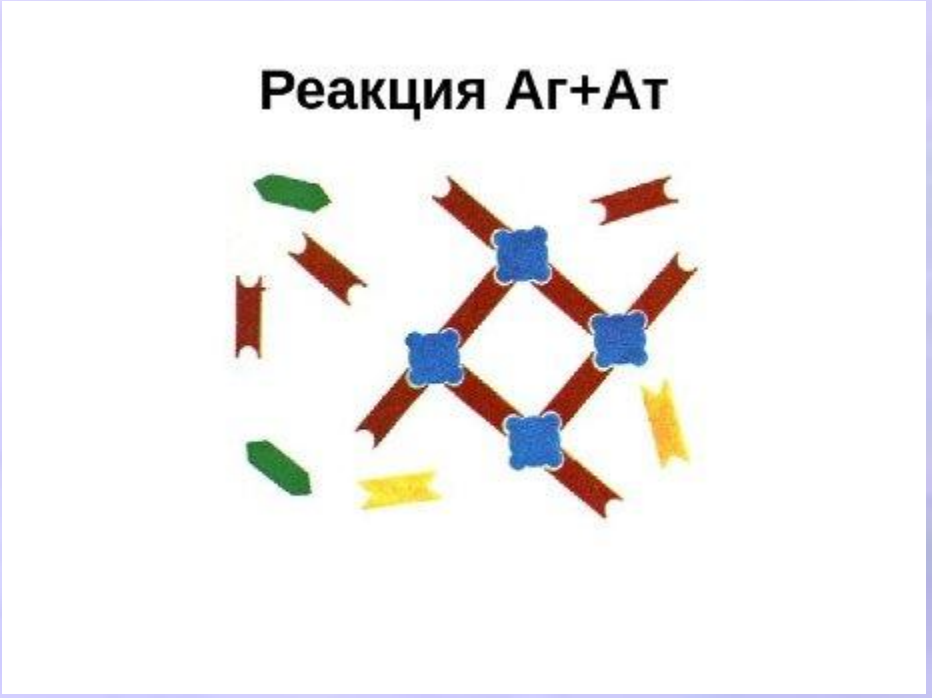
Серологический метод исследования

Серологический метод исследования

Серологические или иммунологические реакции - это специфические реакции взаимодействия между антигеном (АГ) и антителом (АТ).



Серологические реакции

Всегда протекают в две фазы:

<u>I фаза специфическая</u> – характеризуется образованием специфического комплекса АГ + АТ, видимых изменений нет.

<u>II фаза неспецифическая</u> – в эту фазу, образовавшийся комплекс АГ + АТ, взаимодействует с неспецифическими факторами среды (фагоцитами, комплементом, электролитом), при этом есть видимые изменения в виде склеивания клеток (проявляется осадок), их растворения и др.

I II

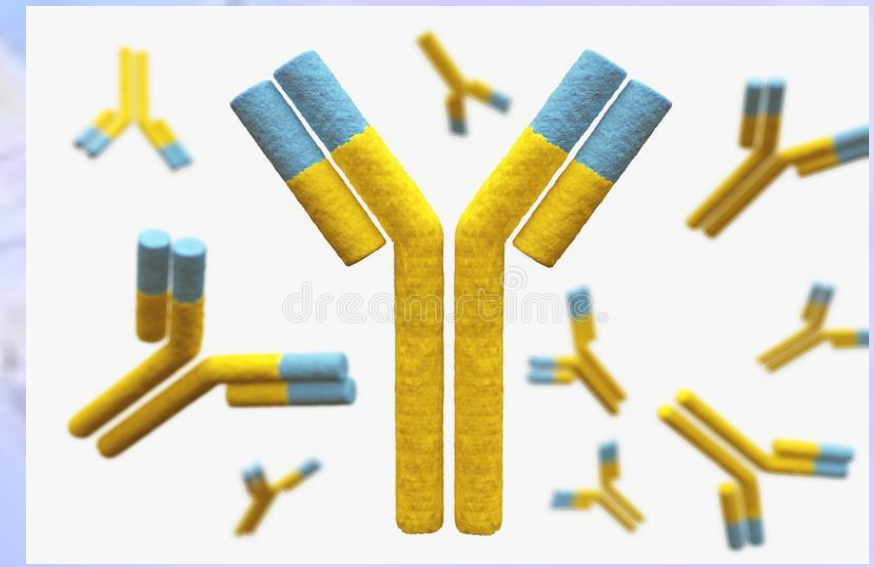
Виды серологических реакций

1. Реакция агглютинации - РА
2. Реакция непрямой гемагглютинации – РНГА
3. Реакция преципитации – РП
4. Реакция нейтрализации – РН
5. Реакция иммунного лизиса – РИЛ
6. Реакция связывания комплемента – РСК
7. Иммуноферментный анализ – ИФА

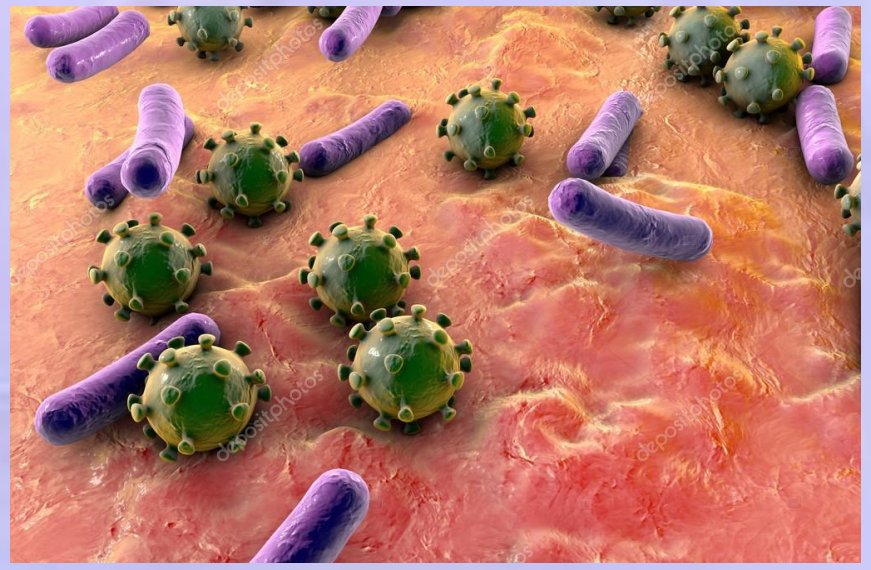
и другие.

Цель серологических реакций:

1. **Выявление антител (АТ) в сыворотке крови больного – это называется *<u>серодиагностика</u>***



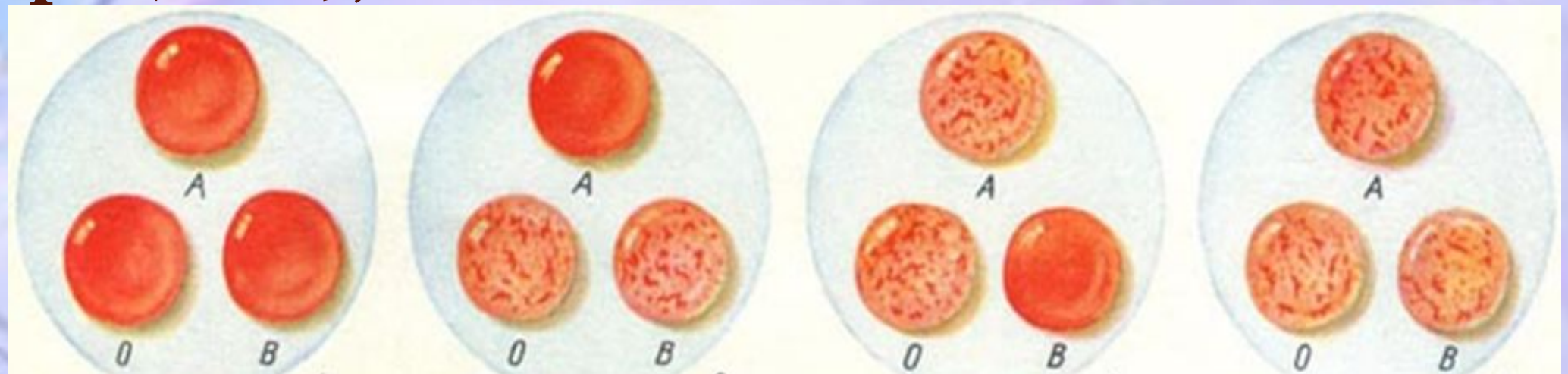
2. **Определение вида возбудителя (АГ) – это называется *<u>идентификация</u> возбудителя (АГ)***



Реакция агглютинации (РА)

Это склеивание клеток (АГ) воздействием иммунных сывороток (АТ) в присутствии электролита.

РА проявляется в виде хлопьев или осадка, состоящих из клеток (АГ) (например бактерий, эритроцитов), "склеенных" антителами.



Реакция агглютинации (РА)

Для постановки реакции агглютинации (РА) необходимы три компонента:

1) <u>антиген</u> - взвесь в изотоническом растворе (физ. растворе) убитой микробной культуры

2) <u>антитело</u> - сыворотка больного

3) <u>электролит</u> - изотонический раствор натрия хлорида (физ. раствор)

1) АГ

в пробирке равномерная муть

2) АТ

прозрачная

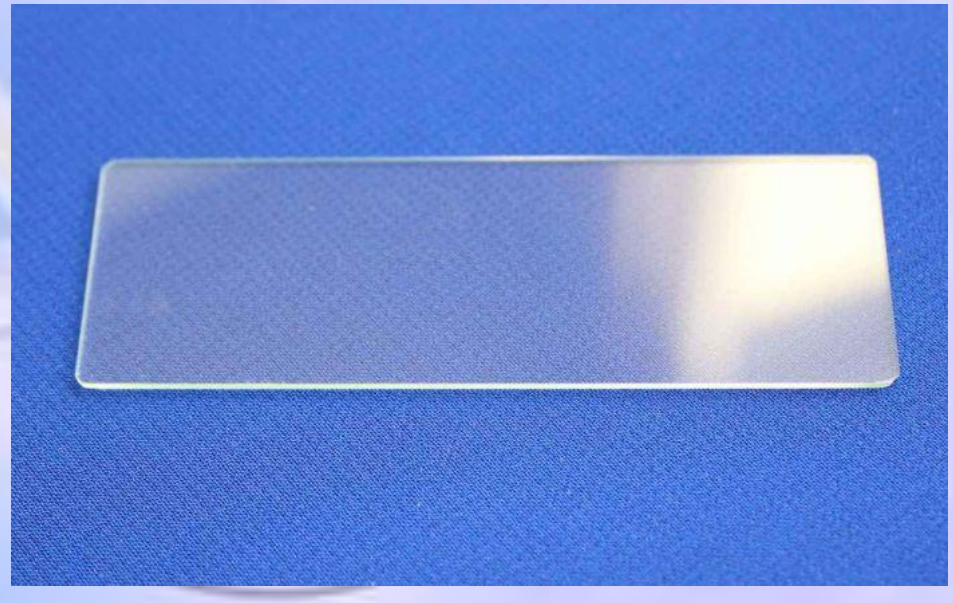
3) электролит

прозрачная

Реакция агглютинации (РА)

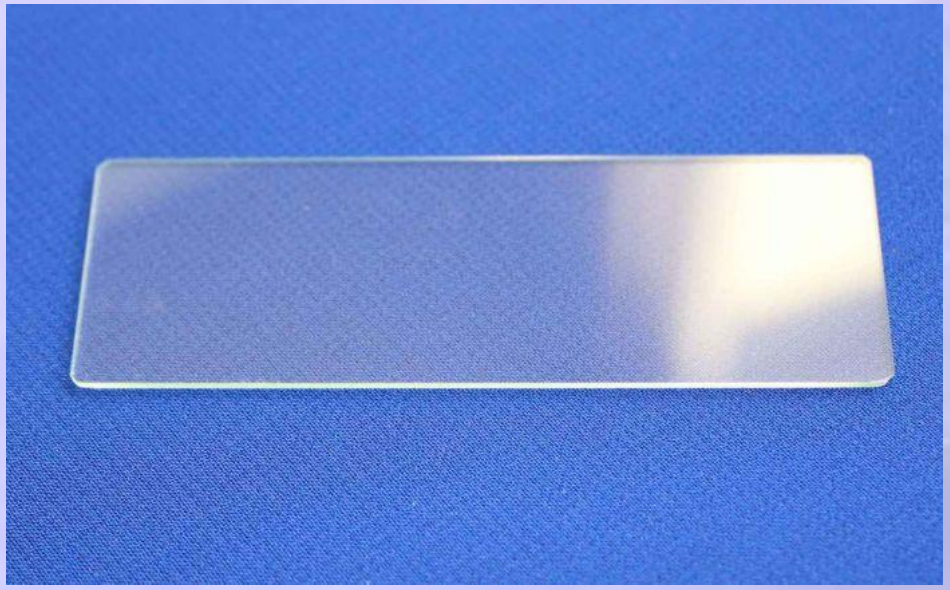
Различают два метода постановки РА:

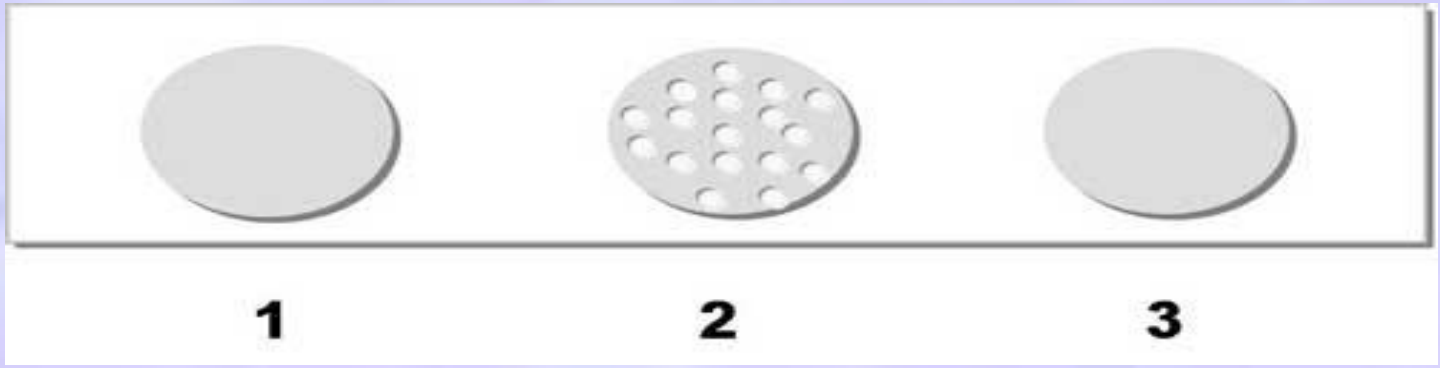
1. **РА на стекле (ориентировочная)**
2. **Развернутая РА в пробирках**



Реакция агглютинации (РА) на стекле

Пример:
Постановка ориентировочной реакции агглютинации (РА) на стекле с целью идентификации бактерий кишечной группы.





На предметное стекло наносят 3 капли:
1-ая капля: - сыворотка – контроль АТ (прозрачная)
2-ая капля: - сыворотка (прозрачная)
3-я капля: - изотонический раствор (электролит) - контроль АГ (прозрачная)
Добавляют во 2 и 3 каплю исследуемую чистую культуру бактерий (АГ), перемешивают, обе капли становятся равномерно мутными.
Результат оценивают по 2-ой капле через 3 – 5 минут.
Результат : *положительный* - наличие хлопьев агглютината, *отрицательный* - отсутствие хлопьев агглютината (в капле равномерная муть)

Агглютинация на стекле

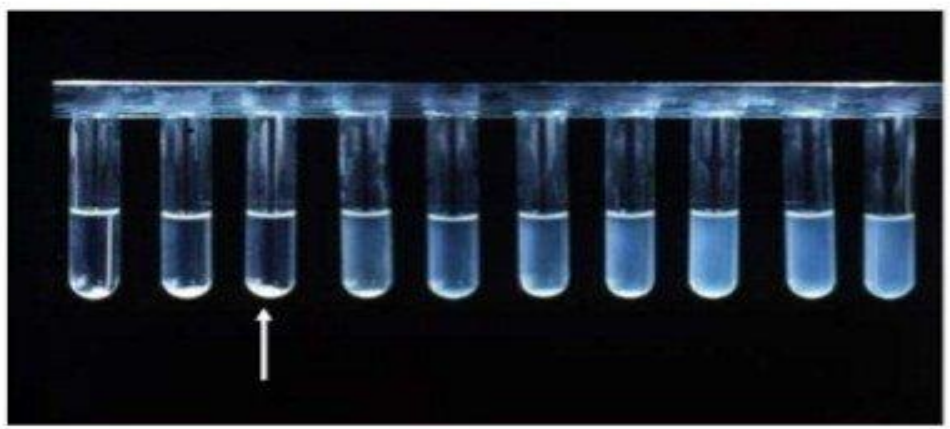
Если ориентировочная РА на стекле положительная проводится развернутая РА в пробирках.

Развернутая РА

- используется в основном для обнаружения антител в сыворотке больного

Постановка реакции:

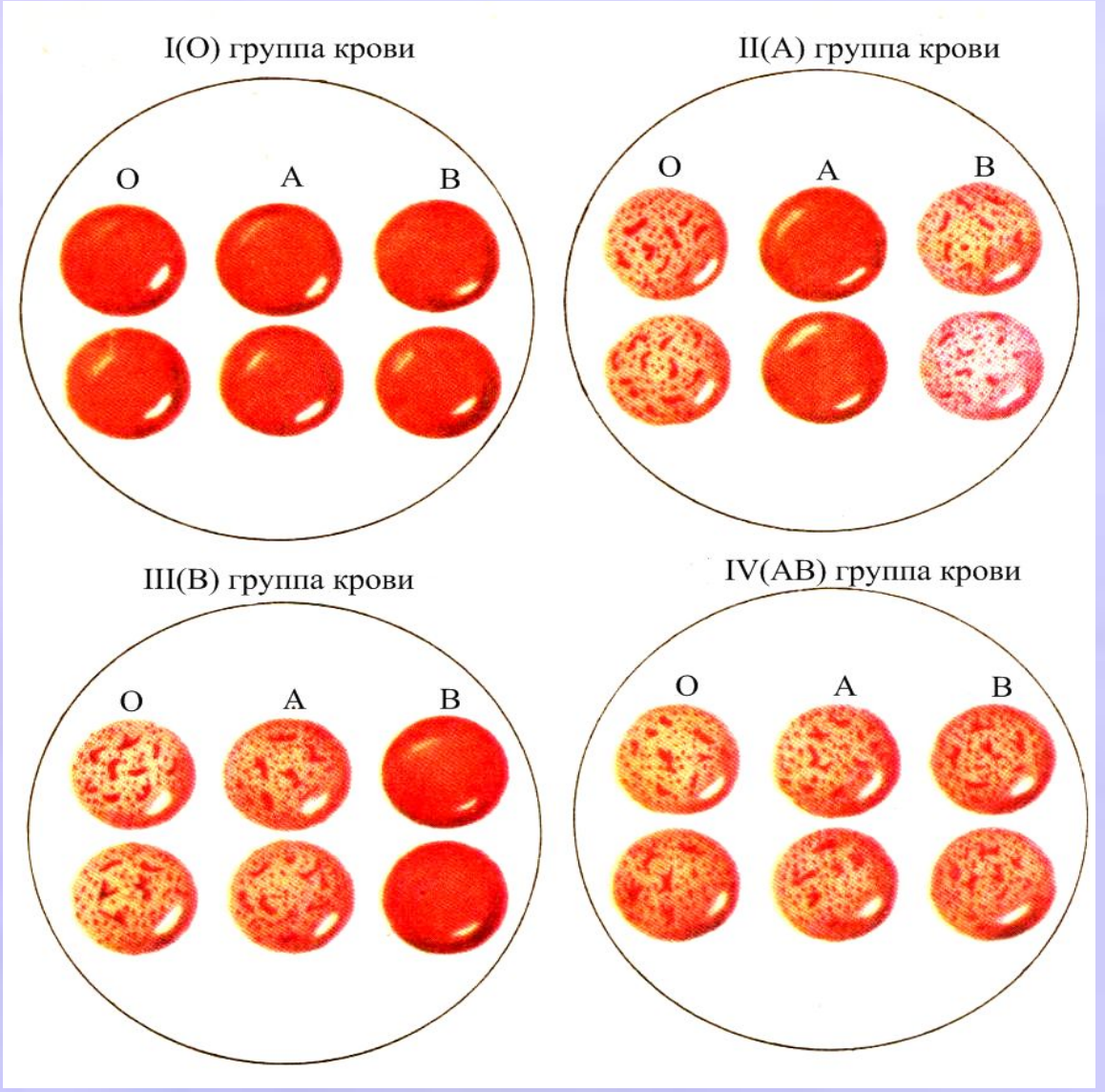
- Развернутую РА проводят в пробирках или лунках пластин.
- При этом готовят десятикратные разведения исследуемой сыворотки и вносят одинаковые количества антигена.
- При положительном результате на дне пробирки образуется рыхлый осадок и сам раствор становится прозрачным,
- отрицательный результат- помутнение раствора сохраняется



«+» «-»

Реакция агглютинации (РА)

РА применяют для диагностики брюшного тифа, паратифов, бруцеллеза, а также для определения групповой принадлежности крови.



Реакция непрямой гемагглютинации – РНГА

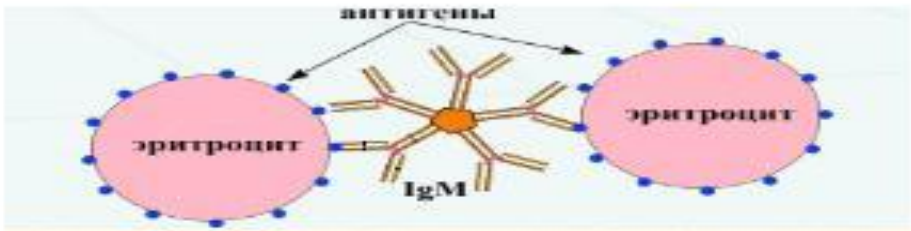
Это склеивание эритроцитов с нагруженными на них микробными клетками (АГ) воздействием иммунных сывороток (АТ) в присутствии электролита.

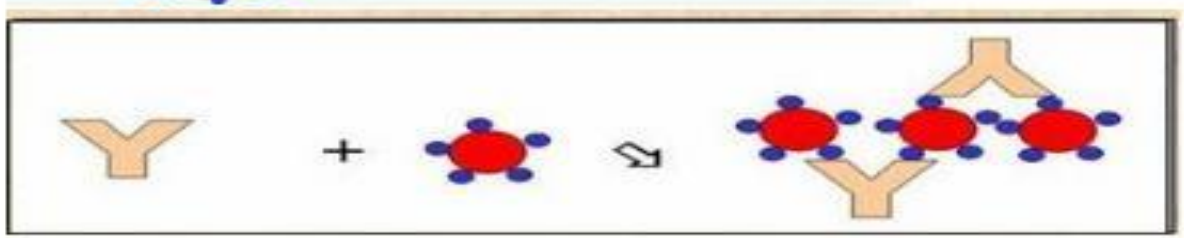
РНГА применяют при диагностики вирусных инфекций (например, гриппа, кори) для идентификации вирусов, а также для выявления противовирусных антител в сыворотке крови больных.

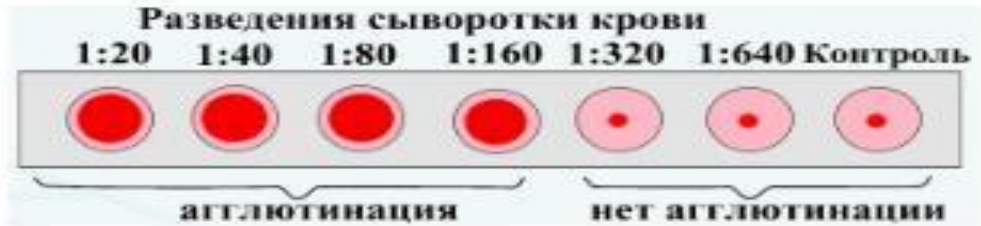
Реакция непрямой гемагглютинаци

Компоненты реакции:
1. Эритроцитарный диагностикум (эритроциты с адсорбированными на них антигенами)
2. Исследуемая сыворотка
3. Физраствор

РНГА ставят в пластиковых планшетках с разведениями сыворотки крови больного, к которым добавляют эритроцитарный диагностикум.







Постановка и учет РНГА.

Реакция положительна, если образуется фестончатый осадок (“кружевной зонтик”).

Реакция отрицательна при образовании осадка в виде пуговки.

Реакция преципитации РП

Это осаждение клеток (АГ) воздействием иммунных сывороток (АТ) в присутствии электролита.

Различают два метода постановки РП:

1. **Кольцепреципитация**
2. **РП в агаре**

Компоненты как при РА:

1) <u>антиген</u> - взвесь в изотоническом растворе убитой микробной культуры

2) <u>антитело</u> - сыворотка больного

3) <u>электролит</u> - изотонический раствор натрия хлорида

Постановка реакции кольцепреципитация для обнаружения возбудителя сибирской язвы

Постановка:

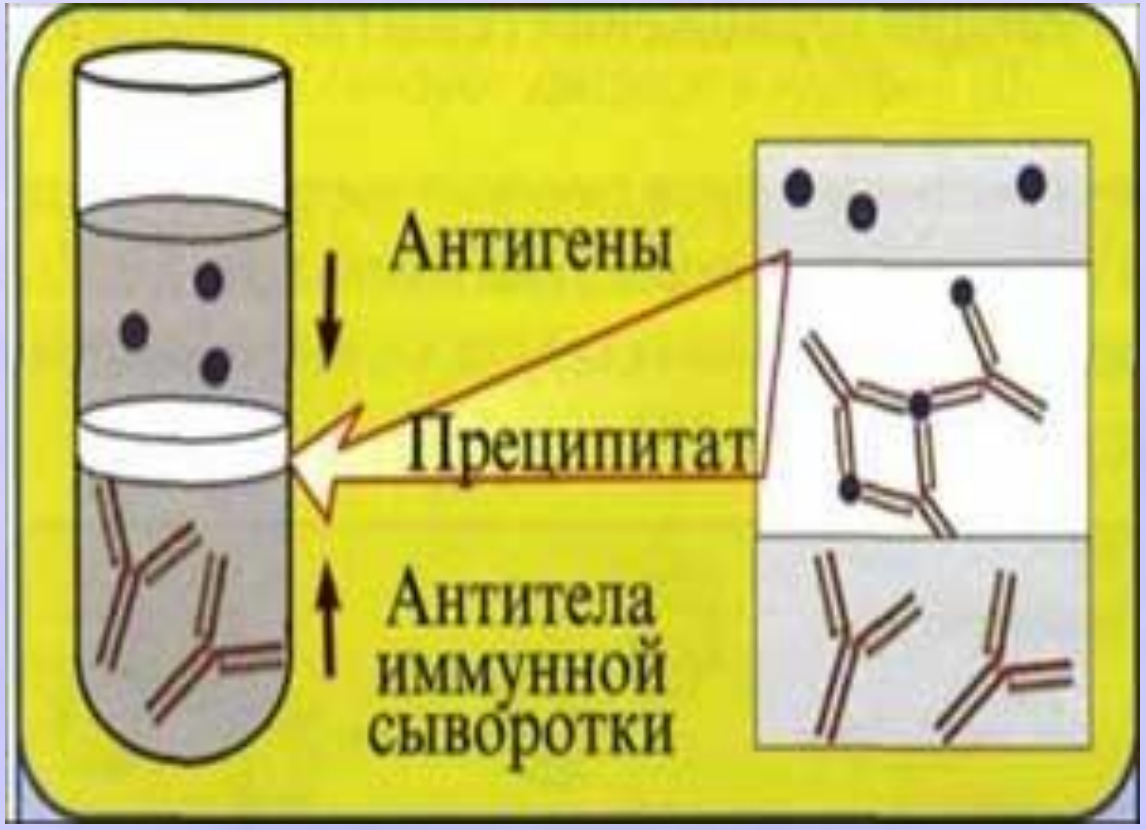
1. Исследуемый материал (кожа, шерсть, войлок, щетина, сукно, мясо, земля, испражнения животных и т. д.) кипятят в физ. растворе 5-45 мин. для получения изотонической вытяжки (экстракта - АГ). Фильтруют.

2. В пробирку наливают преципитирующую противосибиреязвенную сыворотку (АТ).

3. Осторожно наслаивают на нее исследуемый материал (экстракт - АГ).

Учет реакции кольцепреципитация

В течение 10 мин. на границе между сывороткой (АТ) и экстрактом (АГ) в положительных случаях появляется мутное кольцо.



Реакция преципитации в агаре

Постановка реакции преципитации в агаре для определения токсигенности коринебактерий (возбудители дифтерии).

Ставится на агаре в чашке Петри.

1. **Вдоль чашки посередине помещают полоску стерильной фильтровальной бумаги, смоченной антитоксической сывороткой.**
2. **После подсушивания на расстоянии 1 см от края полоски бляшками диаметром 10 мм подсевают выделенные культуры. В одной чашке можно сеять от 3 до 10 культур, одна из которых, контрольная, должна быть заведомо токсигенной. Посевы помещают в термостат.**

Учет реакции преципитации в агаре

Анализ проводят через 24-48-72 ч.
Положительный результат (культура *токсигенная)*- на некотором расстоянии от полоски бумаги возникают линии преципитата, «стрелы-усики».

Определение токсигенности дифтерийной палочки (преципитация в агаре).
В центре - колонии нетоксигенного штамма.

Реакция преципитации в геле (агаре)

MyShared

Сущность реакции в том, что антигены и антитела, помещенные в разные лунки в агаре, диффундируют навстречу друг другу и при взаимодействии образуют комплекс, который осаждается в виде линии преципитации.

Реакция преципитации РП

РП применяют для диагностики дифтерии, сибирской язвы, менингита, пневмонии, а также в судебной медицине – для определения видовой принадлежности крови.

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.

Учет результатов: если животное выжило – реакция *положительная*, если погибло (нейтрализация не произошла) – отрицательная.

РН применяют для приготовлении антитоксических сывороток.

Реакция нейтрализации экзотоксина

культуральная жидкость

+

антитоксическая сыворотка

культуральная жидкость

Реакция иммунного лизиса – РИЛ

Это способность иммунной сыворотки (АТ) лизировать (растворять) микробные клетки (АГ) в присутствии комплемента. В качестве комплемента используют сыворотку морской свинки.

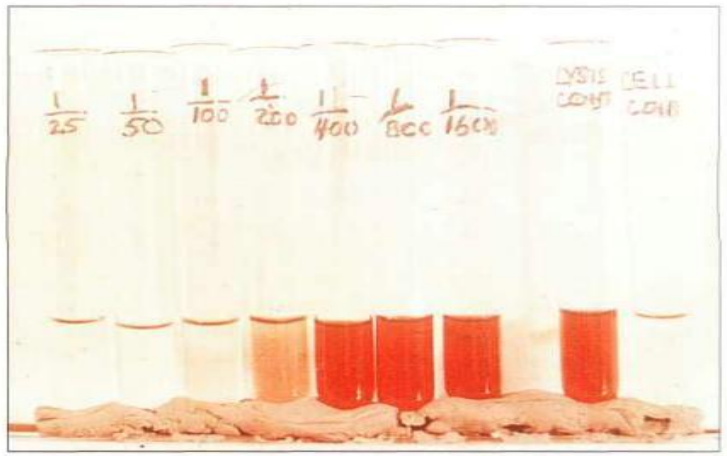


Fig. 14.28 Anti-streptolysin O (ASO) test. The O-toxin lyses red cells and test serum is diluted until it no longer inhibits lysis by a standard concentration of toxin. Positive and negative controls are included in the test (right).

Реакция связывания комплемента – РСК

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

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

В РСК участвуют две системы АГ – АТ.

Для проведения РСК необходимо пять ингредиентов: АГ, АТ и комплемент (первая система), эритроциты барана и гемолитическая сыворотка (вторая система).

Реакция связывания комплемента – РСК

Техника проведения РСК:

1 фаза (не различима глазом): соединяют 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.

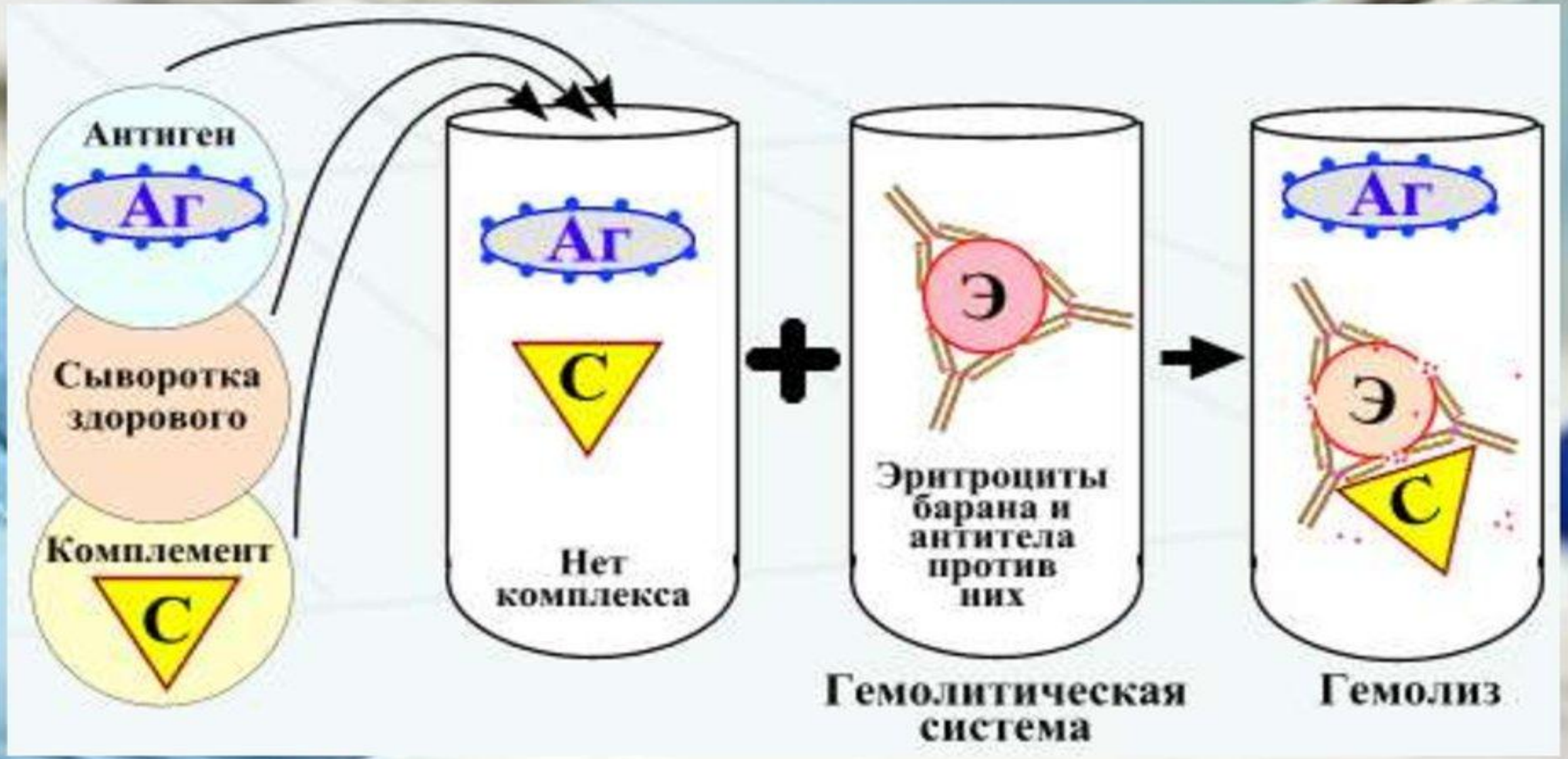
Реакция связывания комплемента – РСК

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).

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»).

Схема РСК с сывороткой здорового



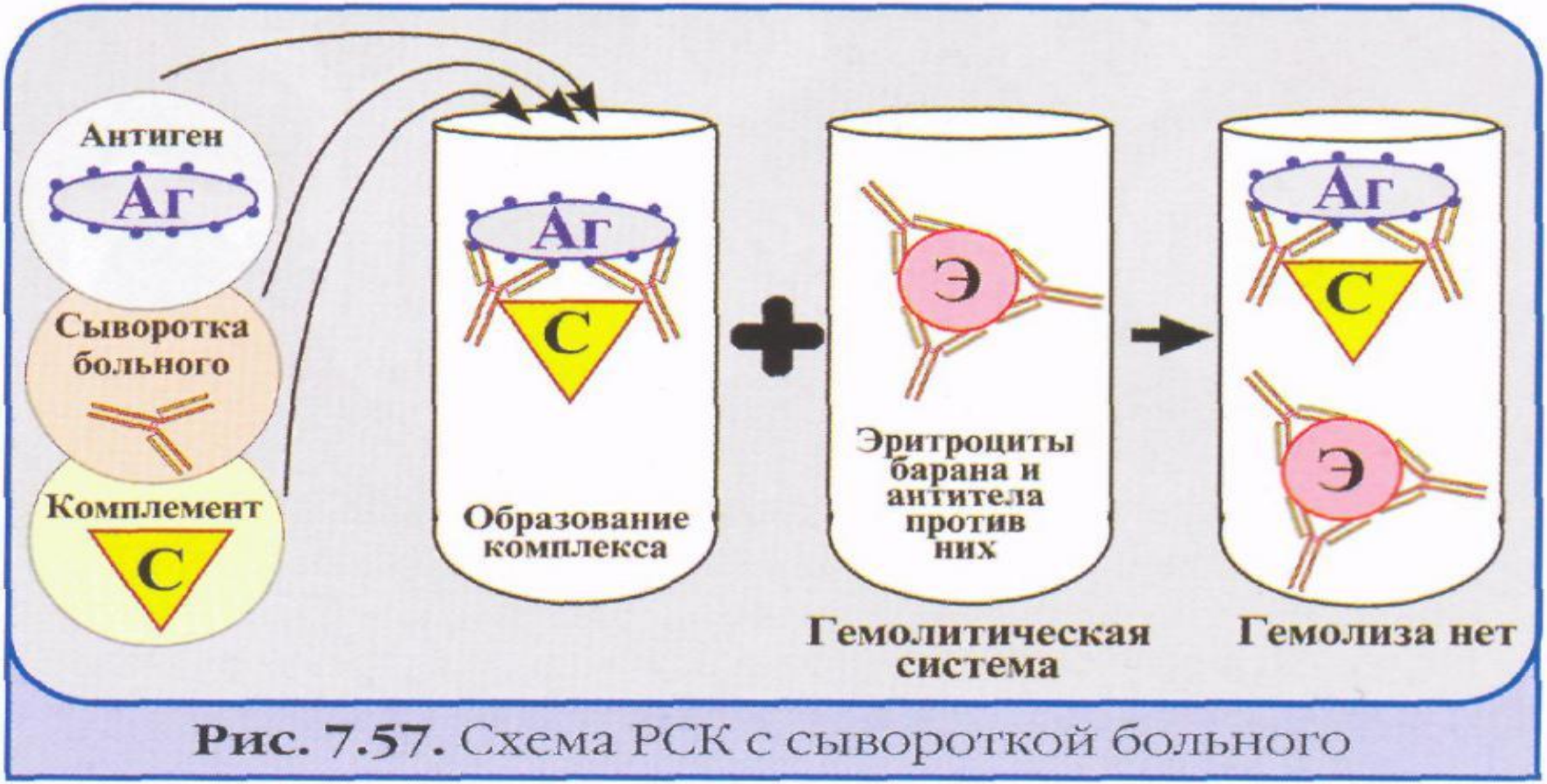
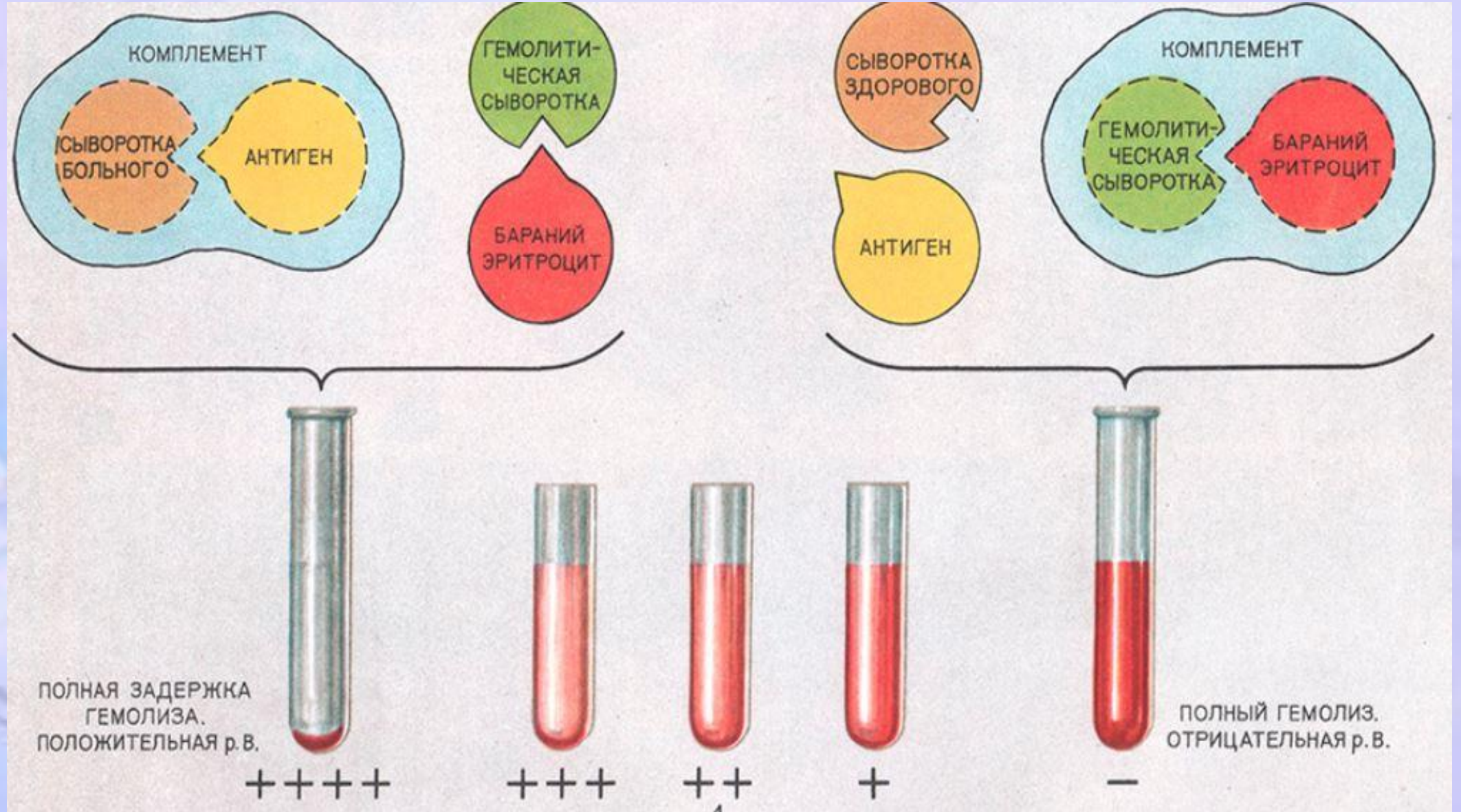


Рис. 7.57. Схема РСК с сывороткой больного

Реакция Вассермана



Иммуноферментный анализ - ИФА

ИФА – метод выявления АГ с помощью АТ, конъюгированных ферментом – меткой (щелочная фосфатаза).

ИФА - современное лабораторное исследование, в ходе которого ведется поиск специфических антител в крови либо антигенов к конкретным заболеваниям с целью выявления не только этиологии, но и стадии болезни.

Иммуноферментный анализ - ИФА

В настоящее время ИФА применяется в следующих ситуациях:

1) поиск специфических антител к любому инфекционному заболеванию;

2) поиск антигенов каких-либо заболеваний (инфекционных, венерологических);

3) исследование гормонального статуса пациента;

4) обследование на онкомаркеры;

5) обследование на предмет наличия аутоиммунных заболеваний.

Иммуноферментный анализ - ИФА

Учет результата:

Положительный результат - изменение цвета, на рисунке желтый цвет.