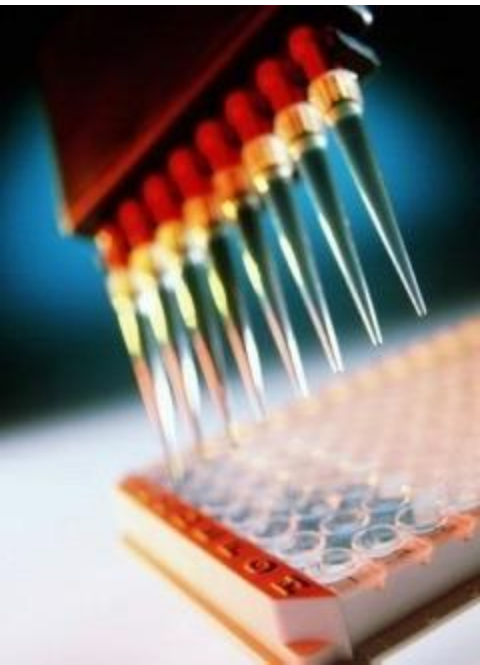




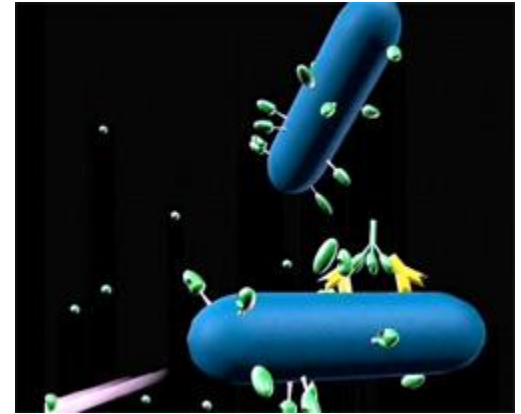
Серологические методы исследования (serum-сыворотка)

Сероидентификация.
Реакция агглютинации



- Серологические реакции – это **иммунные реакции** воспроизводимые **in vitro** т.е. в **лабораторных условиях**
- Серологические исследования широко применяются при:
 - Серодиагностика инфекционных заболеваний,
 - Сероидентификация возбудителя,
 - установления **групп крови**
 - **Определение видовой принадлежности белка.**

- Серологические реакции являются результатом взаимодействия (соединения) **антигена** с соответствующим **антителом**, которое может проявиться **как в условиях плотной среды** (агаровый гель), **так и жидкой**.



Они протекают в две фазы:

- 1) **специфическая** невидимая — непосредственное **соединение антигена с антителом**,
- 2) **неспецифическая** видимая — конечный результат реакции. Реакции проявляются в присутствии **электролитов** (0,85% раствор NaCl) при $t^{\circ} 37^{\circ}$ или другие факторы.

Реакция **агглютинации**

Реакция **преципитации**

Реакция **пассивной** (непрямой)
гемагглютинации (РПГА ;РНГА)

Реакция **связывания комплемента РСК**

Реакция **нейтрализации** токсинов.

Реакция **иммобилизации** (осаждение)
бактерий.

Специфические **опсонизации** бактерий.

Требование к серологическим реакциям :

- 1)Все реакции ставятся по утвержденным прописями
- 2)Используются только те компоненты которые указывают в методике
- 3)Компоненты подготавливают к постановке реакции

- а) Рабочие разведения из нативных препаратов
- б) Рабочие дозы препарата в соответствии с прописью
- 4) Для постановки реакции сыворотку титруют (искл. РП реакции преципитизации, там раститровывают Ag)
- 5) Реакция ставится **с контролем компонентов.**
- 6) Учет реакции **всегда с контролей**, если контроли прочитываются неправильно, такие р-ции **не подлежат учету!!!**
- 7) Компоненты добавляются **в строгой очередности** в соответствии с методикой.

- для **серотипирования (сероидентификации)** возбудителя, токсинов, антигена вообще с помощью **известного антитела (иммунной диагностической сыворотки)**,
- для **серодиагностики** - определения природы антитела в сыворотке крови больного при бактериальных, вирусных, реже других инфекционных заболеваниях с помощью известного антигена (*диагностикума*).

Реакции агглютинации

РА – склеивание и выпадение в осадок **корпускулярных антигенов**, под воздействием **антител** в присутствии электролита.

At – **агглютинин**

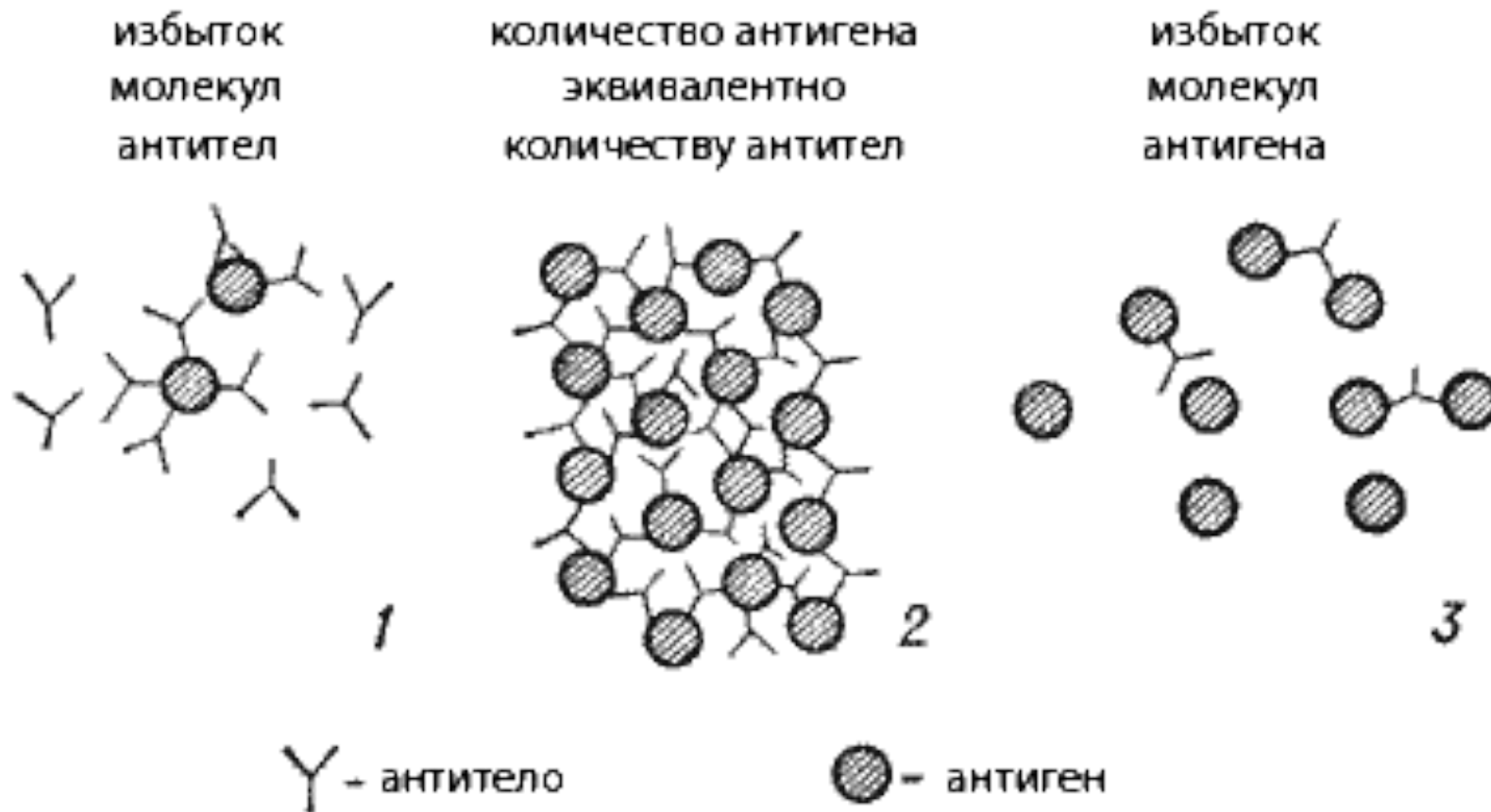
Ag – **агглютиноген (м.к. Er)**

Осадок - агглютинат

Механизм р-ции агглютинации описывается теорией решетки, лежащей в основе образования агглютината

Кол-во At и Ag должно быть оптимальное

Схема образования иммунных комплексов при разном соотношении антиген—антитело:



1 – избыток антител приводит к растворимым иммунным комплексам; **2** – эквивалентное количество антигена и антител ведёт к образованию наибольшего количества преципитата; **3** – избыток антигена приводит к растворимым комплексам.

Спонтанная агглютинация – происходит **без At** и характерны они для **культур R – типа**

С такой культурой РА не ставят

S—R Диссоциация бактерий

Причина: точечные мутации
При пересевах культур на плотных средах



Вместо колоний гладкого типа (smooth) – S-форм – характерных для исходного варианта (I фаза), образуются **шероховатые, с неровным краем колонии (rough) – R-формы (II фаза).**

S - R-диссоциация приводит к изменению других признаков, в частности:

- **агглютинабельности** в бульоне, солевых растворах (**образование устойчивых суспензий**),
- **утрате** капсулы и подвижности,
- **снижению ферментативной активности**,
- **снижение вирулентности, токсигенности, антигенности, иммуногенности, чувствительности к фагам, физ. и хим. факторам**,
- **повышению фагоцитабельности**
- и др.

Виды реакции агглютинации

ОРА – ставится на стекле рабочее разведение сыворотки 1 : 5 или 1 : 25

РРА - развернутые р-ции агглютинации ставятся в пробирках.

Рабочее разведение сыворотки 1:25; 1:50

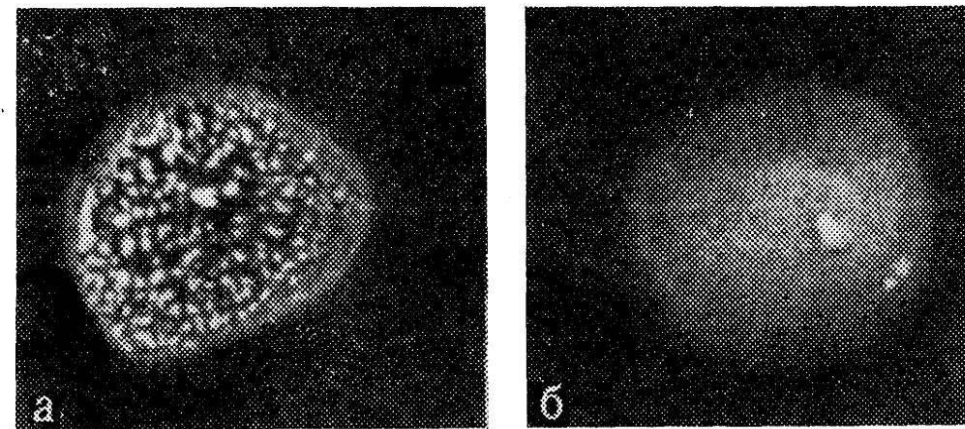
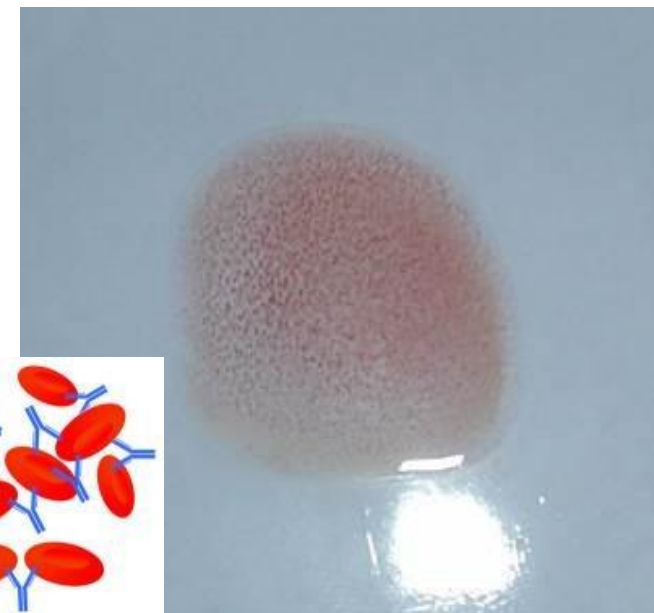
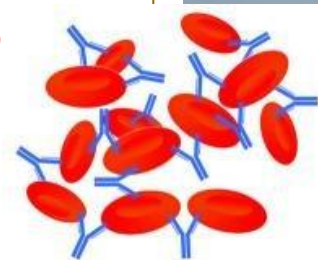
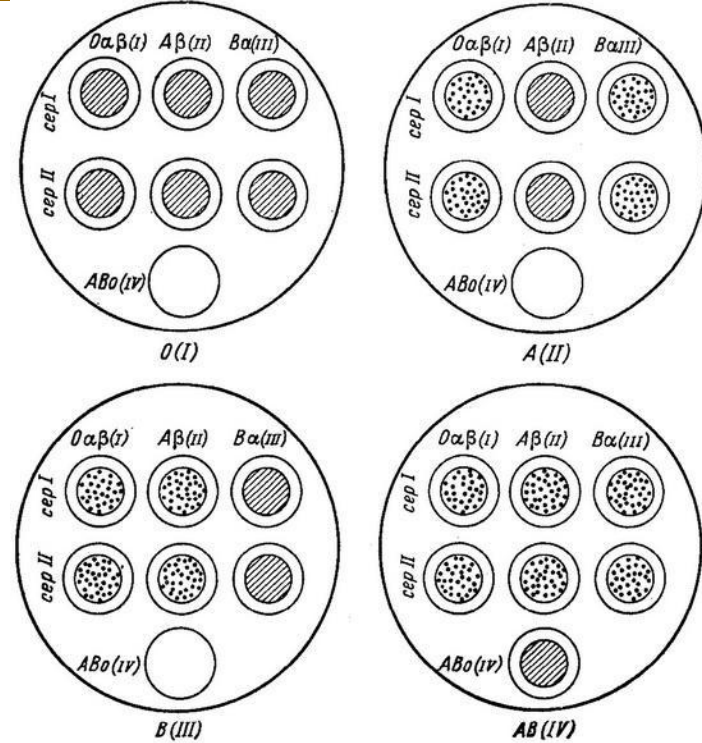


Рис. 35. Реакция агглютинации на предметном стекле.
а – агглютинация; б – отсутствие агглютинации.

- **Систему антигенов АВ0** составляют **три антигена** и **два естественных антитела** — **агглютинины α и β** . Антигены или **агглютиногены А, В, 0**

- **Определение группы крови** человека основано **на реакции агглютинации**, т. е. соединения строго специфического **агглютинина** с антигеном (**агглютиногеном**)

- Для этой цели обычно применяется простая реакция с двумя разными сериями **стандартных сывороток гр 0 (I), А (II) и В (III)**.



Сероидентификация

Определение структуры возбудителя.

Проводится на 2 в основном на **3 этапе**.

Сероидентификация – пред. Неизвестного Ag по известному At.

At – исп. Диагностические сыворотки их получают на производстве

Диагностические сыворотки

- Применяются **для обнаружения антигенов** (определения вида и типа микроба или вируса)
- Различают:
 - **агглютинирующие,**
 - **преципитирующие**
 - **лизирующие (комплементсвязывающие).**
- Классификация основана на функциональной способности **специфических гамма-глобулинов**
 - **склеивать (агглютинировать),**
 - **осаждать (преципитировать),**
 - **растворять (лизировать)** соответствующие антигены.

Этапы получения:

- 1) Гипериммунизация животного (лошадь, баран, кролик) животное многократно иммунизируют одной и той же вакциной для увеличения титра антител в сыворотки крови животного

2. Натощак у животного берут кровь.

Образование тромба 37С t 30-60 минут.

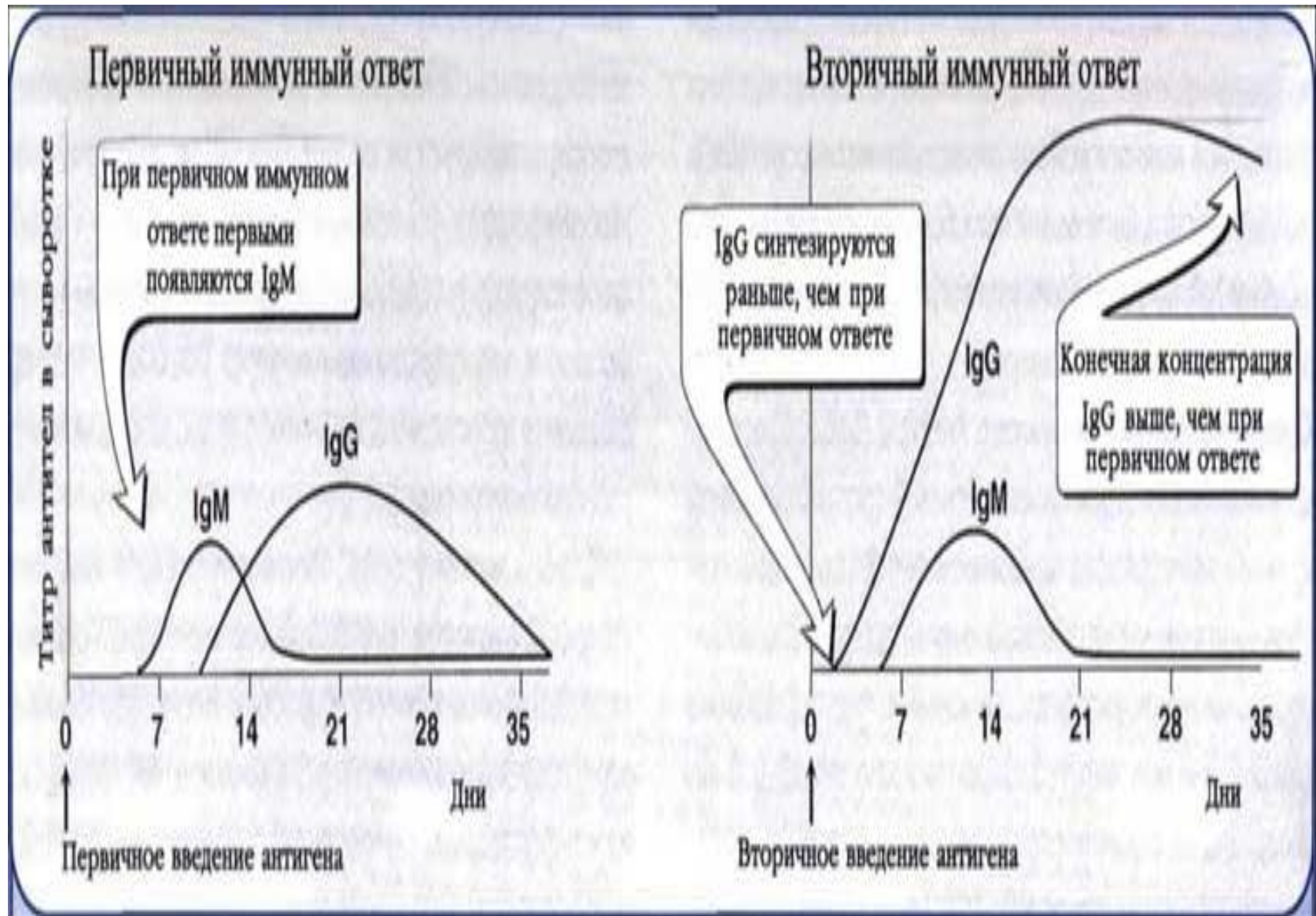
Уплотнение тромба – центрифугирование, холодильник не более 28 часов. **Слив сыворотки.**

Сыворотка должна быть бледно желтого и совершенно прозрачная. Распределение стерильно в ампулы и подвергают **лиофильной сушке при -50С.**

Ат не разрушаются, не теряют свои свойства

Ампулы, маркируются.

Антителобразование при первичном и вторичном иммунном ответе - Иммуногенез



Для такого типа р-ции, для идентификации такого возбудителя. Первичный обмен характерен для сыворотки.

- Ампулы устанавливают по 10 штук, в аннотации к сыворотке указан титр сыворотки.

Характеристика сыворотки по количеству At

- **1) Поливантные сыворотки** содержат различные виды At. Например: групповые, видовые, типовые.
- **2) Адсорбированные сыворотки** – это сыворотки в которых часть At удалены

методом адсорбции. Адсорбирование сыворотки могут быть

- а) поливалентные
- б) монорецепторные

Титр - диагностической сыворотки
наибольшее ее **разведение** при котором происходит серологическая **реакция**
видимые глазом – указываются в аннотации.

Подготовка сыворотки к работе:.....

для чего необходимо знать титр диагностики.

- 1) При постановке РРА сыворотки. Титруется до ее титра указ. в аннотации.

- 2) Для оценки результатов РРА

Виды агглютинации

- 1) **О – агглютинации** аггл. **безжгутиковые** м/о агглютинат плотной зернистой на дне.
- 2) **Н – агглютинация** - **Жгутиковых** м/о, протекает быстрее аггл. рыхлая

Учет РРА – осуществляется по 4-х крестной системе (очень субъект.сист)

XXXX – агглютенат занимает все дно пробирки и даже может доходить на стенки

XXX – агглютинат 75% площади дна

XX – 50% от площади

X – сомнительная не учитывается.

- агглютинат отсутствует

Учет РРА с целью сероидентификации

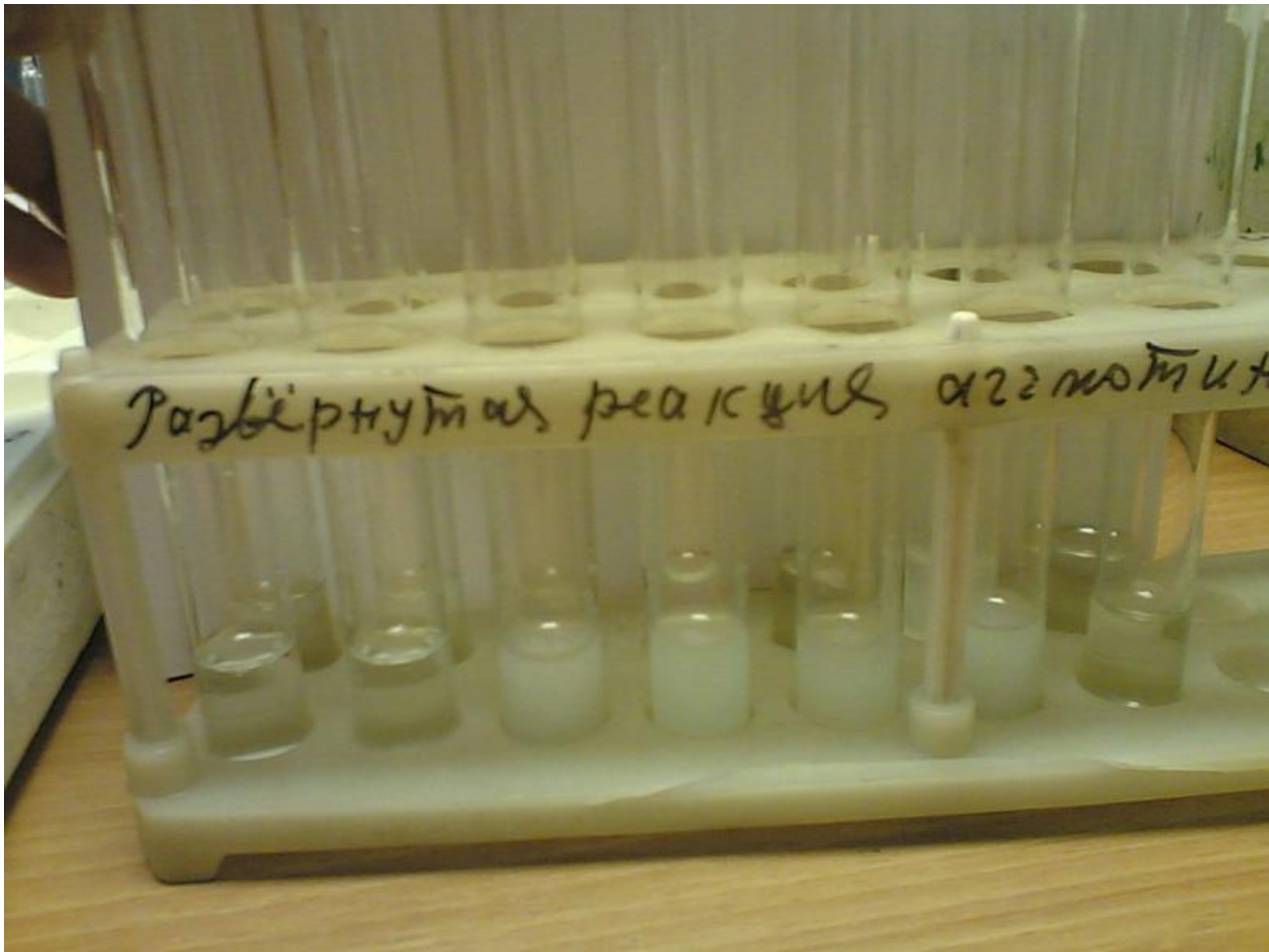
РРА считается положительно при наличии агглютинации не менее 2-х крестов в половине титра сыворотки.

Пример: титр 1:3200 смотреть аннотацию половине титра 1:1600. Таким образом р-ция будет положительной при 2-х крестах.

В р-ра Ag исп. в виде смыва, который готовят со скоса: к культ. + 5 мл физ. раствора в соответствии с 10 стандартной мутности, 1 мл смыва содержит 1 микр. клеток.

Во все опытные пробирки по 2 капли смыва.

Разбери́тый реакци́я азотом





- **Учет** реакции развернутой агглютинации производят, оценивая последовательно каждую пробирку, начиная с контрольных, при осторожном встряхивании. В контрольных пробирках агглютинации не должно быть. Интенсивность реакции агглютинации отмечают следующими знаками:
++++ - полная агглютинация (хлопья агглютината в абсолютной прозрачной жидкости); **+++** - неполная агглютинация (хлопья в слабоопалесцирующей жидкости); **++** - **частичная агглютинация** (хлопья четко различимы, жидкость слегка мутная); **+** - слабая, сомнительная агглютинация - жидкость очень мутная, хлопья в ней плохо различимы; **—** - отсутствие агглютинации (жидкость равномерно мутная).
За **титр** сыворотки принимают **последнее ее разведение**, в котором интенсивность агглютинации оценивается не менее чем два плюса (++)

Таблица 16 Титрование исследуемой сыворотки (форма протокола)

Ингредиенты, мл	№ пробирки					Контроль	
	1	2	3	4	5	анти-гена	сыво-ротки
Изотонический раствор хло-рида натрия	1	1	1	1	1	1	—
Исследуемая сыворотка в раз-ведении 1 : 50	1 →	1 →	1 →	1 →	1 ↓	—	1
Полученное разведение сыво-ротки	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600		
Взвесь бактерий, капли	2	2	2	2	2	2	

Инкубация при 37°C в течение 2 ч с последующим выдерживанием при ком-натной температуре до следующего дня

Результаты							
------------	--	--	--	--	--	--	--