

Иммунологические методы диагностики бактериальных инфекций: основные иммунологические реакции и их модификации

Выполнила студентка 6 курса
группы 4607 Богайчук Оксана

РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

Реакция агглютинации позволяет выявить корпускулярные антигены и антитела, локализованные на поверхности сравнительно крупных частиц.

- Агглютинат может быть двух типов – мелкозернистый и крупнохлопчатый.

Все реакции агглютинации подразделяются на два типа:

- – ориентировочные , которые выполняются на стекле;
- – развернутые выполняются в пробирках с титрованием сыворотки.

ОРИЕНТИРОВОЧНЫЕ РЕАКЦИИ

АГГЛЮТИНАЦИИ

1. На обезжиренное стекло нанести каплю физиологического раствора.
2. Внести петлей исследуемую культуру бактерий, равномерно распределить в капле физиологического раствора.
3. Добавить каплю специфической агглютинирующей иммунной сыворотки.
4. Учесть результат реакции.

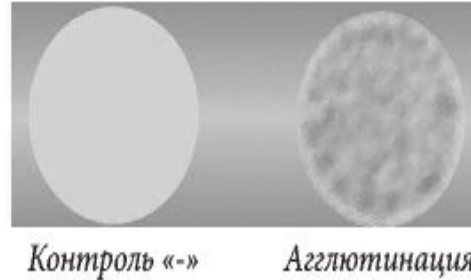


Рис. 1. Ориентировочная реакция агглютинации.

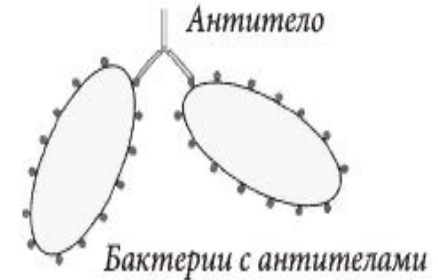


Рис. 2. Схема ориентировочной реакции агглютинации.

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 РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

- Реакция Минкевича позволяет определить наличие противотуляремийных антител у инфицированного



Контроль «-»

Опыт

Рис. 3. Реакция Минкевича.

- Реакция Хеддельсона позволяет не только выявить антитела в сыворотке инфицированного бруцеллезом пациента, но и опреде.

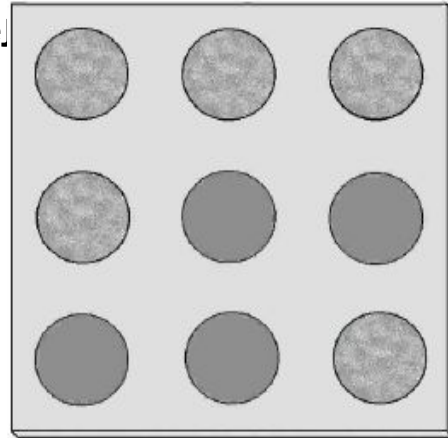


Рис. 4. Постановка реакции Хеддельсона.

РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ (ПАССИВНОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

- Основана на способности антител взаимодействовать с антигеном, фиксированным на различных эритроцитах, которые при этом агглютинируют.
- Для постановки этой реакции необходимо приготовление эритроцитарного диагностикума (антигенный/антительный).

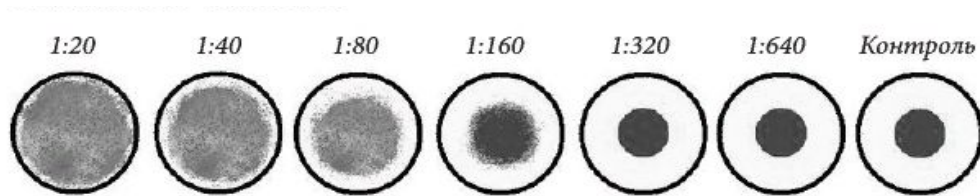


Рис. 6. Схема постановки и учета РПГА.

Таблица 2

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.

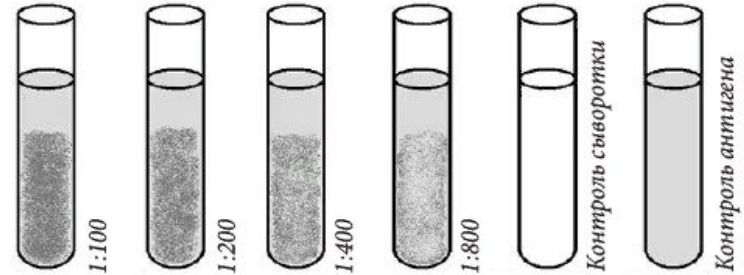


Рис. 7. Схема разведения сыворотки и постановки развернутой реакции агглютинации.

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, 1-2 млрд микробных тел в 1 мл	2к	2к	2к	2к	-	2к
В термостат при +37°C на 2 часа, затем на 18-20 часов при комнатной температуре						

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ПЕРЕКРЕСТНОЙ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

- **Кастеллани:** перекрестная РА направлена на извлечение групповых антител методом адсорбции и основана на правиле – специфический антиген (АГ) изымает из сыворотки все антитела – и специфические только для него, и групповые; неспецифический АГ – только групповые.
- **Метод Нобля:** основан на использовании концентрированных ингредиентов и применении механического фактора, ускоряющего агглютинацию, что позволяет получить результаты через 2-5 минут. Применяется для диагностики сыпного тифа

РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Реакции преципитации (РП) предложены Краусом (1897) и основаны на феномене образования видимого осадка (преципитата) или общего помутнения среды после взаимодействия растворимых, либо находящихся в коллоидном дисперсном состоянии антигена с антителом.

Метод имеет несколько разновидностей.

1. Реакция кольцепреципитации.
2. Реакция микропреципитации.
3. Реакция флокуляции.
4. Реакция преципитации в геле.
5. Реакция преципитации в агаре.
6. Иммуноэлектрофорез.

РЕАКЦИЯ КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ

Постановка реакции осуществляется в тонких пробирках и заключается в том, что вначале в пробирку вносится сыворотка, содержащая антитела к возбудителю сибирской язвы, на нее сверху осторожно наслаивается термопреципитиноген так, чтобы жидкости не перемешивались. При нахождении антигена в субстрате в месте соприкосновения двух жидкостей возникает кольцо преципитации (мутное кольцо).

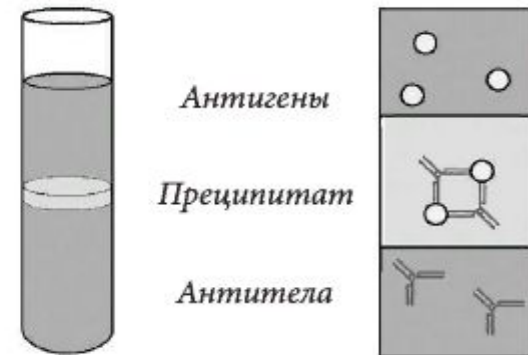


Рис. 9. Выявление АГ в реакции кольцепреципитации (по Воробьеву А.А., 2003 г.).

Реакция микропреципитации на примере экспресс-диагностики сифилиса (ЭДС).

Данная реакция выполняется для скрининга сывороток при массовых обследованиях на сифилис.

Контроль «-»	Контроль «+»	Опыт
Физ. раствор	«+» сыворотка	исследуемая сыворотка
Кардиолипидный антиген		

Рис. 10. Экспресс-диагностика сифилиса (ЭДС).

РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭКЗОТОКСИНОВ

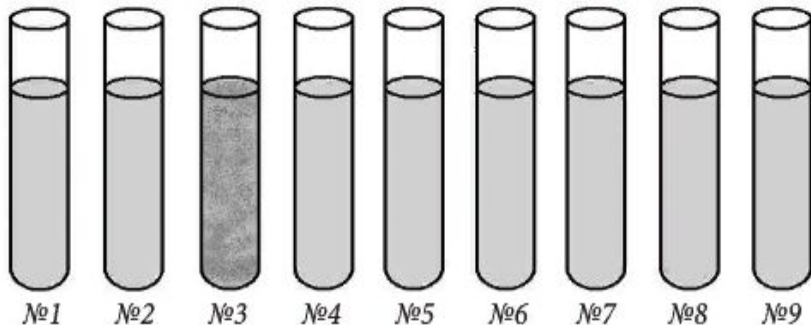
Применяется для идентификации бактериального экзотоксина по его видовой и типовой принадлежности, а также для определения наличия и силы антитоксина в исследуемой сыворотке, титра анатоксина.

Бактериальный экзотоксин в смеси с гомологичной сывороткой (антисывороткой) не разрушается, а нейтрализуется.

- Реакция флоккуляции – это реакция преципитации в системе токсин-антитоксическая сыворотка, характеризующаяся появлением хлопьевидного осадка или опалесценции при избытке антигена

Определение активности анатоксина по известной антитоксической сыворотке (титр 200 АЕ в 1 мл) в реакции флоккуляции

Ингредиенты	Номера пробирок и их содержимое								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Анатоксин, мл	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
Физ. раствор, мл	0,9	0,85	0,8	0,75	0,7	0,65	0,6	0,55	0,5
Антитоксин 200 АЕ в 1 мл (1:200)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5'									
10' инициальная флоккуляция		+	+	+					
15'									



Реакции нейтрализации токсина АНТИТОКСИНОМ

Одной группе животных вводится только токсин, второй группе вначале вводится антитоксическая сыворотка, содержащая антитела к данному токсину, а затем и сам токсин. Если правильно подобрана антитоксическая сыворотка, то животное остается живым, а контрольное животное от действия токсина погибает

Ход исследования:

Контроль (№1)



Физ. раствор

Опыт (№2)



*Токсин +
Антитоксическая сыворотка
Поливалентная*

Реакция Дика. С целью определения уровня антитоксического иммунитета к скарлатине у здорового человека выполняют кожную пробу с очищенным токсином – эритрогенином. Реакцию учитывают через 24 часа после введения

Реакция Шика – реакция нейтрализации дифтерийного токсина антитоксинами организма. Она ставится для оценки напряженности иммунитета к дифтерии. Пробу выполняют со стабилизированным, очищенным дифтерийным токсином.

Рис. 12. Схема постановки реакции нейтрализации.

РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ В АГАРЕ,

АГАР

Данный вариант реакции преципитации применяется для обнаружения токсина, вырабатываемого возбудителем при росте на агаре.

При росте культуры токсин пропитывает агар, одновременно из фильтровальной бумаги противотоксические антитела диффундируют в агар, и на месте их соединения образуется комплекс АГ-АТ, что становится видимым, как «усы» преципитации.

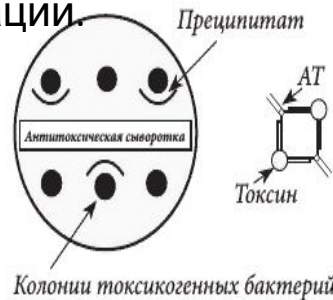


Рис. 13. Реакция преципитации в агаре (по Воробьеву А.А., 2003 г.).

ГЕЛЕ

ГЕЛЬ

Принцип метода: вещества, диффундирующие в геле навстречу друг другу, реагируя между собой, образуют преципитат беловатого цвета разной конфигурации. В контроле он не наблюдается.

Концевое слияние полос свидетельствует о полной идентичности антигенов; при стыке полос – неполное родство; перекрест – разные антигены, но есть групповые антигены

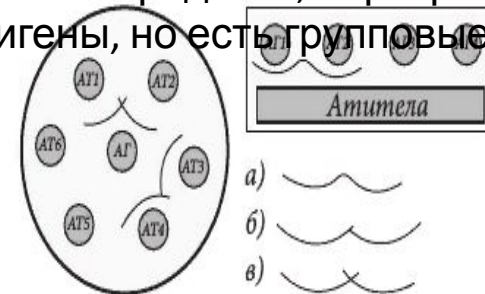


Рис. 14. Реакция преципитации в геле (по Воробьеву А.А., 2003 г.).

РЕАКЦИИ, ПРОТЕКАЮЩИЕ С УЧАСТИЕМ КОМПЛЕМЕНТА.

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, что приводит к активации системы комплемента по классическому пути и лизису бактерий.

В реакции гемолиза АГ служат эритроциты, АТ – антигемолитические антитела. При образовании комплекса АГ-АТ начинается активация комплемента, в результате чего мутная взвесь эритроцитов превращается в ярко-красную прозрачную жидкость. При постановке диагностической реакции связывания комплемента (РСК) реакция гемолиза используется как индикаторная.

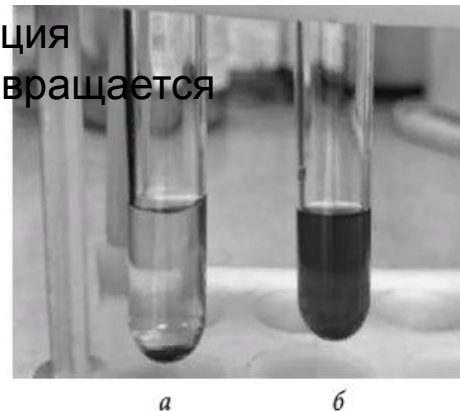


Рис. 17. Реакция гемолиза: а – отсутствие гемолиза, б – гемолиз.

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

Реакция Вассермана для диагностики сифилиса

Таблица 8

Схема постановки основного опыта РСК

Ингредиенты	Опыт	Контроль сыворотки	Контроль антигена на антикомплемментарность	Контроль антигена на гемотоксичность
1. Диагностическая система				
Сыворотка крови больного, инактивированная при +56°C 30 мин, мл	0,5	0,5	-	-
Антиген в рабочей дозе, мл	0,5	-	0,5	0,5
Комплект в рабочей дозе, мл	0,5	0,5	0,5	-
Физ. Раствор 0,85%	-	0,5	0,5	1,0
Инкубировать в термостате при 37°C 60 мин				
2. Индикаторная система (гемолитическая)				
Гемолитическая сыворотка в рабочей дозе, мл	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты барана 3% взвесь, мл	0,5	0,5	0,5	0,5
Инкубировать в термостате при 37°C 60 мин.				
Соединить I и II системы		Выдержать при +37°C 60 мин.		
Результаты РСК (пример)	-	-	-	-
Результат гемолиза	-	+	+	-

Таблица 9

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.

РЕАКЦИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ТРЕПОНОМ

Реакция основана на наблюдениях Д.К. Заболотного (1907) и П.П. Маслаковца в отношении потери подвижности бледной спирохеты при добавлении к ее культуре сыворотки крови больных сифилисом в присутствии комплемента.

Реакцию выполняют в меланжерах. Основной опыт – соединение в смесителе сыворотки больного, взвеси тканевых спирохет и активного комплемента.

$$X = T_k - T_o \times 1000$$

Положительный - выше 50, слабopоложительный – от 31 до 50, сомнительный – от 21 до 30, отрицательный – ниже 30.

Схема постановки реакции иммобилизации трепонем

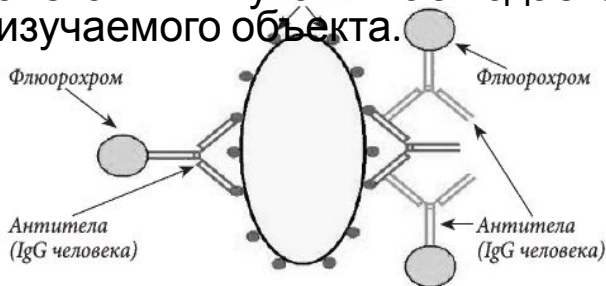
№ п/п	Ингредиенты	№ меланжеров				
		1	2	3	4	5
			контр. комплемента		контр. антигена	
1	Сыворотка обследуемого	До метки 1	До метки 1	-	-	-
2	Взвесь тканевых спирохет в смеси с активным комплементом	До метки 2	-	До метки 2	-	-
3	Смесь тканевых спирохет с инaktivированным комплементом		До метки 2	-	До метки 2	-
4	Взвесь тканевых спирохет без комплемента	-	-	-	-	До метки 2

РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

ПИФ

Выполняется на предметном стекле, учитывается с использованием люминесцентного микроскопа.

На стекло наносится изучаемый материал с неизвестным антигеном, фиксируется жидким фиксатором, после чего на препарат наносят специфическую иммунную сыворотку, меченную флюорохромом. Стекло инкубируют, промывают проточной водой. В случае совпадения антигена и специфической сыворотки на стекле образуется комплекс АГ-АТ, при микроскопии под ультрафиолетовыми лучами наблюдается свечение изучаемого объекта.



ПИФ

НИФ

Рис. 20. Схема постановки ПИФ и НИФ.

НИФ

В данной модификации с помощью известного антигена проводят поиск специфических антител в биологическом материале.

В практике широко распространена РИФ для диагностики сифилиса.

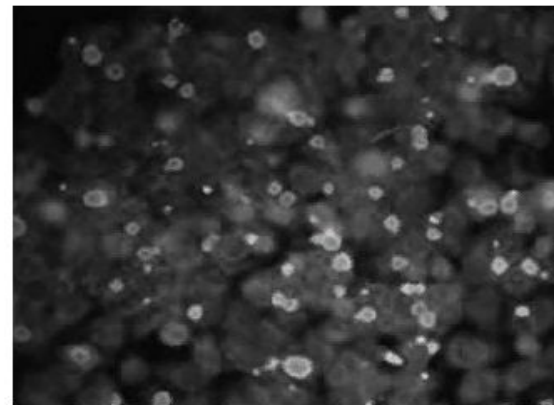


Рис. 21. Микроскопическая картина при непрямой реакции иммунофлюоресценции.

МЕТОД РАДИОИММУННОГО АНАЛИЗА

В основе метода радиоиммунного анализа (РИА) – маркирование радионуклидом антигена или антител, вступающих в реакцию. Образующиеся иммунные комплексы выделяют из системы и определяют их радиоактивность на счетчиках импульсов.

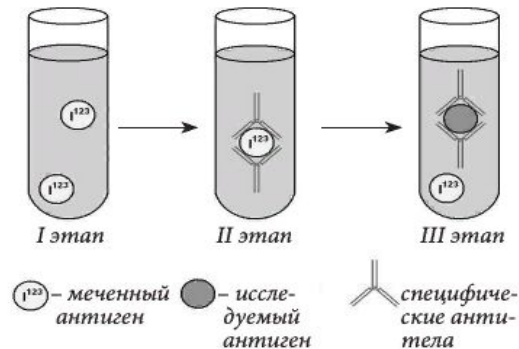


Рис. 22. Схема постановки радиоиммунного метода.

МЕТОД ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Метод иммуноферментного анализа использует коммерческие реагенты – АГ или АТ, маркированные ферментами.

В отличие от классических методов выявления ИФА позволяет непосредственно регистрировать взаимодействие антигена с антителом в специфической фазе, а не анализировать вторичные проявления взаимодействия.

Метод отличается высокой чувствительностью – обычно достаточно присутствия антигена в концентрации 1 нг мл.

1. В лунки полистиролового планшета вносят сыворотку крови пациентов.
2. Инкубируем планшет во влажной камере в течение 30 минут.
3. Промываем лунки планшета фосфатно-солевым буфером 5 раз.
4. Вносим во все лунки антисыворотку с АТ против иммуноглобулинов человека, меченные ферментом.
5. Промываем лунки фосфатно-солевым буфером 5 раз.
6. Во все лунки добавляем субстрат, содержащий перекись водорода и бензидин.

При правильной постановке анализа в лунке, содержащей положительную контрольную сыворотку, меняется цвет – он становится желтым. В отрицательном контроле цвет не меняется.

ИММУНОБЛОТТИНГ

Метод идентификации антигена или антител с помощью известных сывороток (или АГ). На практике применяют для идентификации АГ ВИЧ. Первоначально электрофорезом в полиакриловом геле выделяют Аг вируса. Затем на полосы преципитата накладывают носитель и продолжают электрофорез. После чего на пленку наносят сыворотку пациента и инкубируют. После отмывания несвязавшихся антител проводят ИФА – на пленку наносят антисыворотку к иммуноглобулинам человека, меченную ферментом, и хромогенный субстрат, изменяющий окраску при взаимодействии с ферментом.

При наличии комплексов Аг-Ат-антисыворотка к иммуноглобулинам на носителе появляются окрашенные пятна