, реакции преципитации, реакции нейтрализации.**
- ❑ **К сложным реакциям – иммунофлюоресцентный метод, радиоиммунный метод, иммуноферментный метод, иммунолюминесцентный метод исследования, метод иммуноблотинга.**

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

❑ Реакция агглютинации (agglutinacio — склеивание) внешне проявляется в склеивании и выпадении в осадок корпускулярных антигенов: бактерий, эритроцитов, а также частиц с адсорбированными на них антигенами под влиянием антител в среде с электролитом.

❑ Реакция протекает в две фазы.

❑ В первой фазе происходит специфическая адсорбция антител на поверхности клетки или частицы, несущей соответствующие антигены,

❑ Во второй — образование агрегата (агглютината) и выпадение его в осадок, причем этот процесс происходит только в присутствии электролита (раствор хлорида натрия).

АГГЛЮТИНАТ

- ❑ **Агглютинат может быть двух типов - мелкозернистый и крупнохлопчатый.**
- ❑ **Мелкозернистый – это результат взаимодействия мелких бактерий,**
- ❑ **крупнохлопчатый – бактерий, имеющих жгутики.**

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ- ТИПЫ

- ❑ Все реакции агглютинации подразделяются на два типа:**
- ❑ ориентировочные (ОРА), которые выполняются на стекле,**
- ❑ развернутые (РРА) – выполняются в пробирках с титрованием сыворотки.**

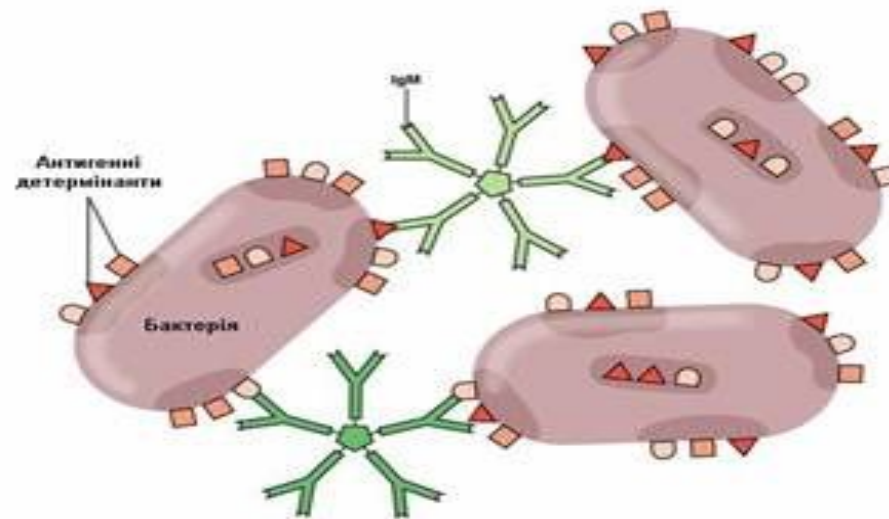
РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ НЕДОСТАТОЧНО СПЕЦИФИЧНА И ЧУВСТВИТЕЛЬНА.

- ❑ *Повысить специфичность и чувствительность реакции можно путем разведения исследуемой сыворотки до ее титра или половины титра.*
- ❑ **Титром сыворотки называется то ее максимальное разведение, в котором обнаруживается агглютинация антигена.**
- ❑ **Чем выше титр антител, тем достовернее результаты реакции.**
- ❑ **Чтобы дифференцировать причину положительной реакции (ранее перенесенная инфекция, вакцинация или текущее заболевание), оценивают динамику нарастания титра антител, которое наблюдается только при текущей инфекции.**

ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ

- ❑ **Ориентировочные реакции также могут иметь две цели:**
- ❑ **Идентификация микробного вида (с использованием известной иммунной сыворотки).**
- ❑ **Поиск антител в сыворотке крови пациента с использованием известного микробного диагностикума.**

РЕАКЦІЯ АГГЛЮТИНАЦІИ

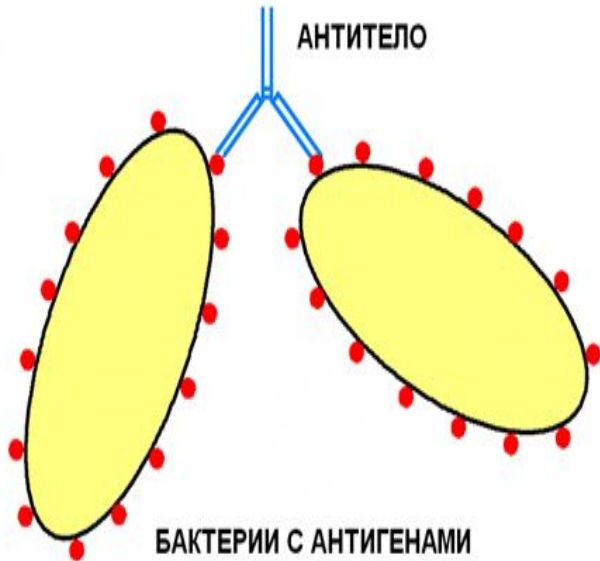


ОРИЕНТИРОВОЧНЫЕ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

ОРА - ориентировочной реакции агглютинации



СХЕМА ОРИЕНТИРОВОЧНОЙ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ.



Этапы выполнения реакции:

- ❖ На обезжиренное стекло нанести каплю физиологического раствора.
- ❖ Внести петлей исследуемую культуру бактерий, равномерно распределить в капле физиологического раствора
- ❖ Добавить каплю специфической агглютинирующей иммунной сыворотки
- ❖ Учесть результат реакции.
- ❖ Положительной считается реакция, когда в капле происходит просветление жидкости и формирование агглютината.

ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ АГГЛЮТИНАТА

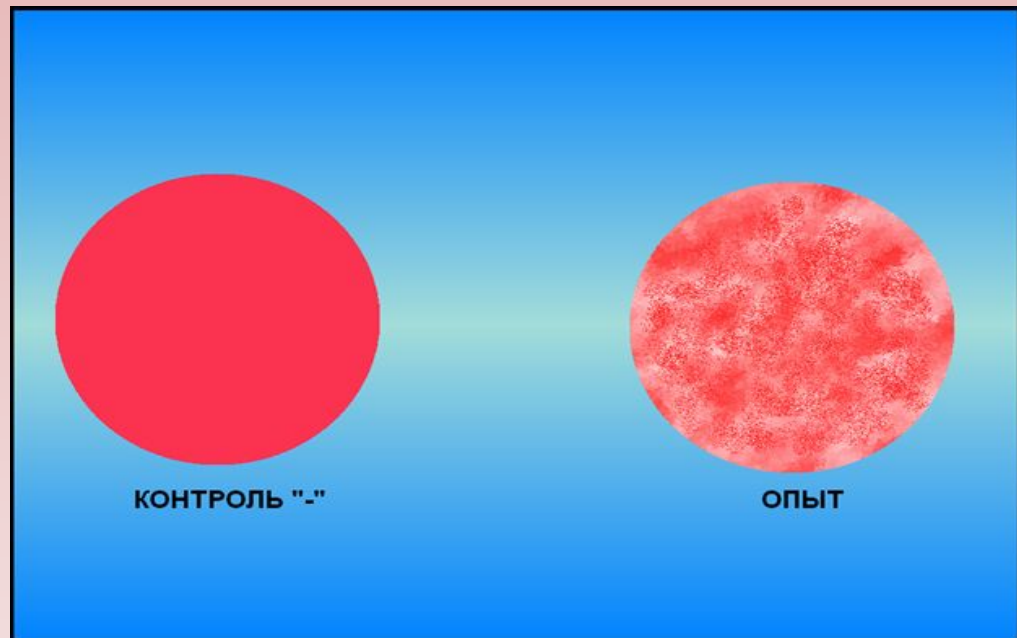
++++	Полная агглютинация: очень большой осадок, полное просветление жидкости. Результат положительный
+++	Неполная агглютинация: осадок такой же, надосадочная жидкость над осадком слегка мутновата. Результат положительный
++	Слабая агглютинация: осадок небольшой, жидкость непрозрачная. Результат слабоположительный
+	Следы агглютинации: осадок маленький, надосадочная жидкость непрозрачная. Сомнительный результат реакции
-	Отрицательная реакция: осадка нет, взвесь равномерно мутная.

МОДИФИКАЦИИ РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ : ЭТО РЕАКЦИЯ МИНКЕВИЧА И РЕАКЦИЯ ХЕДДЕЛЬСОНА.

- ❖ **Реакция Минкевича** позволяет определить наличие противотуляремийных антител у инфицированного пациента.
- ❖ **Необходимые ингредиенты:**
- ❖ **Капля крови пациента, взятая при помощи скарификатора из пальца больного**
- ❖ **Дистиллированная вода**
- ❖ **Туляремийный диагностикум.**

ЭТАПЫ ВЫПОЛНЕНИЯ РЕАКЦИИ МИНКЕВИЧА :

- ❖ На обезжиренное стекло нанести каплю крови пациента
- ❖ Добавить каплю дистиллированной воды для лизиса эритроцитов
- ❖ Внести каплю туляремийного диагностикума
- ❖ Учесть результаты.
- ❖ Положительной считается реакция, если в капле образуются зерна агглютината.

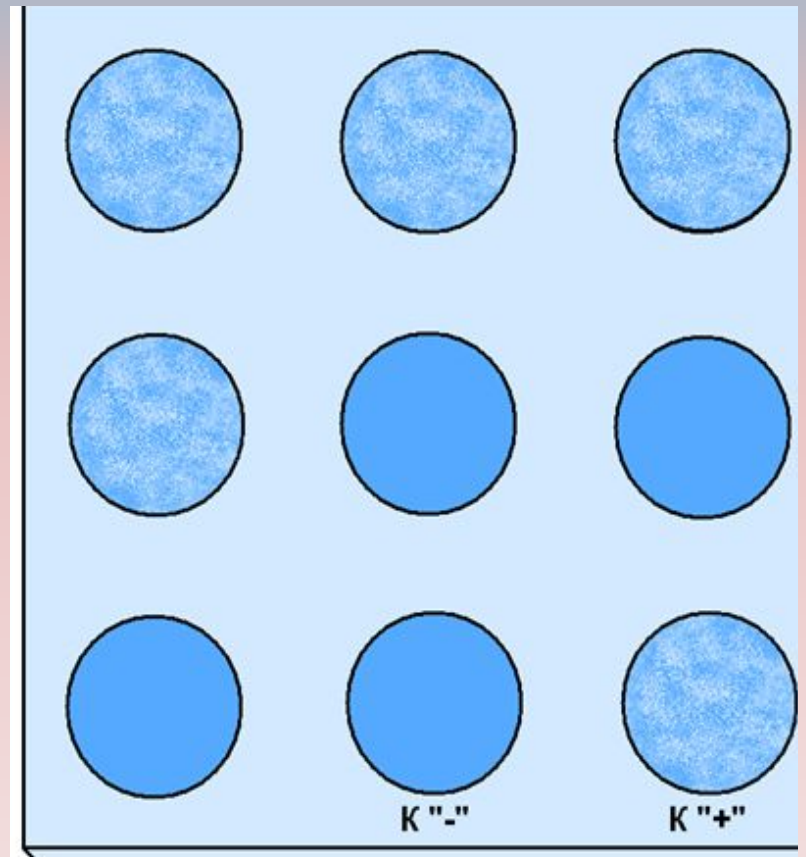


ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ХЕДДЛЬСОНА ПРИ БРУЦЕЛЛЕЗЕ

Реакция Хеддельсона позволяет не только выявить антитела в сыворотке инфицированного бруцеллезом пациента, но и определить титр антител.

Необходимые ингредиенты:

- ❖ Сыворотка пациента
- ❖ Физиологический раствор
- ❖ Бруцеллезный диагностикум



ПРИНЦИП МЕТОДА

- ❖ основан на использовании большого стекла фотопластины,
- ❖ концентрированной неразведённой сыворотки крови больного в нарастающих или уменьшающихся объёмах,
- ❖ дополняемой до определённого уровня физиологическим раствором, что приравнивается к разным разведениям, и
- ❖ окрашенного метиленовым синим диагностикума для лучшей видимости образующегося агглютината.
- ❖ Ускорение реакции достигается смешиванием ингредиентов путём лёгкого покачивания стекла и помещения его в термостат при $+37\text{C}^\circ$.
- ❖ На одном стекле одновременно проводят анализ сывороток от нескольких больных.
- ❖ Результат получают через 2-5 минут в виде голубого агглютината разной активности в зависимости от разведений.

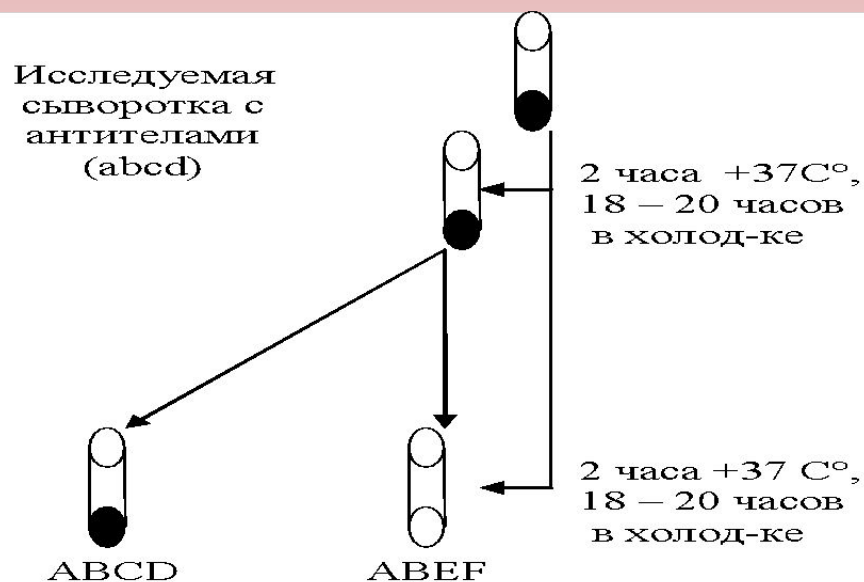
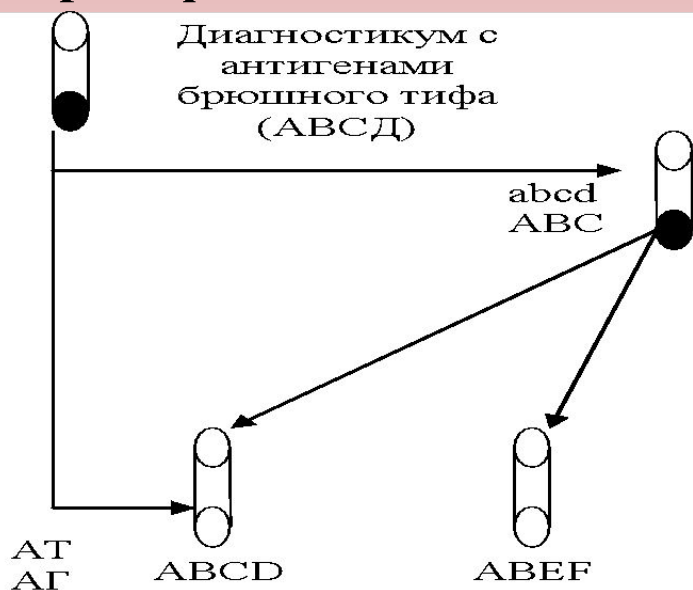
РЕАКЦИЮ АДСОРБЦИИ АГГЛЮТИНИНОВ ПО КАСТЕЛЛАНИ ПРИМЕНЯЮТ ДЛЯ ДЕТАЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИЙ С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ СЕРОВАРА

Данная реакция основана на способности родственных групп бактерий адсорбировать из антисыворотки только групповые антитела при сохранении в ней типоспецифических антител. **Полученные сыворотки называются монорецепторным, так как содержат антитела только к одному определенному антигену.**

При наличии у разных бактерий одинаковых или сходных групповых антигенов они могут агглютинироваться одной и той же антисывороткой, что затрудняет их идентификацию.

Принцип метода:

- ❖ Перекрёстная РА направлена на извлечение групповых антител методом адсорбции
- ❖ специфический антиген (АГ) изымает из сыворотки все антитела — и специфические только для него, и групповые; неспецифический АГ — только групповые.
- ❖ В данной реакции наряду со специфическим антигеном используют родственные гетерологические АГ.
- ❖ Например, у больного брюшным тифом (Т) сыворотка крови дала агглютинацию со специфическим диагностикумом Т и с групповым паратифа А.



РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛАТЕКСА (РАЛ) ЭКСПРЕСС-МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ И АНТИТЕЛ(ОРИЕНТИРОВАЧНЫЙ ВАРИАНТ)

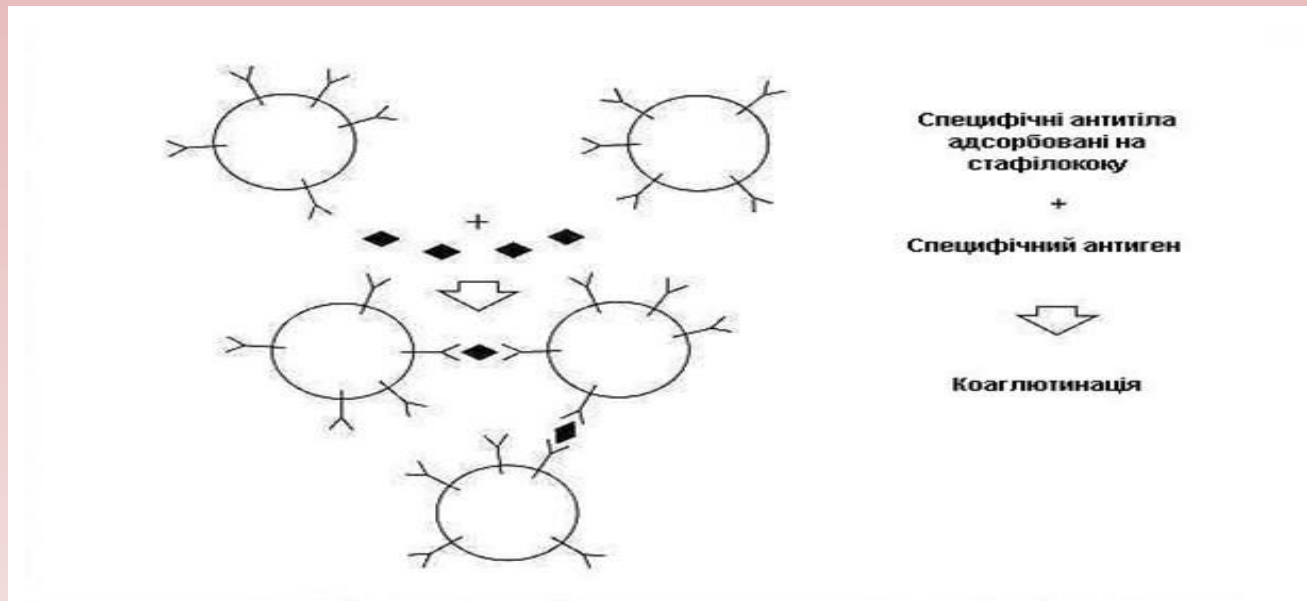
- Для постановки РАЛ используют сенсibilизованные частицы полистиролового латекса диаметром 0,5-1,2 мкм, которые в присутствии гомологичного иммунологического реагента (антигена или антитела) склеиваются. Эта реакция происходит достаточно быстро – на протяжении 2-7 мин.
- *Нагруженные антителами частицы латекса широко используются для выявления антигенов вирусов и бактерий.*
- Нагружая латекс антигенами, можно определять наличие антител в сыворотке больного.
- *Такую модификацию РАЛ используют для выявления противогриппозных, противокраснушных, противокоревых антител и т.д.*

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ЛАТЕКС-АГЛЮТИНАЦИИ



РЕАКЦИЯ КОАГГЛЮТИНАЦИИ (КОА) .

Для постановки КОА используют золотистые стафилококки (штамм Cowan 1). В клеточной стенке этих микроорганизмов содержится белок А, который имеет значительное родство к Fc фрагменту IgG человека и кролика. Поэтому молекулы IgG после адсорбции на стафилококках, которые имеют белок А, ориентированные в окружающую среду своими свободными Fab фрагментами, в которых находится активный центр антитела.



РЕАКЦИЯ КОАГГЛЮТИНАЦИИ (КОА) .

- ❑ Реакцию ставят на стеклянных пластинках, смешивая одинаковые объемы (1-2 капли) исследуемого материала (кровь, моча, слюна, фильтраты фекалий и др.) и стафилококкового диагностикума.
- ❑ Смесь тщательно перемешивают и через 2-5 мин. на тёмном фоне должна четко просматриваться **мелкозернистая агглютинация стафилококков.**

РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ (ПАССИВНОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ НАИБОЛЕЕ ИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

- ❖ Основана на способности антител взаимодействовать с антигеном, фиксированным на различных эритроцитах, которые при этом агглютинируют.
- ❖ Для постановки этой реакции необходимо приготовление эритроцитарного диагностикума.
- ❖ Эритроцитарный диагностикум может быть двух видов: антигенный и антительный.



ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ
ДИАГНОСТИКУМ

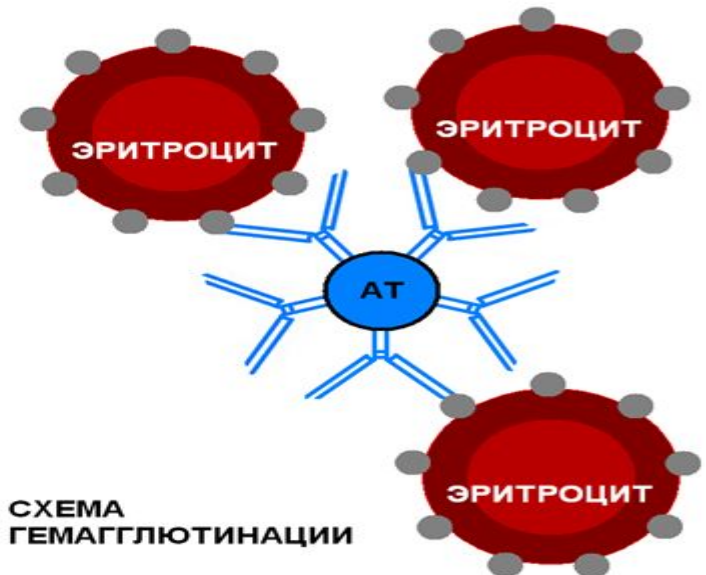


СХЕМА
ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

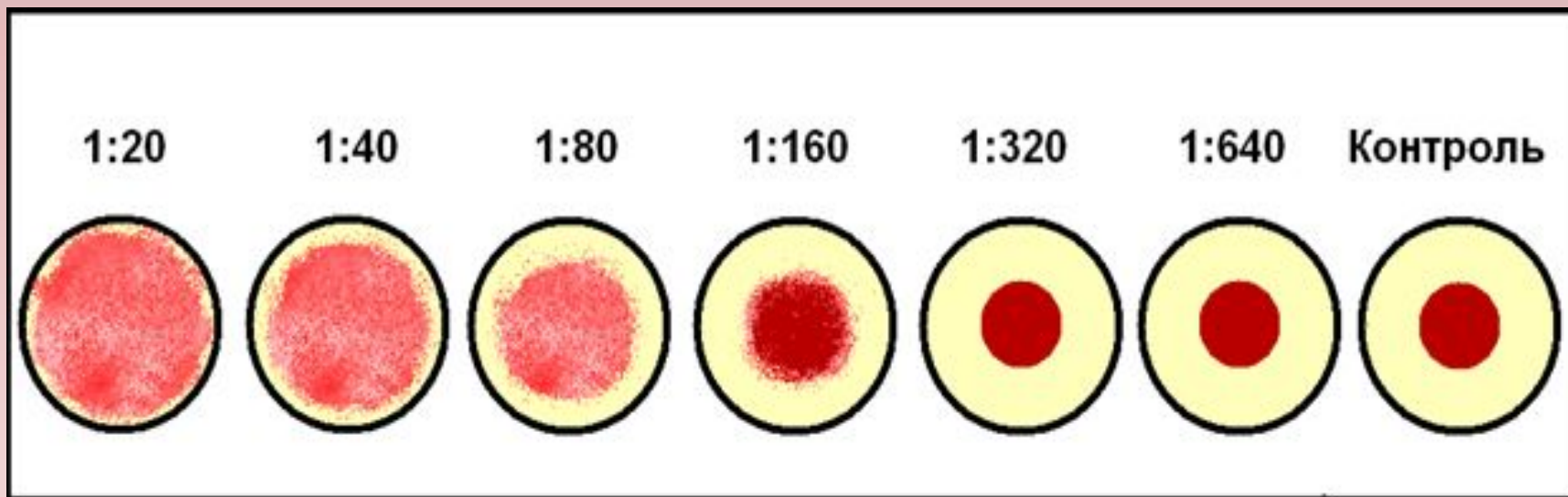
ЭТАПЫ ВЫПОЛНЕНИЯ РЕАКЦИИ:

- Необходимые ингредиенты:**
- Сыворотка крови инфицированного пациента
 - Физиологический раствор
 - Эритроцитарный диагностикум
 - Реакция пассивной гемагглютинации выполняется в лунках иммунологического планшета.
- В лунки планшета внести физиологический раствор в одинаковом количестве -0,25 мл для разведения сыворотки
 - В первую лунку внести сыворотку крови пациента, разведенную в 50 раз в объеме 0,25 мл; перемешать содержимое пипеткой и этой же пипеткой набрать 0,25 мл и перенести в следующую лунку
 - Перемешать содержимое и повторить эту процедуру во всех лунках, предназначенных для проведения реакции.
 - Приготовить контроль, для чего в одну лунку внести 0,25 мл физиологического раствора
 - Во все лунки, включая контрольную, внести по 2 капли приготовленного эритроцитарного диагностикума и перемешать путем осторожного покачивания планшета.

РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ (ПАССИВНОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Положительной считается проба, когда в лунках планшета на дне в контроле эритроциты ложатся в виде «пуговки», а в опытных лунках появляется осадок в виде «зонтика».

Схема постановки и учета РПГА



КРИТЕРИИ УЧЕТА РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

++++	Полная агглютинация: осадок занимает все дно лунки. Результат положительный
+++	Неполная агглютинация: осадок занимает три четверти дна лунки. Результат положительный
++	Слабая агглютинация: осадок занимает менее половины дна лунки. Результат сомнительный
+	Следы агглютинации: осадок небольшой. Сомнительный результат реакции
-	Отрицательная реакция: осадок занимает центральное положение с округлыми краями.

РАЗВЕРНУТЫЕ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ.

- ❖ **Развернутые реакции агглютинации предложены для поиска антител в сыворотках крови инфицированных пациентов при некоторых бактериальных инфекциях.**
- ❖ **При этом применяются диагностикумы, приготовленные из микроорганизмов.**
- ❖ **Для выполнения этих реакций необходимо предварительное титрование сыворотки.**

ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЭТИХ РЕАКЦИЙ НЕОБХОДИМО ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ТИТРОВАНИЕ СЫВОРОТКИ.

Разведение 1:10 это 1мл сыворотки + 9 мл физ. раствора

1:50 это 1 мл сыворотки + 49 мл физ. раствора или

1:50 это 0,1 мл сыворотки + 4,9 мл физ. раствора

1:100 это 1 мл сыворотки + 99 мл физ. раствора или

1:100 это 0,1 мл сыворотки +9,9 мл физ. раствора.

- ❖ В 10 пробирок вносим по 2,5 мл физиологического раствора. 8 пробирок будут опытными, 2 – контрольными: контроль сыворотки и контроль антигена.**
- ❖ В контроль сыворотки вносим только разведенную сыворотку в объеме 2,5 мл, в контроль антигена - только взвесь диагностикума.**

УЧЕТ РЕАКЦИИ

- ❖ Затем во все пробирки, кроме контроля сыворотки, вносим по 1 мл взвеси диагностикума.
- ❖ В результате образования агглютината мутная жидкость в пробирках просветляется, на дно оседает осадок агглютината.
- ❖ Учет реакции начинается с контрольных проб: в контроле сыворотки должна быть прозрачная сыворотка, в контроле антигена - равномерно мутная взвесь диагностикума.
- ❖ Титр РРА учитывается по разведению сыворотки, в которой еще явственно видно формирование осадка агглютината.

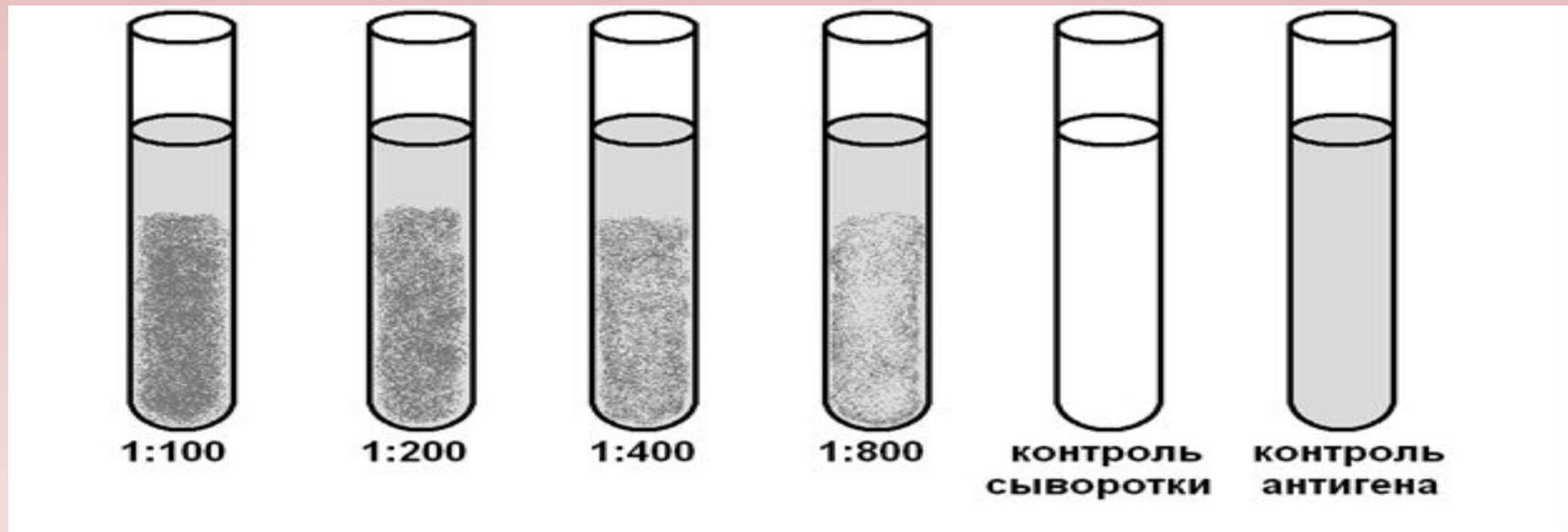


СХЕМА ПОСТАНОВКИ РАЗВЕРНУТОЙ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ С СЫВОРОТКОЙ БОЛЬНОГО ПО ВИДАЛЮ (РАЙТУ)

Ингредиенты	Содержимое пробирок				Контроль	
					Сыворотки	Антигена
Физиологический раствор 0,85 % хлорида натрия, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Сыворотка в разведении 1:50 мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5 (1: 50)	--
Разведения	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	-	
Диагностикум, млрд. микробных тел в 1 мл.	2к	2к	2к	2к	-	2к
В термостат при +37С° на 2 часа, затем на 18-20 часов при комнатной температуре						

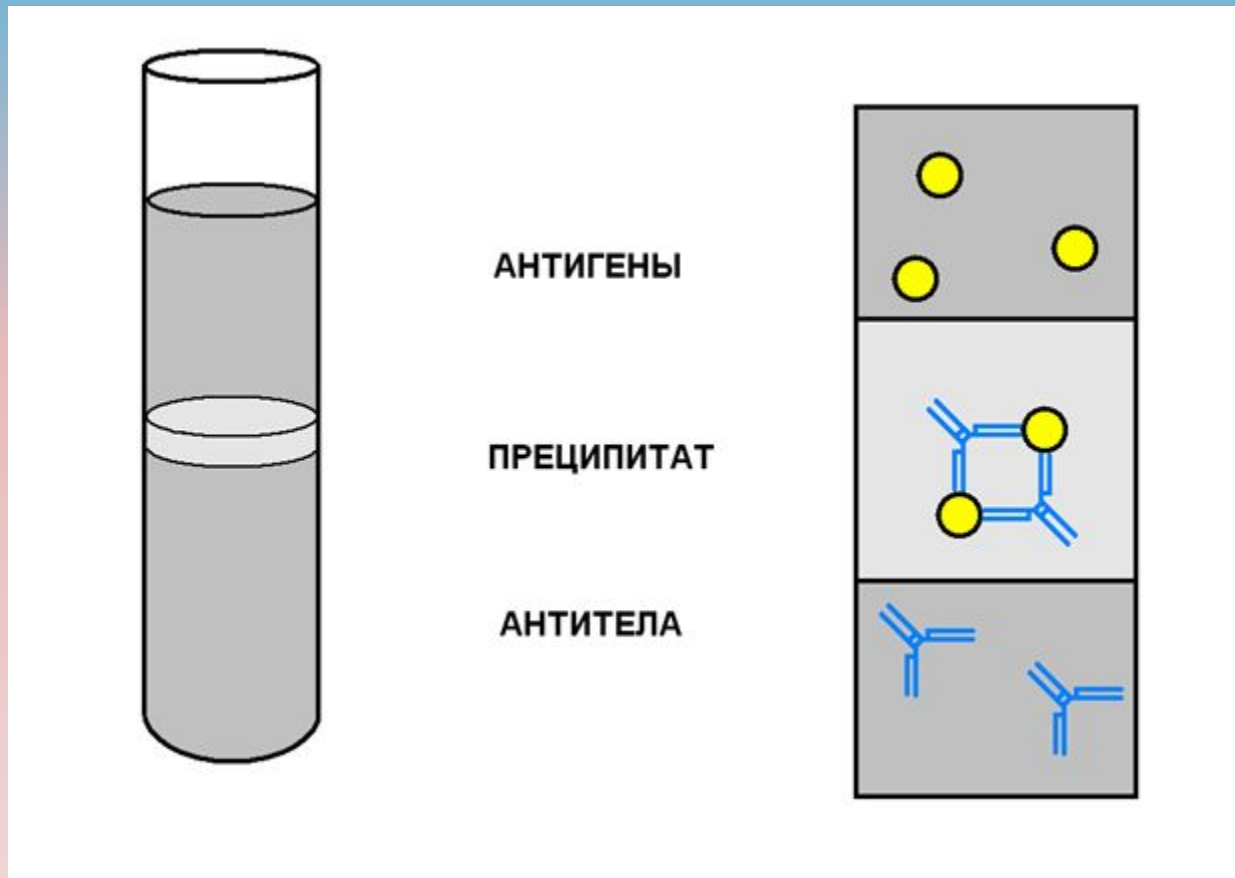
РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ ОТЛИЧАЕТСЯ ОТ АГГЛЮТИНАЦИИ ПО ХАРАКТЕРУ АНТИГЕНОВ:

- ❑ В реакции агглютинации они корпускулярные, даже целые клетки, а в реакции преципитации – молекулярные, в растворимом состоянии.
- ❑ Антигенами могут быть экстракты микроорганизмов, тканей, органов, химические вещества.
- ❑ *Феномен преципитации заключается в том, что антитела (преципитины), соединяясь с растворимыми антигенами (преципитиногенами), определяют образование осадка (преципитата) или помутнения раствора.*
- ❑ За титр реакции принимают наибольшее разведение антигена, которое дает положительный результат.

ФЕНОМЕН ПРЕЦИПИТАЦИИ ШИРОКО ИСПОЛЬЗУЕТСЯ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ:

- ❑ В судебно-медицинской экспертизе его применяют для определения видовой принадлежности крови: можно установить, какому виду принадлежит выявленная кровь.
- ❑ Определяют возможную фальсификацию продуктов (мясо, мед). Для диагностики эпидемического цереброспинального менингита, чумы, дизентерии, определения инфицированности возбудителем сибирской язвы продуктов и материалов животного происхождения (кожа, мех, щетина).
- ❑ Реакцию Ухтерлони используют для определения антигенного состава органов и тканей, как нормальных, так и опухолевых, количества антигенов в сложных системах.
- ❑ Она имеет важное значение в диагностике дифтерии, оспы и других заболеваний.

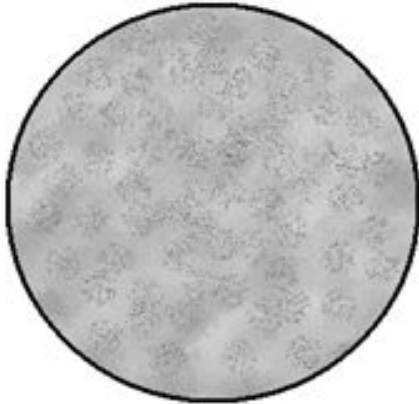
ВЫЯВЛЕНИЕ АГ В РЕАКЦИИ КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ.



РЕАКЦИЯ МИКРОПРЕЦИПИТАЦИИ НА ПРИМЕРЕ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА (ЭДС).

- Данная реакция выполняется для скрининга сывороток при массовых обследованиях на сифилис.
- В качестве антител применяются сыворотки крови пациентов, антигеном служит кардиолипиновый антиген (неспецифический). Реакция выполняется в лунках иммунологического планшета. Необходимо иметь два контроля: в первом в качестве ингредиентов применяется физиологический раствор и кардиолипиновый антиген (контроль мутности), во втором контроле – заведомо положительная сыворотка и кардиолипиновый антиген (контроль преципитата).
- В опытной лунке – изучаемая сыворотка больного, взятая в разведении 1:10 и кардиолипиновый антиген.
- После смешивания реагентов в течение 2-5 минут осторожно покачиваем планшет, в течение этого времени формируется преципитат, жидкость в лунке становится прозрачной.
- Учет реакции ведется по четырех плюсовой системе. Результат, оцениваемый как один и два плюса считается сомнительным, на 3 и 4 ++++ - положительным. Схема реакции микропреципитации представлена на рис. 10.

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА (ЭДС).

		
КОНТРОЛЬ "-"	КОНТРОЛЬ "+"	ОПЫТ
физ. раствор	"+" сыворотка	исследуемая сыворотка
КАРДИОЛИПИНОВЫЙ АНТИГЕН		

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (РЕАКЦИЯ МАНЧИНИ)

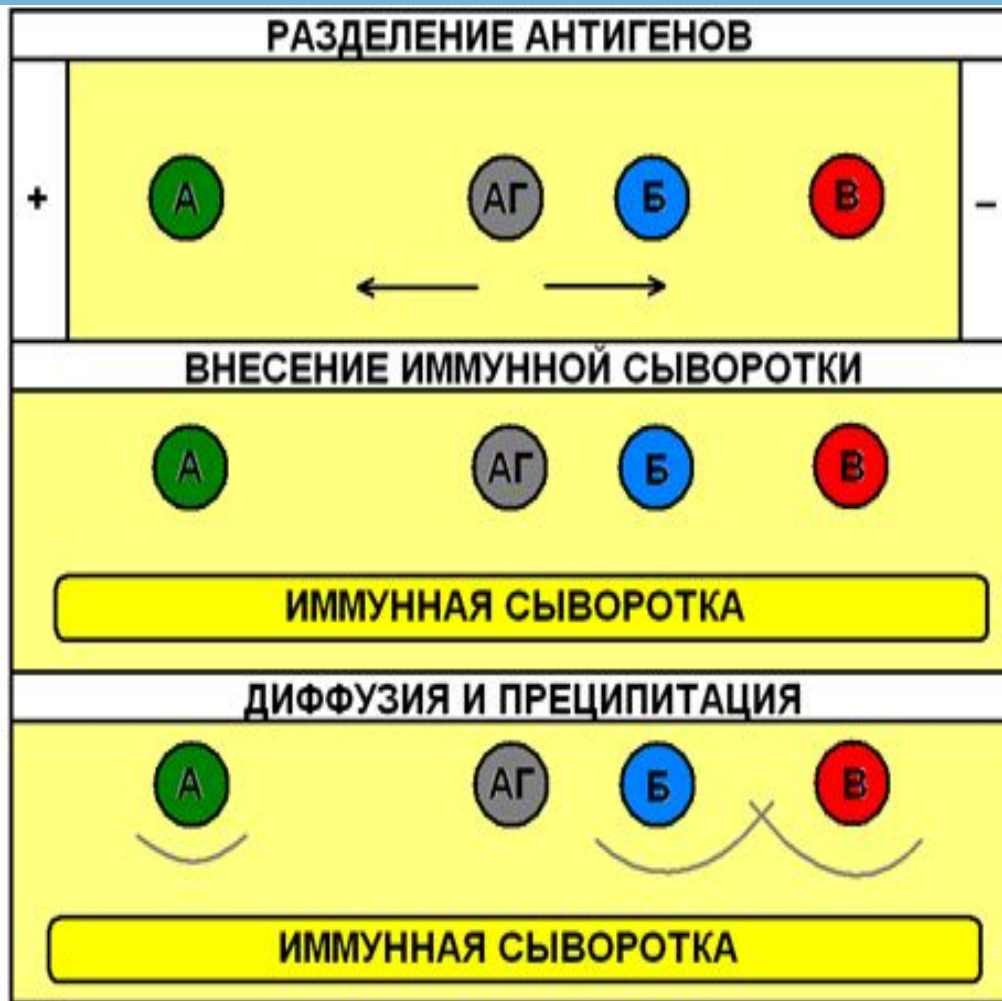
Метод простой линейной иммунодиффузии основан на взаимодействии антисыворотки, содержащейся в геле агар-агара с раствором антигена образуют линии и полосы преципитации.

- ❑ Судя по ширине зон преципитации в тесте простой радиальной диффузии, можно проводить количественное определение антигенов.
- ❑ Взаимное расположение линий преципитации в тестах двойной и встречной иммунодиффузии позволяет оценивать иммунохимическое сходство или различие антигенных компонентов.
- ❑ Методы иммунодиффузии характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью.
- ❑ Обычно тесты иммунодиффузии используют для идентификации белков в биологических жидкостях, таких как сыворотка крови, цереброспинальная жидкость, секреты желез или экстракты различных органов и т. д.

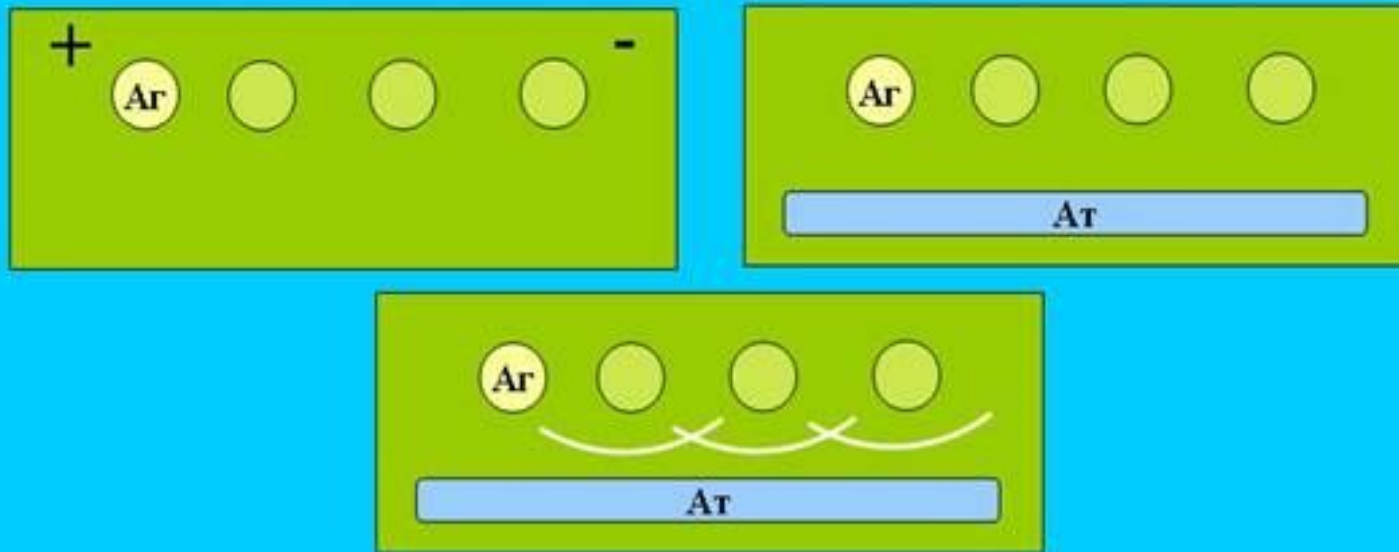
ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

- ❑ **Метод объединяет реакцию преципитации в геле с электрофорезом.**
- ❑ **Для этого слой агара наносят на предметное стекло, на его разных краях вырезают две лунки, а в центре – разделяющую канавку.**
- ❑ **В лунки вносят смесь антигенов и проводят электрофорез в течение 1-2 часов.**
- ❑ **Различные антигены с разной скоростью перемещаются между катодом и анодом.**
- ❑ **Затем в канавку вносят преципитирующую сыворотку и через 5-7 суток в геле образуются зоны преципитации.**
- ❑ **Для лучшей визуализации агар окрашивают красителями (например, амидо черным).**

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИММУНОЭЛЕКТРОФРЕЗА.



ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ



дуги преципитации.

РЕАКЦИЯ БАКТЕРИОЛИЗА

- ❑ **применяется редко, она используется для дифференциальной диагностики холерного вибриона от других холероподобных бактерий.**
- ❑ **В основе реакции лежит способность специфических антител образовывать иммунные комплексы с клетками, в том числе с бактериями,**
- ❑ **что приводит к активации системы комплемента по классическому пути и лизису бактерий.**

В РЕАКЦИИ ГЕМОЛИЗА

- ❑ антигеном служат эритроциты, антителом – антигемолитические антитела.
- ❑ При образовании комплекса антиген-антитело начинается активация комплемента, в результате чего мутная взвесь эритроцитов превращается в ярко-красную прозрачную жидкость – «лаковую» кровь вследствие выхода гемоглобина.
- ❑ При постановке диагностической реакции связывания комплемента (РСК) реакция гемолиза используется как индикаторная: для тестирования присутствия или отсутствия (связывания) свободного комплемента.

РЕАКЦИЯ ЛИЗИСА И СВЯЗЫВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА.

- ❑ Необходимые антиген, антитело и комплемент.
- ❑ Антигеном могут быть микроорганизмы, эритроциты или другие клетки.
- ❑ Как антитело (лизин) используют специфическую сыворотку или сыворотку больного.
- ❑ В зависимости от того, против каких клеток направленное действие лизины, они имеют свои названия:
- ❑ против бактерий - **бактериолизины**, спирохет - **спирохетолизины**, эритроцитов - **гемолизины**, против других клеток - **цитоллизины**.
- ❑ Комплемент при образовании комплекса клетка (антиген) - антитело, связывается с ним, активируется за классическим путем и вызывает растворение клетки.
- ❑ Без комплемента лизис клетки невозможен. Различают несколько реакций лизиса: бактериолиза, гемолиза, цитолиза.

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК).

- ❑ При образовании комплекса антиген - антитело к нему всегда присоединяется комплемент.
- ❑ Если антиген и антитело не отвечают друг другу, то комплемент не связывается, остается свободным в системе.
- ❑ При добавлении комплекса эритроциты барана - гемолизины свободный комплемент, связываясь с ним, вызывает гемолиз эритроцитов.
- ❑ Этот принцип и положено в основу РСК.
- ❑ При соответствии антигена антителу с ним связывается комплемент. Чтобы убедиться в этом, добавляют эритроциты барана и гемолитическую сыворотку.
- ❑ При отсутствии гемолиза заключают, что реакция положительная, при наличии гемолиза - реакция негативная.

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК).

Опытная система

АНТИГЕН

(Бактерия, клетка, вирус и т.
д.)

КОМПЛЕМЕНТ

АНТИТЕЛО

(сыворотка) *Комплемент
связался с комплексом
антиген-антитело*

*Индикаторная гемолитиче
ская система*

ЭРИТРОЦИТЫ

БАРАНА (АНТИГЕН)

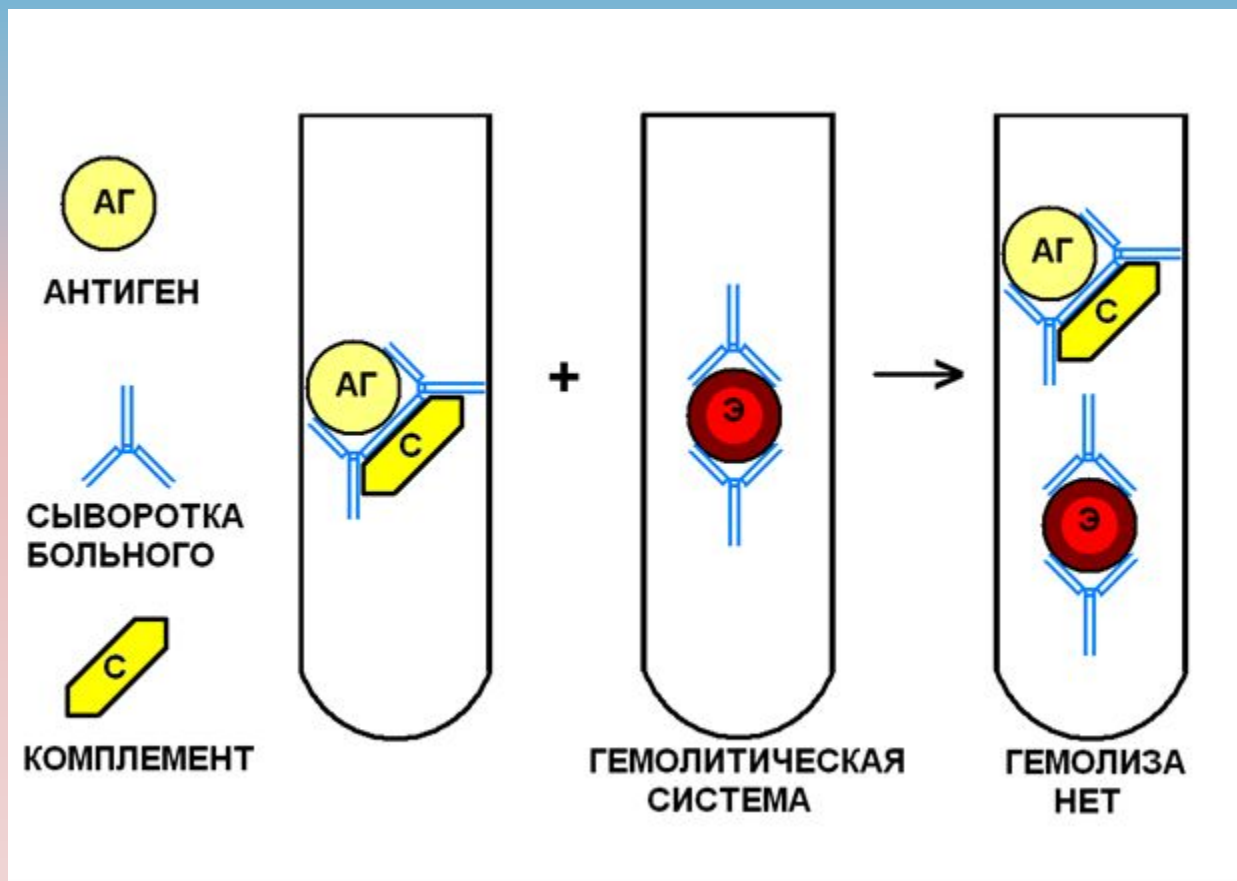
ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ

СЫВОРОТКА (АНТИТЕЛО)

*Комплемент нет - связался
с опытной системой.*

*Без комплемента гемолиз
эритроцитов невозможен.*

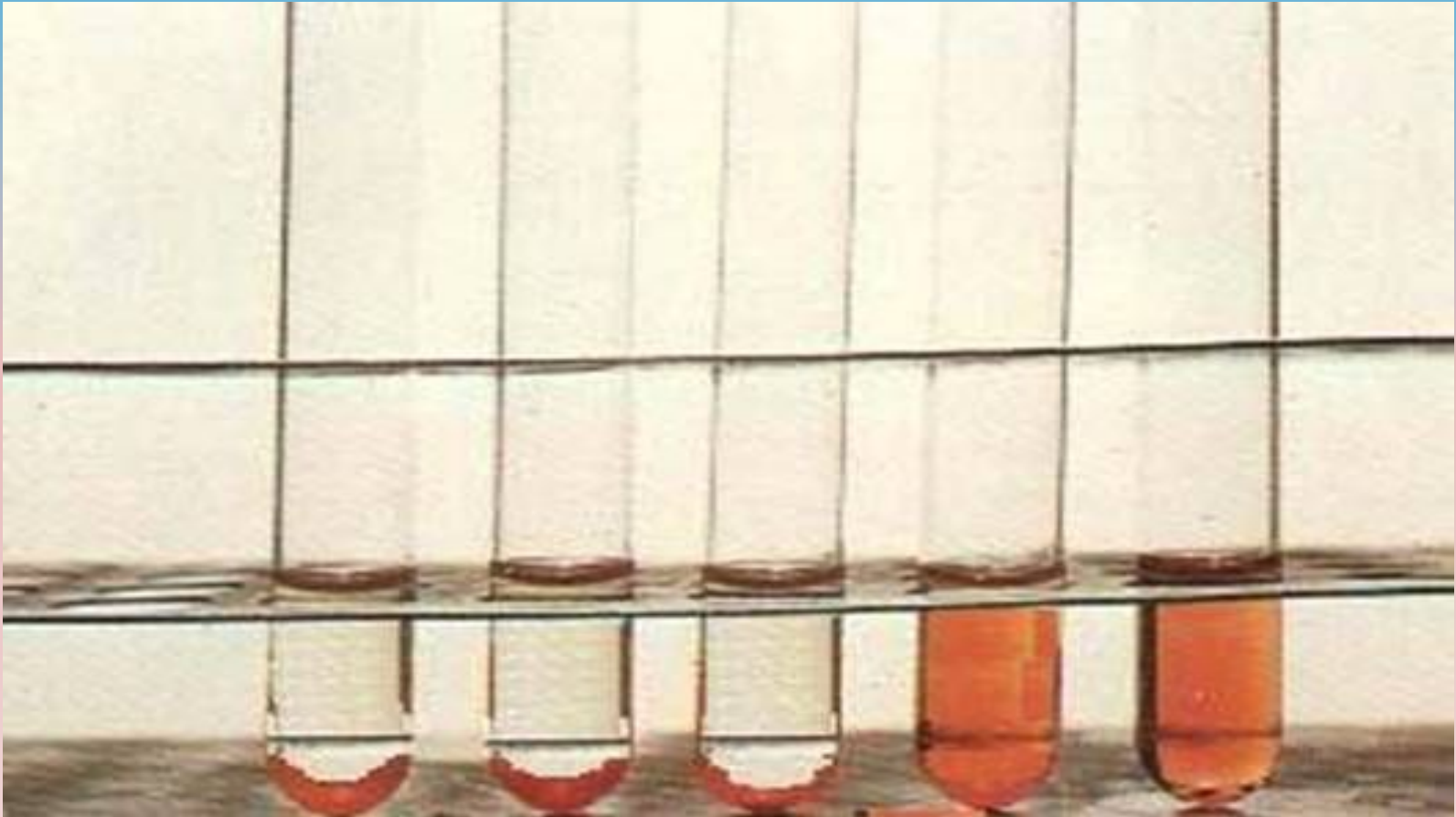
РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК).



Критерии учета результатов реакции

++++	Полная задержка гемолиза, эритроциты в осадке, надосадочная жидкость прозрачная; резко положительная РСК.
+++	Неполная задержка гемолиза, эритроциты в осадке, надосадочная жидкость прозрачная, слабо розового цвета; положительная РСК.
++	Частичная задержка гемолиза, надосадочная жидкость красно-розового цвета, прозрачная; слабо положительная РСК.
+	Осадок незначительный, жидкость красная; сомнительная РСК.
-	Полный гемолиз, прозрачная красная жидкость. Отрицательная РСК.

(PCK)



ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИРЕЗУС - АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ.

- Данная реакция проводится у беременных женщин, имеющих отрицательный резус-фактор.**
- В случае, если у отца ребенка положительный резус-фактор, то у плода возможен как положительный, так и отрицательный резус.**
- Для предотвращения резус-конфликта необходимо знать, образуются ли антирезус-антитела в течение беременности**
- и если они образуются, то идет ли динамика нарастания их титра.**

ДЛЯ ПОСТАНОВКИ ДАННОЙ РЕАКЦИИ НЕОБХОДИМЫ СЛЕДУЮЩИЕ ИНГРЕДИЕНТЫ

- Исследуемая сыворотка**
- Эритроциты человека, несущие положительный резус-фактор (стандартные эритроциты)**
- Комплемент.**
- Этапы постановки теста:**
- В пробирку вносим 1 мл исследуемой сыворотки**
- В каждую пробирку вносим 2% взвесь стандартных эритроцитов**
- Добавляем одинаковое количество комплемента в рабочей дозе.**
- В качестве положительного контроля используем сыворотку, имеющую антирезус-антитела; в качестве отрицательного контроля – заведомо отрицательную сыворотку.**

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТА ВЕДЕТСЯ ПО ГЕМОЛИЗУ:

- В пробирке с отрицательным контролем наблюдаем осадок эритроцитов
- В пробирке с положительным контролем – полный гемолиз, то есть
- равномерно окрашенная в красный цвет жидкость
- В исследуемых образцах при наличии антирезус-антител – полный гемолиз, при их отсутствии – осадок эритроцитов.

РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ВИРУСОВ

- ❑ Реакция широко применяется в вирусологии для определения вида (типа) возбудителя и титра вируснейтрализующих антител.
- ❑ Эти антитела обычно выявляются при смешивании иммунной сыворотки с соответствующим вирусом с последующим введением этой смеси восприимчивым лабораторным животным или заражением культуры клеток.
- ❑ На основании выживания животного в первом случае или отсутствия цитопатического действия вируса во втором судят о нейтрализующей активности сыворотки.

РЕАКЦИЯ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РТГА)

**Основана на свойстве
антисыворотки подавлять вирусную
гемагглютинацию, так как нейтрализованный
специфическими антителами вирус утрачивает
способность агглютинировать эритроциты.**

**РТГА широко применяется для серодиагностики
вирусных инфекций с целью обнаружения
специфических антигемагглютининов**

**и для идентификации многих вирусов по их
гемагглютиниnam (антигенам).**

РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ МЕЧЕНЫХ АНТИГЕНОВ ИЛИ АНТИТЕЛ

- Участвуют меченые антигены или антитела.**
- К ним относятся реакции иммунофлюоресценции,**
- радиоиммунный**
- иммуноферментный методы.**
- По своей чувствительности они превосходят все описанные выше серологические реакции.**

РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (ПО КУНСУ) МЕТОД ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ,

- Для выявления микробных антигенов в тканях использовали меченую диагностическую сыворотку, содержащую антитела к определенным видам (вариантам) микроорганизмов (бактерий, вирусов).**
- Метку антител производят флюорохромами(изотиоцианат флюоресцеина)**

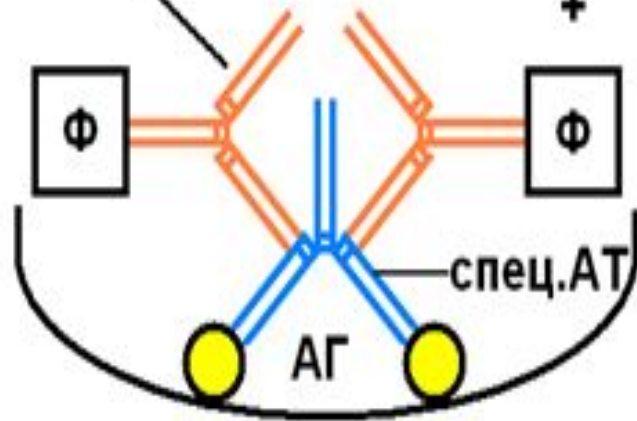
МЕТОД ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА – ИФА

- ❑ включает использование коммерческих реагентов – антигенов или антител, маркированных ферментами (например, пероксидазой или щелочной фосфатазой).
- ❑ Метод выполняется в полистироловых планшетах, где в лунках фиксирован антиген или антитело.
- ❑ После образования иммунного комплекса в систему вносят субстрат, расщепляемый ферментом, что приводит к окрашиванию среды.
- ❑ В отличие от классических методов выявления, ИФА позволяет непосредственно регистрировать взаимодействие антигена с антителом в специфической фазе,
- ❑ а не анализировать вторичные проявления взаимодействия – агглютинацию, преципитацию или гемолиз.
- ❑ Метод отличается высокой чувствительностью – обычно достаточно присутствия антигена в концентрации 1 нг мл.

МЕТОД ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА – ИФА

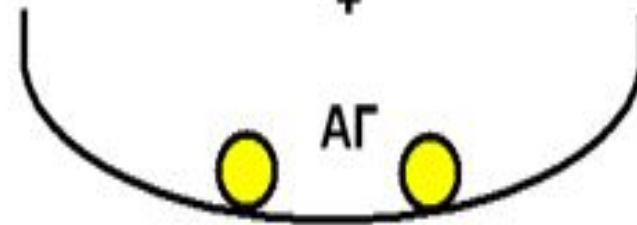
СПЕЦИФИЧЕСКИЕ
АТ к IgG человека

$H_2O_2 +$
+СУБСТРАТ
+



КОНТРОЛЬ +

$H_2O_2 +$
+СУБСТРАТ
+



КОНТРОЛЬ -

ЭТАПЫ ВЫПОЛНЕНИЯ РЕАКЦИИ (НА ПРИМЕРЕ ДИАГНОСТИКИ АНТИТЕЛ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ):

- В лунки полистиролового планшета, на которых сорбирован антиген ВИЧ, вносят сыворотку крови пациентов. Первая лунка предназначена для внесения заведомо положительной сыворотки, вторая – заведомо отрицательной
- Инкубируем планшет во влажной камере в течение 30 минут
- Промываем лунки планшета фосфатно-солевым буфером 5 раз
- Вносим во все лунки антисыворотку, содержащую антитела против иммуноглобулинов человека, меченные ферментом
- Промываем лунки фосфатно-солевым буфером 5 раз
- Во все лунки добавляем субстрат, содержащий перекись водорода и бензидин
- Выдерживаем планшет 20 минут в темном месте
- Проводим визуальный учет результатов и определение оптической плотности раствора в каждой лунке с использованием прибора

МЕТОД ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА – ИФА

- ❑ При правильной постановке анализа в лунке, содержащей положительную контрольную сыворотку, меняется цвет - он становится желтым.
- ❑ В отрицательном контроле цвет прозрачный.
- ❑ Учет результатов опытных образцов зависит от изменения цвета в исследуемой лунке – если он меняется, как в положительном контроле, значит, у данного пациента обнаружены антитела к ВИЧ.

УПРОЩЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИФА «БЕЗРЕАГЕНТНЫЕ» СИСТЕМЫ

- Для проведения анализа необходимо только нанести на носитель образец и визуально наблюдать изменение окраски носителя, происходящее вследствие образования продукта ферментативной реакции.
- Преимущества:
- не используются радиоактивные изотопы,
- стабильность конъюгатов позволяет хранить их в течение длительного времени,
- измерение оптической плотности проводят в оптическом диапазоне,
- результаты ИФА можно оценивать полуколичественно без применения аппаратуры (визуально).
- ИФА очень легко поддается автоматизации.

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ (РИА)

- Преимущество РИА: отсутствует необходимость оценивать протекающую реакцию по вторичным проявлениям, таким как агглютинация, преципитация, лизис эритроцитов .
- 2 варианта:
- меченый и немеченый антигены конкурируют за ограниченное число участков связывания со специфическими антителами.
- Для того чтобы происходило конкурентное взаимодействие, должна существовать определенная степень родства между меченым и немеченым антигеном.
- После двух этапов инкубации антител сначала с исследуемым, а затем со стандартным меченым антигеном
- количество включившегося в состав иммунных комплексов меченого антигена будет обратно пропорционально количеству немеченого антигена в исследуемой пробе..

ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ:

Основные А.

- .Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. -С-П.,2000.
- Медицинская микробиология./ Под ред. В.И. Покровского.М., 2001.
- Л.Б.Борисов.Медицинская микробиология,вирусология, иммунология. М.,2001
- Медицинская микробиология,вирусология /Под ред. А.А. Воробьева.М.2004.