

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

## ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Учебное пособие

Уфа

2016

**УДК 57.083:616-078 (075.8)**

**ББК 53.1+53.47↑7**

**И 53**

Рецензенты:

профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО  
«Оренбургская государственная медицинская академия» МЗ РФ,  
д.м.н. *Чайникова И.Н.*

профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО  
«Южно-Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ,  
д.м.н. *Телешева Л.Ф.*

**Иммунодиагностические реакции:** учебное пособие / сост.:

И 53 Г.К.Давлетшина, З.Г.Габидуллин, А.А.Ахтариева, М.М.Туйгунов,  
А.К.Булгаков, Т.А.Савченко, Р.Ф. Хуснаризанова, Ю.З.Габидуллин,  
М.М.Алсынбаев – Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России,  
2016. - 84 с.

Учебное пособие подготовлено на основании рабочей программы по дисциплине «Микробиология» (2015 г.), действующего учебного плана ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава РФ (2015 г.), в соответствии с требованиями ФГОС ВО по специальности 310502 – Педиатрия (утвержденный 17.08.2015 Министерством образования и науки РФ, №853).

Учебное пособие предназначено для самостоятельной аудиторной работы студентов педиатрического и лечебного факультетов и содержит информацию по основным вопросам иммунодиагностических реакций в микробиологии.

Издание включает теоретический материал о современных методах изучения гуморального, клеточного иммунитета, факторов естественной резистентности организма, принципах получения антигенов и антител, тестовые задания и ситуационные задачи с эталонами ответов.

**УДК 57.083:616-078 (075.8)**

**ББК 53.1+53.47↑7**

© ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	5
Введение.....	7
Иммунодиагностические реакции.....	8
Реакция агглютинации (РА) или прямая РА.....	10
Определение нормальных антител к брюшнотифозному антигену в РА	14
РА Видаля для серодиагностики брюшного тифа и паратифов .....	14
Ориентировочная РА на стекле.....	16
Реакция пассивной агглютинации (РПА).....	16
Реакция преципитации (РП).....	21
Реакция кольцепреципитации.....	21
Постановка РП по Асколи с целью обнаружения антигена сибиреязвенных бацилл.....	23
Реакции с участием комплемента.....	24
Реакции лизиса: бактериолиза и лизиса.....	24
Реакция гемолиза.....	25
Реакция связывания комплемента (РСК).....	25
РСК Борде-Жангу.....	27
РСК Вассермана.....	29
Реакция радиального гемолиза.....	30
Реакция иммунного прилипания.....	31
Меченые серологические реакции.....	32
Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).....	32
Радиоиммунологический анализ (РИА).....	34
Иммуноферментный анализ (ИФА).....	37
Реакция иммуноблотинга (РИ).....	41
Проточная цитометрия (ПЦ).....	42
Иммунная электронная микроскопия (ИЭМ).....	43
Реакции нейтрализации (РН).....	45

Реакция нейтрализации токсина антитоксической сывороткой.....	45
Реакция нейтрализации вирусов.....	47
Опсонно-фагоцитарная реакция.....	50
Иммунный статус.....	51
Оценка неспецифической резистентности.....	52
Методы оценки клеточного иммунитета.....	53
Методы оценки гуморального иммунитета.....	54
Кожные аллергические пробы.....	56
Тестовые задания.....	58
Ситуационные задачи.....	72
Ответы к тестовым заданиям и ситуационным задачам.....	76
Список использованной литературы.....	82

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- CD – кластеры (группы) дифференцировки;
- CR – рецептор к комплименту;
- HLA – антигены лейкоцитов человека;
- Ig – иммуноглобулин;
- T – лимфоцит;
- T<sub>h</sub> 1, 2, 3 – T - хелперы различных типов;
- АГ – агглютиноген;
- АПК – антигенпрезентирующая клетка;
- АТ – агглютинин;
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;
- ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа;
- ГНТ – гиперчувствительность немедленного типа;
- ИБ – иммуноблоттинг;
- ИК – иммунный комплекс ;
- ИЛ – интерлейкин;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- ИФН – интерферон;
- ИЭМ – иммунная электронная микроскопия;
- ЛПС – липополисахарид;
- МАК – мембраноатакующие комплексы;
- МФ – макрофаг;
- ПЦ – проточная цитометрия;
- РБТЛ – реакция бластной трансформации;
- РИА – радиоиммунный анализ;
- РИП – реакция иммунного прилипания;
- РИФ – реакция иммунофлюоресценции;
- РН – реакция нейтрализации;
- РОНГА – реакция обратной непрямой гемагглютинации;

РП – реакция преципитации;

РРГ – реакция радиального гемолиза;

РСК – реакция связывания комплемента;

РТГА – реакция торможения гемагглютинации;

ЦИК – циркулирующий иммунный комплекс;

ЦТЛ – цитотоксический Т-лимфоцит.

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее важных разделов в медицинской микробиологии является диагностика инфекционных заболеваний с применением иммунодиагностических реакций, где используется принцип «антиген-антитело». Обнаружение в сыворотке или плазме крови больного антител к антигенам микроорганизмов или аутоантигенам (например, онкологическим маркерам) позволяет использовать его в диагностике многих болезней (иммунной, эндокринной систем и др.).

Знания основ иммунологических реакций необходимы врачу любой специальности. Изучение принципов иммунодиагностических реакций позволит педиатру разработать рациональный подход к лечению.

Данное учебное пособие содержит информацию о современных методах иммунодиагностики, используемых в различных областях клинической медицины, методологию иммунодиагностики основных заболеваний иммунной системы, основные иммунологические методы.

Настоящее учебное пособие будет способствовать формированию представлений о принципах иммунодиагностики; приобретению знаний о показаниях для исследования иммунного статуса, количественных и функциональных тестах оценки Т-клеточного, В-клеточного иммунитета, НК-клеток, фагоцитоза, комплемента и их клинического значение, умений определять показания для исследования иммунного статуса, интерпретировать основные показатели иммунного статуса.

Учебное пособие направлено на формирование **компетенций**:

- готовность к саморазвитию, самореализации, самообразованию, использованию творческого потенциала (**ОК-1**);
- готовность решать стандартные задачи профессиональной деятельности с использованием информации, медико-биологической терминологии (**ОПК-1**);
- способность выявлять у пациентов основные патологические симптомы и синдромы заболеваний (**ПК-6**).

## ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Иммунодиагностические реакции (ИР) широко используются в лабораторной диагностике инфекций и болезней, возникающих в результате иммунодефицитов. Их применяют: 1) для выявления антител в сыворотке крови, т.е. серологической диагностики инфекционного заболевания; 2) для определения вида или серовара микроорганизма, т.е. антигенной идентификации его.

ИР выявляют образование комплекса АГ-АТ. При этом неизвестный компонент определяют по известному компоненту. ИР отличаются **высокой чувствительностью** (связывание АТ с АГ при ничтожно малых количествах) и **специфичностью** (определяется особенностью строения активного центра АТ и детерминант АГ). Они характеризуются **стадийностью** развития. Первая стадия **специфическая**, невидимая для глаз, характеризуется соединением детерминантной группы АГ с активным центром АТ. В результате образуется комплекс АГ-АТ, утративший растворимость в изотонических растворах. Вторая стадия – **неспецифическая**, видимая на глаз, причем характер проявления зависит от состояния АГ, АТ и условия среды, в котором происходит взаимодействие АГ и АТ.

При взаимодействии АТ с корпускулярными антигенами (бактерии, животные клетки, др. клетки) наступают видимые невооруженным глазом изменения (например, хлопья агглютината, лизис клеток). Если с АТ соединяются растворимые мелкодисперсные АГ, образование комплексов выявляют в результате предварительной адсорбции АГ (АТ) на корпускулярных веществах (эритроцитах, частичках угля и др.)

Скорость реакции зависит от:

- оптимального соотношения АГ и АТ.
- степени специфичности АГ и АТ.
- рН среды (7,2-7,4).
- концентрации электролитов (0,85 % натрия хлорида).



В зависимости от состояния АГ, АТ и особенностей среды, в которой взаимодействуют АГ и АТ, различают реакции агглютинации, преципитации, лизиса, комплемента, нейтрализации и др.

ИР подразделяются на простые (двухкомпонентные, участвуют только АГ, АТ) и сложные (трехкомпонентные и многокомпонентные, участвуют АГ, АТ и реагирующая система-сенсibilизированные эритроциты, культура клеток, кожа восприимчивого животного и др.).

В настоящее время широкое применение получили ИР, в которых участвуют меченные АГ и АТ (р. иммунофлюоресценции, радиоиммунный и иммуноферментный методы).

## РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА) ИЛИ ПРЯМАЯ РА

Агглютинация – это склеивание и выпадение в осадок микроорганизмов или других клеток (корпускулярных антигенов) под действием специфических антител в присутствии электролитов.

РА применяется для серологической диагностики инфекционных заболеваний (реакция Видала - при брюшном тифе и паратифах, р. Вейгеля - при эпидемическом сыпном тифе, р. Райта - при бруцеллезе и др.) и для серологической идентификации микробов.

В РА участвуют 3 ингредиента:

- 1) корпускулярный АГ (агглютиноген);
- 2) АТ (агглютинин);
- 3) изотопический раствор хлорида натрия (электролит).

**Антигены** – взвесь живых и убитых микроорганизмов.

Идентификацию вида (серотипа) микроба, выделенного от больного или внешней среды определяют по известному антителу (диагностической иммунной сыворотки). Положительный результат реакции укажет на то, что неизвестный микроб идентичен тому, который был взят в качестве антигена для приготовления иммунной диагностической сыворотки.

Для приготовления взвеси испытуемого микроорганизма, суточную агаровую культуру бактерий смывают 1-2 мл физиологическим раствором, доводя концентрацию до 2-х млрд. микробных клеток в 1 мл.

При определении неизвестных антител в сыворотке крови больного или реконвалесцента принято пользоваться заранее заготовленными диагностикумами - микробами, убитыми формалином, спиртом, прогреванием, которые готовятся в производственных условиях.

При лабораторной диагностике некоторых инфекционных заболеваний, например, брюшного тифа и паратифов, имеет значение отдельное определение О- и Н-антител в исследуемых сыворотках, т.к. время их появления у больных и сохранение у реконвалесцентов различно. Для этих исследований необходимо

располагать соответственно О- и Н-диагностикумами. Для приготовления жгутикового Н-антигена к взвеси агаровой культуры микробов в физиологическом растворе добавляют 0,2 % формалина и выдерживают при 37°C в течение 24 часов. О-диагностикум получают прогреванием пробирки со смывом агаровой культуры соответствующего микробов кипящей водяной бане в течение 1,5-2 часов.

#### **Антитела (сыворотки):**

а) испытуемая сыворотка от больного или реконвалесцента получается из крови, взятой стерильно из локтевой вены в количестве 1-2 мл в стерильную пробирку; оставляют на 1 час при комнатной температуре или при 37 °С на 30 минут. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок пробирки бакпетлей, затем пробирку оставляют в холодильнике на ночь. Кровь центрифугируют и отсасывают сыворотку.

Готовят последовательно, чаще двухкратные, разведения сыворотки. Обычно разводят в соотношении от 1:50 до 1:800.

Количество неизвестных агглютинирующих антител в сыворотке оценивается по титру – наибольшему разведению сыворотки, которое еще дает реакцию агглютинации (выпадение осадка – агглютинат).

б) агглютинирующая диагностическая иммунная сыворотка готовится в производственных условиях путем иммунизации кроликов (реже лошадей) соответствующими антигенами (взвесью живых с ослабленной вирулентностью или убитых микроорганизмов, эритроцитов и т.д.).

Полученную иммунную сыворотку, определив его титр, разливают по ампулам с добавлением консерванта. Иногда употребляют высушенную сыворотку.

Изотонический раствор хлорида натрия- 0,85 % химически чистой поваренной соли, рН 7,2-7,4.

РА должна сопровождаться контролем АГ и контролем АТ (сыворотки) для исключения спонтанной самопроизвольной агглютинации, которая может наступить в 2-х случаях:

а) при потере антигеном специфичности (он диссоциирован на S-формы в R);

б) при изменении рН реакции в кислую сторону.

**Существует два основных метода постановки РА:**

1) ориентировочная РА на предметном стекле, наступающая в течении нескольких минут. Применяется только с целью идентификации вида (серотипа) выделенной из организма больного чистой культуры по его специфичности как АГ к серотипу АТ (рис.1);

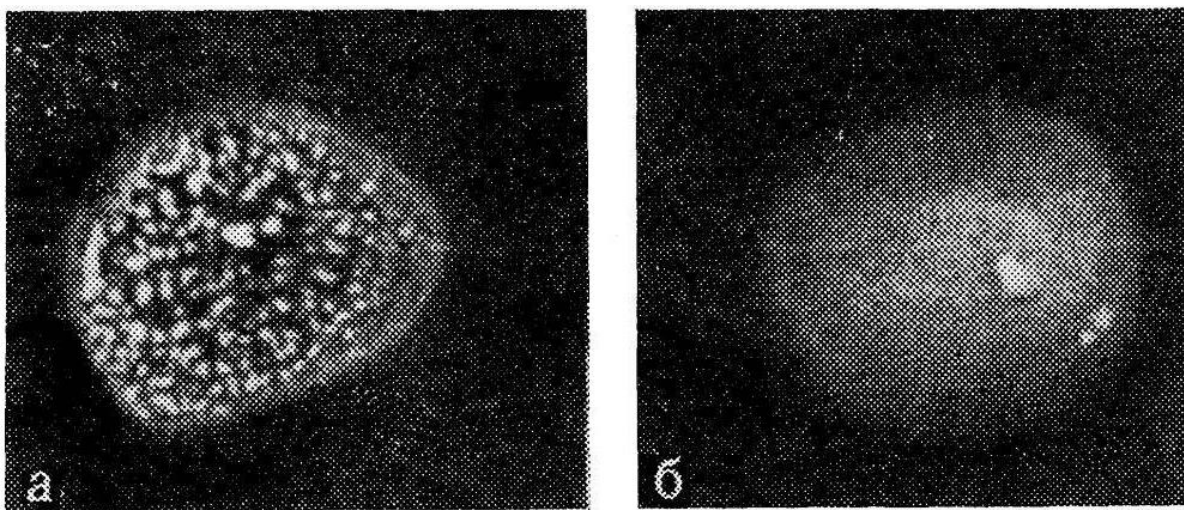


Рис. 1. Реакция агглютинации на предметном стекле:

а-агглютинация; б-отсутствие агглютинации

2) развернутая РА в пробирках, которая учитывается через 2 часа выдерживания при 37°C и на следующий день стояния при комнатной температуре применяется с целью идентификации микроба и обнаружения АТ в сыворотке крови (рис.2).

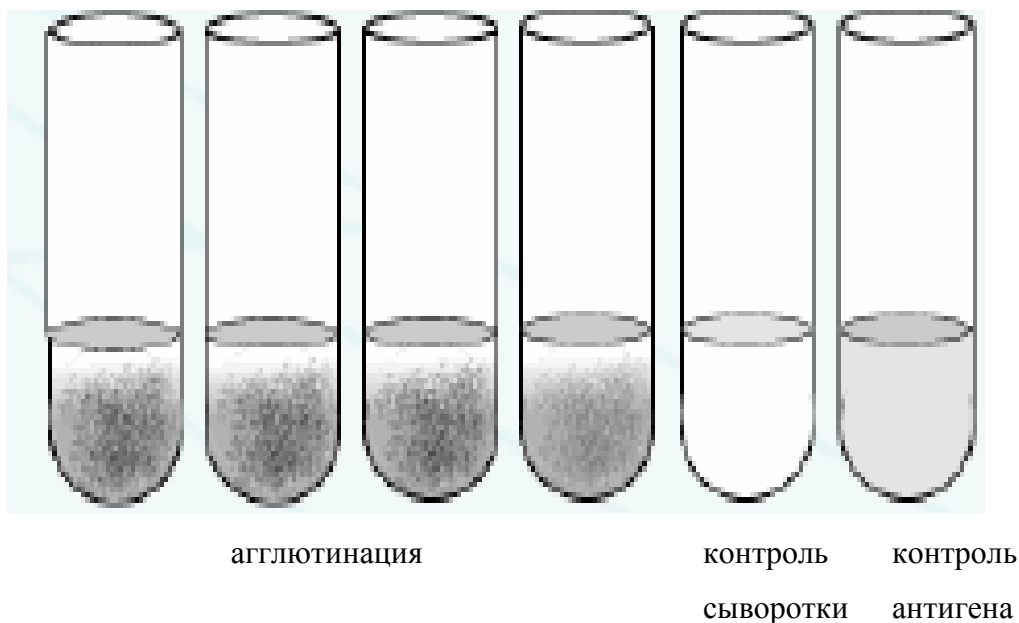


Рис. 2. Развернутая РА

РА входит в группу методов, в которых реакция протекает в две фазы:

- 1) соединение АГ с АТ (специфическая фаза);
- 2) выпадение образовавшегося комплекса АГ-АТ (агглютината) в растворе солей (электролите) в осадок (неспецифическая фаза).

Антигены поливалентны, а антитела двух – (IgG) или более валентны (IgM). Соединение их приводит к образованию макроконгломератов, выпадающих в осадок. Причем характер осадка зависит от свойств антигена: жгутиковые бактерии, имеющие Н-АГ, склеиваются жгутиками, при этом образуются крупнохлопчатый осадок, который наступает в течении двух часов при 37 °С. У безжгутиковых бактерий, имеющих соматический О-АГ, происходит склеивание непосредственно самих клеток и образование мелкозернистого осадка. Такой осадок образуется медленно, в течение 18-24 часов при комнатной температуре.

Достоинства РА: простота и экспрессность.

Недостатки: уступает по специфичности и чувствительности.

## **Определение нормальных антител к брюшнотифозному антигену в РА**

Для определения нормальных антител берут у здорового человека шприцем кровь из локтевой вены в количестве 2-3 мл и дают ей свернуться. Образовавшийся сгусток отделяют, а сыворотку отсасывают в чистую пробирку и готовят ряд разведений от 1:10 до 1:160 следующим образом: во все пробирки разливают по 1 мл (20 капель) физиологического раствора, затем в 1-ю пробирку этой же пипеткой наливают 1 мл сыворотки, разведённой 1:5, перемешивают с физиологическим раствором, получают разведение 1:20. Также получают разведения 1:40, 1:30 и 1:160.

В отдельную контрольную пробирку наливают 1 мл физиологического раствора без сыворотки (контроль антигена). Во все пробирки закапывают по 2 капли брюшнотифозного диагностикума. Штатив ставят в термостат на 2 часа при 37 °С, а затем оставляют на сутки при комнатной температуре.

При учёте реакции сначала просматривают контрольную пробирку. В ней при лёгком встряхивании наблюдается равномерное помутнение, хлопьев не должно быть. Опытные пробирки просматривают одновременно с контрольной, держа в одной руке и встряхивая. При положительной реакции обнаруживаются хлопья из склеенных бактерий. Учитывают максимальное разведение сыворотки, при котором произошла отчетливая агглютинация (титр сыворотки).

## **РА Видаля для серодиагностики брюшного тифа и паратифов**

Специфические антитела (агглютинины) обнаруживаются в крови больного со 2-ой недели болезни. Для постановки реакции Видаля берут шприцем кровь из локтевой вены в количестве 2-3 мл и дают ей свернуться. Образовавшийся сгусток отделяют, а сыворотку отсасывают в чистую пробирку и готовят из неё 3 ряда разведений сыворотки больного от 1:100 до 1:800 следующим образом: во все пробирки разливают по 1 мл (20 капель) физиологического раствора; затем этой же пипеткой наливают 1 мл сыворотки, разведений 1:50 в первую пробирку, перемешивают с физиологическим раствором, таким образом получают разведение 1:100. Из этой пробирки переносят 1 мл сыворотки в следующую пробирку,

перемешивают с физиологическим раствором, получают разведение 1:200, также получают разведения 1:400 и 1:800 в каждом из трёх рядов. Реакция агглютинации Видаля ведётся в объеме 1 мл жидкости, поэтому из последней пробирки после смешения жидкости удаляют 1 мл. В отдельную контрольную пробирку наливают 1 мл физиологического раствора без сыворотки. Этот контроль ставится для проверки возможности спонтанной агглютинации антигена (диагностикума) в каждом ряду (контроль антигена). Во все пробирки каждого ряда, соответственного надписям, закапывают по 2 капли диагностикума, приготовленного из *S. typhi abdominalis*, *S. paratyphi A* и *S. paratyphi B*. Штатив ставят в термостат на 2 часа при 37 °С и затем на сутки оставляют при комнатной температуре. Учёт реакции производится на следующем занятии.

В сыворотках больных могут быть как специфические, так и групповые антитела, которые различаются по высоте титра. Специфическая реакция агглютинации идёт обычно до более высокого титра. Реакция считается положительной, если агглютинация произошла хотя бы в первой пробирке с разведением 1:200. Обычно она наступает в больших разведениях. Если наблюдается групповая агглютинация с двумя или тремя антигенами, то возбудителем болезни считают того микроба, с которым произошла агглютинация в наиболее высоком разведении сыворотки.

Недостатки реакции:

- 1) реакция положительна начиная со 2-ой недели заболевания;
- 2) реакция положительна в 3-х случаях: у больных («инфекционная» реакция), у переболевших («анамнестическая») и у вакцинированных («прививочная»).

Для дифференциации реакций прибегают к повторной постановке ее через 5-6 дней. У больных отличается резкое нарастание титра антител. При «прививочной» и «анамнестической» реакциях титр антител не изменится.

Реакцию Видаля можно поставить одновременно с Н- и О-антигенами бактерий брюшного тифа, что помогает дифференцировать «инфекционную» от

«прививочной»), так как у привитых обнаруживаются только Н-антитела, О- агглютинин в высоком титре отмечается только в разгар болезни.

### **Ориентировочная РА на стекле.**

Реакция агглютинации на предметном стекле используется для ускоренной постановки диагноза (идентификации возбудителя) Для этого на предметном стекле пастеровской пипеткой наносят каплю диагностической сыворотки и рядом на том же стекле помещают каплю физиологического раствора для контроля. Петлёй снимают небольшое количество исследуемого материала бактерий (можно брать бактерии из колоний на чашке, со скошенного агара) и вносят их в каплю сыворотки; размешивают до получения равномерной мути. Второй же комочек микробной массы размешивают в капле физиологического раствора. Через несколько минут при положительной реакции агглютинации в капле с сывороткой появляются хлопья, видимые на глаз на темном фоне, тогда как контрольная капля остаётся равномерно мутной. Мы работаем с брюшнотифозными сыворотками и соответствующими культурами.

### **Реакция пассивной агглютинации (РПА).**

Под РПА понимают реакцию, в которой АГ-а взаимодействуют с высокодисперсными АГ (гаптенами), предварительно адсорбированными на корпускулярных носителях, которые при этом склеиваются.

В качестве корпускулярных носителей применяют эритроциты животных, частицы латекса (полимерные микрошарики), бентонита, сефарозы, клетки *St. aureus* (штамм Cowan-1, содержащий протеин А).

Различают 3 типа РПА:

- 1) различные варианты РПГА (реакции пассивной гемагглютинации);
- 2) реакция коагглютинации;
- 3) реакция латексагглютинации.



## 1. РПГА – реакция пассивной гемагглютинации

В основе лежит агглютинация сенсibilизированных эритроцитов. РПГА, как правило, подразумевает использование эритроцитов, сенсibilизированных АТ-ми.

Эритроциты используются нативные и фиксированные (формальдегидом, глутаровым альдегидом, хлоридом хрома и др.).

Ингредиенты реакции РПГА:

- 1) растворимый (высокодисперсный) АГ (белки, полисахариды и др.);
- 2) эритроциты (носитель);
- 3) АТ (испытуемая сыворотка или диагностическая иммунная сыворотка; обычно разводят в соотношении от 1:10 до 1:20480).
- 4) изотонический раствор хлорида натрия.

Реакцию инкубируют сначала при 37 °С в течение 2 часов, затем при комнатной температуре в течение 18-24 часов.

При положительной реакции, в результате образования комплекса (АГ-АТ) на поверхности эритроцитов, последние склеиваются и равномерно покрывают все дно пробирки или всю лунку пластинки в виде зонтика с неровными краями. При отрицательной реакции скопление эритроцитов имеет вид маленького диска с ровными краями («пуговки») (рис.3).

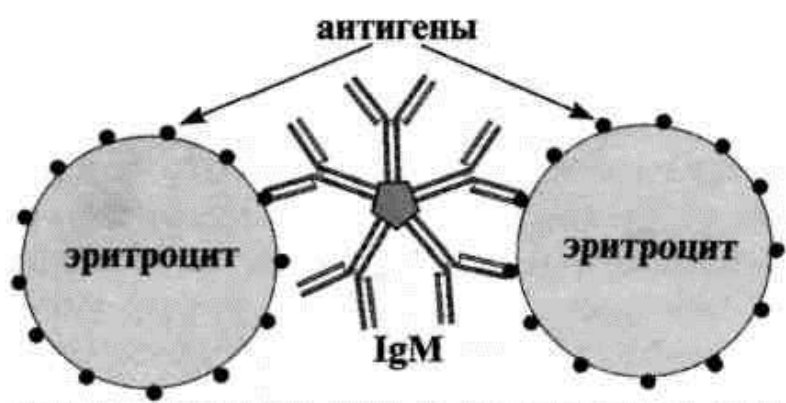


Рис. 3. Реакция непрямо́й (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА).

Ставят контроли специфичности реакции с иммунной антисывороткой (положительная реакция) и нормальной сывороткой (отрицательная реакция).

Контролем спонтанной агглютинации эритроцитов служат реакции со взвесью сенсibilизированных и несенсibilизированных эритроцитов в разведенной нормальной сыворотке.

Недостатки: трудность стандартизации эритроцитов при изготовлении диагностикумов и небольшой срок хранения диагностикумов.

Достоинства: простота и дешевизна.

Эти СР широко применяются. Например, состояние иммунитета против дифтерии у детей и подростков проверяют с помощью РПГА с дифтерийным эритроцитарным диагностикумом (анатоксином). Неиммунными считаются лица с титром анитоксина менее 0,03 МЕ/мл. (1:20).

Необходимые ингредиенты:

- 1) испытуемая сыворотка;
- 2) диагностикум дифтерийный эритроцитарный;
- 3) физиологический раствор;
- 4) противодифтерийная контрольная сыворотка с активностью 10МЕ/мл;
- 5) полистероловые пластины (при их отсутствии – пробирки).

Испытуемую сыворотку разводят физ. раствором от 1:10 до 1:20480 в 12 лунках. Реакция ставится в объеме 0,8мл.

Вносят по 1 капле диагностикума в каждую лунку.

Противодифтерийную контрольную сыворотку (с активностью 10МЕ/мл) разводят от 1:10 до 1:20480 и вносят также по 1 капле диагностикума.

Оставляют при комнатной температуре на 3 часа (максимум на 15-20 часов) и читают реакцию.

Учет реакции проводят по степени агглютинации эритроцитов, которую оценивают по 4-х кратной системе:

++++ – агглютинировавшие эритроциты ровным слоем выстилают все дно лунки, образуя по форме перевернутый купол; края купола иногда заворачиваются;

+++ – в верхней части агглютината отмечается узкое более широкое плотное кольцо;

++ – в верхней части аглютината более широкое плотное кольцо из эритроцитов, но меньшее по диаметру;

+ – на дне лунки образуется широкое плотное кольцо из эритроцитов, но меньшее по диаметру;

- – на дне лунки имеются плотный диск или плотное широкое кольцо, но уменьшенного диаметра по сравнению с реакцией в +.

Титром антитоксина в исследуемом материале считают последнее максимальное разведение, которое еще вызывает агглютинацию эритроцитов.

Расчет активности испытуемой сыворотки производят по формуле:

$$X = \frac{10 \times A}{B},$$

где: X – активность испытуемой сыворотки в МЕ/мл.;

10 – титр контрольной сыворотки в МЕ/мл.;

A – максимальное разведение испытуемой сыворотки с положительным результатом;

B – максимальное разведение контрольной сыворотки с положительным результатом.

## 2. Реакция коаггуляции, латексагглютинации

Диагностикум представлен стафилококками для коаггуляции и частицами латекса - для латексреакции, на поверхности которых находятся АТ (рис.4).

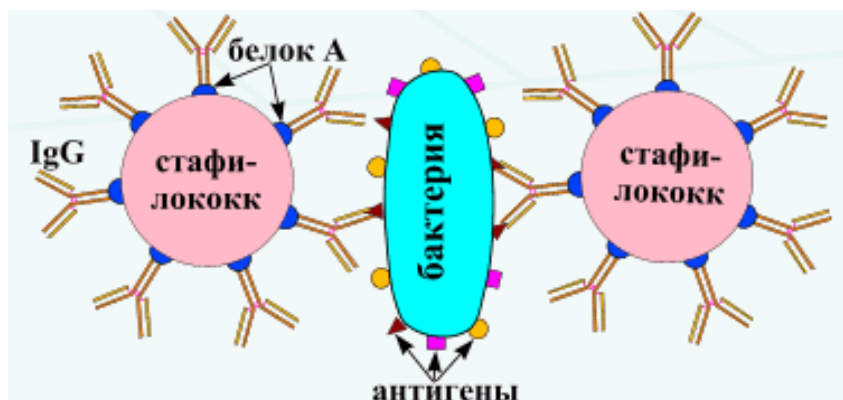


Рис. 4. Реакция коаггуляции.

В случае с фиксированными клетками стафилококка связывание АТ происходит за счет взаимодействия Fc-участками IgG с молекулами протеина А. При получении латексных диагностикумов используют химическое связывание АТ или АГ с полимерной основой частиц или взаимодействие, основанное на гидрофобных силах.

Достоинства: простота постановки.

Недостаток: возможность неспецифической агглютинации.

## РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Преципитация и агглютинация – это довольно сходные реакции, которые различаются главным образом на основании физических свойств АГ. В первом случае он представлен в растворимой, во втором – в корпускулярной формах. В основе РП лежит образование преципитата в процессе реакции АГ-АТ.

РП высоко специфична и чувствительна.

Ингредиенты реакции:

- 1) растворимый АГ или гаптен (преципититоген);
- 2) АТ-преципитины (иммунная преципитирующая сыворотка; получают иммунизацией кроликов соответствующими АГ);
- 3) изотонический раствор хлорида натрия или агаровый гель.

Методы постановки РП:

1. РП в растворах – реакция кольцепреципитации;
2. РП в геле

### Реакция кольцепреципитации

Реакцию кольцепреципитации ставят в узких преципитационных пробирках, в которые разливают преципитирующие сыворотки. Затем наливают раствор преципитиногена. При положительной реакции на границе соприкосновения ингредиентов появляется мутное кольцо преципитации. Если в качестве антигенов в реакции кольцепреципитации используют прокипяченные и профильтрованные водные экстракты органов и тканей, то реакция носит название реакции **термопреципитации по Асколи**, применяемая для обнаружения термостабильных гаптенов возбудителей сибирской язвы и чумы (рис.5).

Одна из разновидностей **РП в геле (реакция Оухтерлони)** позволяет определять токсигенность дифтерийной палочки с помощью антитоксической сыворотки. В чашку Петри с питательной средой помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанной антитоксической противодифтерийной сывороткой и засевают исследуемыми культурами в виде штрихов, перпендикулярных к полоске

бумаги. Инкубируют при 37 °С в течение суток. При наличии токсигенной культуры в месте взаимодействия токсина с антитоксином образуются линии преципитации (рис.6).

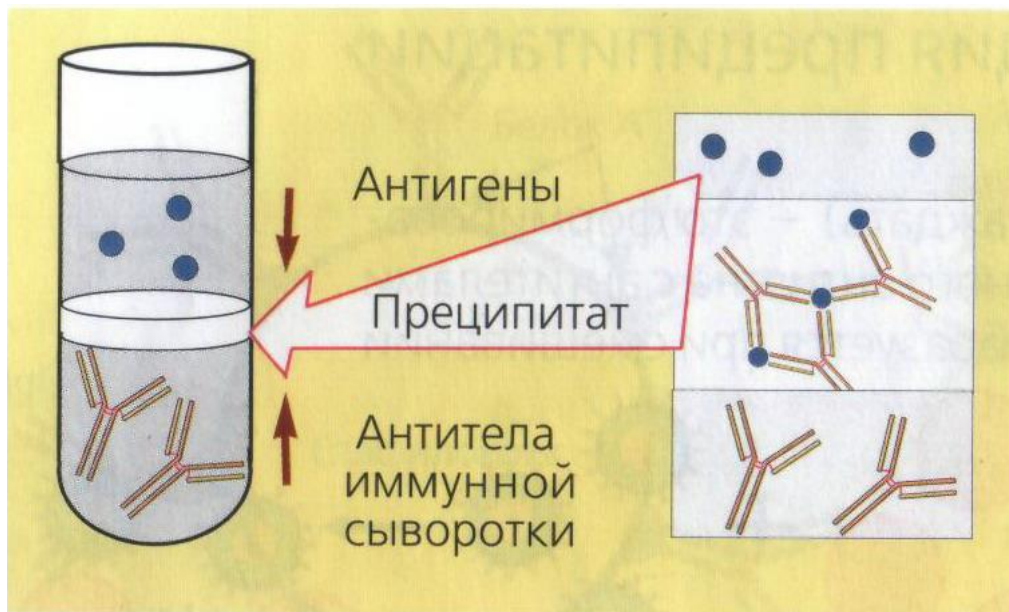


Рис. 5. Реакция кольцепреципитации.



Рис. 6. Реакция преципитации в геле по Оухтерлони.

Реакция преципитации в геле носит название иммунодиффузии. Часто форе-  
резом в геле – **иммуноэлектрофорез**. Принцип метода: исследуемый антиген

фракционируют электрофоретически, полученные фракции анализируют методом двойной диффузии при помощи антисыворотки.

### **Постановка РП по Асколи с целью обнаружения антигена сибиреязвенных бацилл.**

Для постановки реакции преципитации необходимо иметь: преципитиноген - гаптен *V.anthraxis* (экстракт из тканей), преципитин (преципитирующая сибиреязвенная сыворотка) и физиологический раствор.

Приготовление термопреципитиногена:

- 1) в колбочку, содержащую 1 г измельчённой кожи или 1 мл культуры *V. anthracis* налить 10 мл физиологического раствора.
- 2) колбу поместить в кипящую баню на 30-45 минут.
- 3) профильтровать через асбестную вату. Фильтрат должен быть совершенно прозрачен.

Для реакции преципитации фильтрат разводится в 100 раз и более.

Постановка реакции кольцепреципитации:

- 1) в преципитационную пробирку наливается 0,3 мл преципитирующей сыворотки цельной или в разведении 1:5, 1:10;
- 2) по стенке пробирки осторожно наслаивается преципитиноген.

Реакция считается положительной, если на границе двух жидкостей образуется мутное кольцо выпадающего белка не позднее 5-15 минут

При постановке реакции преципитации применяют следующие контроли:

- а) антиген и физиологический раствор;
- б) специфическая сыворотка и физ. раствор;
- в) антиген и неспецифическая сыворотка.

Во всех контрольных пробирках помутнения не должно быть. Для реакции преципитации пользуются специальными преципитационными пробирками высотой 40-60 мм и диаметром 4-5 мм, преципитация в узких пробирках наступает значительно скорее и проявляется более чётко, чем в обычных пробирках, их тщательно моют и высушивают, чтобы стекло их было совершенно прозрачным и сухим.

## РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ КОМПЛЕМЕНТА

### Реакции лизиса: бактериолиза и лизиса

Специфические АТ, обуславливающие лизис (растворение) клеток, носят название лизинов. Эти АТ применительно к бактериям называются бактериолизинами, к эритроцитам – гемолизинами.

Лизины способны проявить свое лизирующее действие на АГ только в присутствии комплемента, который является составной частью любой свежей сыворотки.

Таким образом, в основе реакции лизиса лежит взаимодействие трех компонентов:

- 1) корпускулярного АГ (бактериальных клеток, эритроцитов и др. клеток);
- 2) специфических АТ иммунной сыворотки (бактериолизинов, гемолизинов и др.);
- 3) комплемента (сыворотка морской свинки).

В начале реакция идет по типу агглютинации, затем к комплексу АГ-АТ присоединяется комплемент. Наступает активация компонентов комплемента, которая приводит к лизису клеток (АГ).

В микробиологической диагностике реакция бактериолиза применяется для:

- 1) определения вида неизвестного микроба при помощи специфической сыворотки;
- 2) определения в исследуемой сыворотке наличия бактериолизинов к известному микробу.

Исследуемую сыворотку, для разрушения имеющегося в ней комплемента, инактивируют при 56 °С в течение 30 минут.

Под воздействием бактериолизинов в присутствии комплемента микробы теряют подвижность, меняют форму (набухают), распадаются и, наконец, совсем растворяются.



Реакция бактериолизиса применяется при холере с целью идентификации вибрионов и определения вибриолизина в сыворотке (р. иммобилизации вибрионов холерными сыворотками); при сифилисе (р. иммобилизации трепонем), при лептоспирозе (р. агглютинации-лизиса); при возвратном тифе – с целью серодиагностики (р. лизиса).

### **Реакция гемолиза.**

Под влиянием реакции с АТ-ми в присутствии комплемента мутная взвесь эритроцитов превращается в ярко красную прозрачную жидкость – «лаковую кровь» в следствии выхода гемоглобина. Реакция гемолиза используется как индикаторное при постановке диагностической реакции связывания комплемента (РСК), для титрования комплемента и гемолитической сыворотки.

### **Реакция связывания комплемента (РСК).**

РСК отличается высокой чувствительностью и специфичностью и применяется для:

- 1) серологической диагностики инфекционных заболеваний (р. Вассермана – при сифилисе, р. Борде-Жангу – при хронической гонорее и др.);
- 2) идентификации бактерии и др. микробов.

РСК относится к сложным серологическим реакциям, в которых участвуют, кроме АГ и АТ, ещё гемолитическая система (р. гемолиза), выявляющая результат реакции.

РСК проводится в два этапа при участии двух систем:

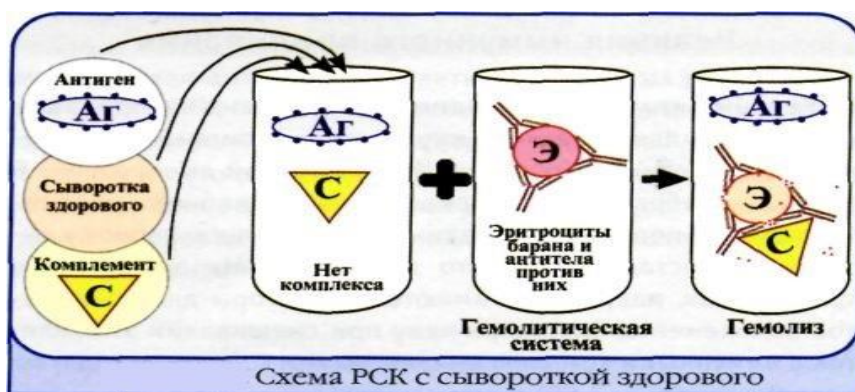
первая система – АГ+АТ+комплемент – обуславливает связывание комплемента в том случае если АТ соответствует АГ. В случае же несоответствия АТ и АГ комплемент остаётся свободным;

вторая система (индикаторная) – гемолитическая сыворотка (гемолизины) + эритроциты – показывает исход реакции в первой системе: в случае положительного результата реакции в первой системе (образования комплекса АГ+АТ+ком-

племент) во второй системе не произойдет гемолиза ввиду отсутствия компонента (эритроциты оседают на дно пробирки). В случае отрицательного результата в первой системе вторая сопровождается гемолизом, т. к. образуется комплекс эритроциты + гемолизины + комплемент (рис.7).



а



б

Рис. 7. Реакция связывания комплемента:

а - РСК с сывороткой больного; б - РСК с сывороткой здорового человека

Компоненты реакции:

- 1) испытуемая сыворотка (предварительно инактивируют нагреванием при 56 °С в течение 30 минут);
- 2) антиген (изготавливается из взвесей убитых микробов, лизатов микробов, полных АГ, гаптенов, экстрактов тканевых липидов);
- 3) комплемент;
- 4) гемолитическая сыворотка;

- 5) 3 % взвесь эритроцитов барана;
- 6) физиологический раствор;
- 7) контрольная сыворотка.

В качестве комплемента в РСК применяют свежую и высушенную сыворотку морской свинки, т. к. в крови морской свинки комплемент содержится в наибольшем количестве и присутствует постоянно, чем у др. животных. Перед постановкой РСК следует проводить титрование комплемента в реакции гемолиза (эритроциты барана, гемолитическая сыворотка, комплемент, физ. раствор) и определение рабочей дозы.

Титр комплемента – наибольшее разведение комплемента которое вызывает полный лизис эритроцитов в присутствии гемолитической сыворотки.

Рабочая доза комплемента – количество комплемента, которое выше титра на 25 %.

Гемолитическая сыворотка готовится путём иммунизации кроликов 50 % взвесью эритроцитов барана. Полученную сыворотку инактивируют нагреванием при 56 °С. Определяют титр и рабочую дозу.

Титр сыворотки – максимальное разведение сыворотки которое вызывает полный лизис эритроцитов в присутствии комплемента. В качестве рабочей дозы берут гемолитическую сыворотку в тройном титре.

### **РСК Борде-Жангу.**

Реакция ставится для диагностики хронической гонореи с целью обнаружения антител к гонококку.

В РСК участвует 2 системы: основная система – испытуемая сыворотка, антиген, комплемент и вспомогательная, индикаторная или гемолитическая система – гемолитическая сыворотка и эритроциты барана.

Если в первой системе образуются специфический комплекс антиген + антитело, то комплемент адсорбируется (соединяется с этим комплексом) и гемолиза во второй системе не происходит.

Для реакции требуется:

1) испытуемая сыворотка, которая получается из крови, взятой пункцией локтевой вены больного. После свёртывания крови сыворотка отсасывается в отдельную пробирку и инактивируется 30 минут при 56 °С на водяной бане;

2) антиген – взвесь убитых гонококков;

3) эритроциты барана получают из стерильно взятой дефибринированной крови. Их отмывают, центрифугируя 3 раза с новыми порциями физиологического раствора. В реакции используют 3 % взвесь эритроцитов;

4) гемолитическая сыворотка готовится заранее путём иммунизации кроликов эритроцитами барана. Перед употреблением производится титрование сыворотки;

5) комплемент – свежая сыворотка морской свинки. Из сердца морской свинки шприцем насасывается кровь, после свёртывания отделяется сыворотка. Перед опытом вытитровывается рабочая доза комплемента. Для этого берут основное разведение комплемента 1:10 и разливают его по пробиркам, от 0,1 до 0,5, после чего объем в каждой пробирке доводят физиологическим раствором до 1,5 мл.

Одновременно заготавливают гемолитическую систему - разведенная в тройном титре гемолитическая сыворотка + 3 % взвесь эритроцитов барана. Оба ингредиента в разных объемах и выдерживают в термостате 30 минут (сенсibilизация смеси), после чего смесь добавляют по 1 мл в пробирки помещают в термостат на 30 минут. Контролем служат 3 пробирки:

1) 1 мл гемолитической системы + 1,5 мл физиологического раствора;

2) 0,5 мл комплемента 1:10 + 0,5 мл взвеси эритроцитов + 1,5 мл физиологического раствора.

Титром комплемента называется его минимальное количество, при котором ещё происходит гемолиз. Для постановления реакции берут рабочую дозу комплемента, увеличенную против титра на 20-25 % т. е., обычно то количество комплемента, которое имеется в предпоследней пробирке с гемолизом. Увеличение дозы комплемента необходимо потому, что в реакции активность комплемента

может оказаться несколько подавленной другими ингредиентами реакции (антиген, сыворотка).

Постановка основного опыта РСК Борде-Жангу:

1. В начале в 2 пробирки разливается инактивированная и разведённая 1:5 испытуемая сыворотка. Затем в 1-ю пробирку приливается антиген, во вторую физиологический раствор. После этого во все пробирки добавляются рабочая доза комплемента.

2. После смешивания ингредиентов штатив с пробирками помещается в термостат при 37 °С на 30 минут (горячее связывание). При холодном связывании штатив с пробирками помещается в ледник при температуре -40 °С на 18 часов. После выдерживания в термостате во все пробирки добавляется гемолитическая система. Реакция ставится в объёме 0,5 мл. Пробирки снова помещают в термостат на 2 часа, после чего производится предварительная регистрация результатов. Пробирки остаются при комнатной температуре, а на следующий день отмечается окончательный результат.

3. Степень интенсивности реакции оценивается в плюсах. Полная задержка гемолиза - четыре плюса (++++), неполная - три, и один плюс. Полный гемолиз обозначается минусами (-).

### **РСК Вассермана**

Ставится для диагностики сифилиса с целью обнаружения антител, а также для определения эффективности специфической терапии. Она основана на принципе реакции связывания комплемента Борде-Жангу. Существенным отличием реакции Вассермана является неспецифичность антигена: в качестве антигена употребляют липоидные экстракты из нормальных органов животных.

Для постановки реакции Вассермана необходимо иметь:

1) сыворотку больного,

2) диагностикумы перекрестнореагирующие антигены № 1 и № 2:

- диагностикум № 1 – специфический, трепонемный.

- диагностикум №2 – неспецифический, кардиолипиновый антиген, который представляют собой высокоочищенный экстракт бычьего сердца, имеющий постоянный химический состав липоидов. Липоиды, экстрагированные из

сердца, по химическому составу близки к липоидам бледной трепонемы, поэтому хотя и не являются специфическими, но фиксируют антитела против спирохеты. Указанные антигены выпускаются централизованно и в реакцию употребляются, разведёнными согласно к титру, указанному на этикетке;

- 3) комплемент;
- 4) гемолитическую сыворотку;
- 5) эритроциты барана;
- 6) физиологический раствор.

Одновременно с основным опытом ставят 2 контроля: с заведомо отрицательной и заведено положительной сыворотками.

Постановка основного опыта:

В начале в 3 пробирки разливается инактивированная и разведённая 1:5 испытуемая сыворотка. Затем в 2 пробирки разливаются антигены (№ 1, № 2), в 3-ю пробирку физиологический раствор. После этого во все пробирки добавляется рабочая доза комплемента. После смешивания ингредиентов штатив с пробирками помещается в термостат при 37 °С на 30 минут. После выдерживания в термостате во все пробирки добавляется гемолитическая система. Пробирки снова помещают в термостат на 2 часа, а затем оставляют при комнатной температуре. На следующий день отмечают результат. Степень интенсивности реакции оценивается в плюсах. Полная задержка гемолиза - четыре плюса (++++), три (+++), два (++) и один (+) - в зависимости от интенсивности окраски жидкости и величины осадка эритроцитов на дне. Полный гемолиз обозначаются (-) минусом. При резком расхождении результатов с различными антигенами опыт повторяют с новой порцией крови.

### **Реакция радиального гемолиза**

Реакция радиального гемолиза применяется для определения антител против вирусов гриппа, краснухи, клещевого энцефалита, активности комплемента, гемолитической сыворотки.

Компоненты реакции:

- 1) исследуемая сыворотка крови с неизвестными противовирусными антителами;

- 2) антигены вирусов, адсорбированные на поверхности эритроцитов барана;
- 3) комплемент (сыворотка морской свинки в рабочей дозе);
- 4) агарозный гель.

Реакцию ставят в лунках геля из агара, содержащего вирусных антигенов, адсорбированных на поверхности эритроцитов и комплемента. После внесения в лунки геля исследуемой сыворотки с антителами (лизинами, связывающих комплемент) вокруг них, в результате радиальной диффузии АТ, образуется зона гемолиза, т.к. АТ взаимодействует с антигенами, адсорбированными на эритроцитах, после чего к этому комплексу присоединяются компоненты комплемента, что заканчивается активацией системы комплемента и гемолизом эритроцитов. Размеры зоны гемолиза прямо пропорциональны титру сыворотки.

### **Реакция иммунного прилипания**

Реакции иммунного прилипания основана на активации системы комплемента антигенами микроорганизмов (бактериями, вирусами), обработанными иммунной сывороткой. На эритроцитах, тромбоцитах, макрофагах имеются рецепторы для компонентов комплемента, благодаря чему при смешивании этих клеток с иммунным комплексом (АГ – АТ – С), происходит их соединение и агглютинация.

Компоненты:

- 1) исследуемая сыворотка с неизвестными АТ;
- 2) антигены микроорганизмов (например, антиген стафилококка);
- 3) комплемент;
- 4) форменные элементы крови (эритроциты, тромбоциты, макрофаги).

## МЕЧЕННЫЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

В настоящее время широко применяются серологические реакции, в которых участвуют меченые АГ или АТ. К ним относятся реакция иммунофлюоресценции, радиоиммунный и иммуноферментный методы, реакция иммуноблоттинга, проточная цитометрия и электронная микроскопия.

Они применяются:

- 1) для серодиагностики инфекционных заболеваний, т. е. для выявления АТ с помощью набора известных конъюгированных (химически соединённых) с различными метками (ферментами, флюорохромными красителями), антигенов;
- 2) для определения микроорганизма или его серовара с помощью стандартных меченных диагностических антител (экспресс-диагностика).

Готовят диагностические сыворотки иммунизацией животных соответствующим АГ, затем выделяют иммуноглобулины и конъюгируют их со светящимися красителями (флюорохромами), ферментами, радиоизотопами.

Диагностических моноклональных антител получают с помощью гибридных клеток, образованных путем слияния иммунного В-лимфоцита с миеломной клеткой. Гибридомы способны быстро размножаться *in vitro* в культуре клеток и продуцировать при этом иммуноглобулин, характерный для взятого В-лимфоцита.

Меченые СР по специфичности не уступают другим СР, а по своей чувствительности они превосходят все СР.

### **Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)**

В качестве метки используются светящиеся флюорохромные красители (изотиоцианат флюоресцеина и др.).

Существуют различные модификации РИФ. Для экспресс – диагностики инфекционных заболеваний - для выявления микробов или их антигенов в исследуемом материале применяется РИФ по Кунсу.

Выделяют два метода РИФ по Кунсу: прямой и непрямой.



Компоненты прямой РИФ:

- 1) исследуемый материал (испражнение, отделяемое носоглотки и др.);
- 2) меченая специфическая иммунная сыворотка, содержащая АТ к искомому антигену;
- 3) изотонический раствор хлорида натрия.

Мазок из исследуемого материала обрабатывают меченой антисывороткой.

Происходит реакция АГ-АТ. При люминесцентном микроскопическом исследовании в том участке, где локализуются комплексы АГ-АТ, обнаруживают флюоресценцию – свечение.

Компоненты непрямой РИФ:

- 1) исследуемый материал;
- 2) специфическая антисыворотка;
- 3) антиглобулиновая сыворотка (АТ против иммуноглобулина), меченная флюорохромом;
- 4) изотонический раствор хлорида натрия.

Мазок из исследуемого материала сначала обрабатывают иммунной сывороткой к искомому антигену, а затем – меченой антиглобулиновой сывороткой.

Светящиеся комплексы АГ-АТ – меченные АТ обнаруживаются при помощи люминесцентного микроскопа. (рис. 8, 9).

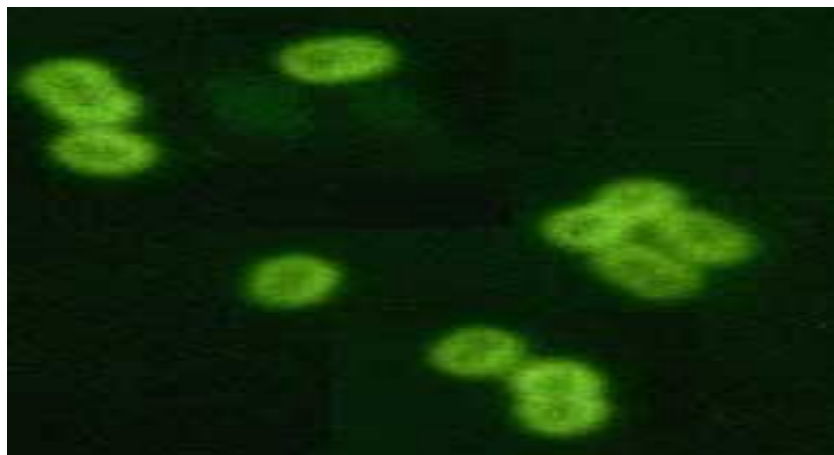


Рис. 8. Реакция иммунофлюоресценции

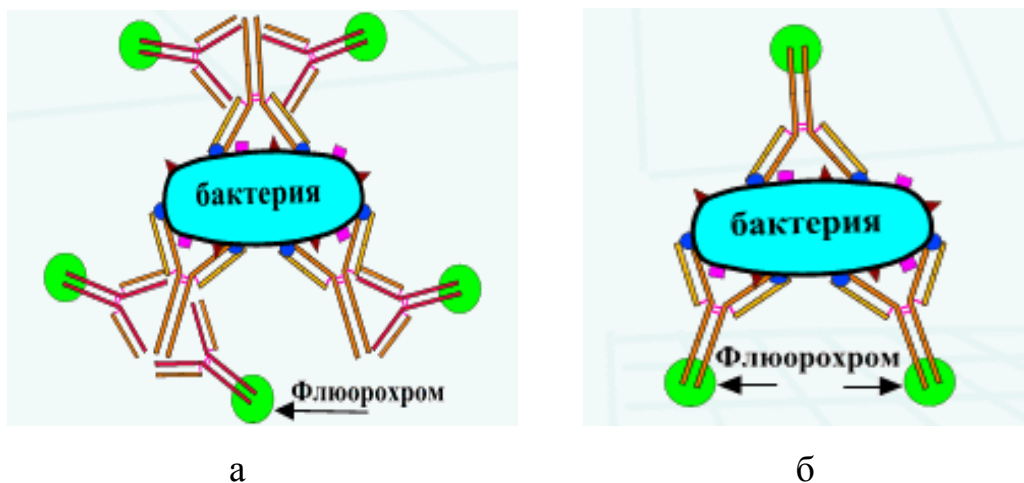


Рис. 9. Реакция иммунофлюоресценции: а - прямая; б – непрямая

Преимущество непрямого метода состоит в том, что нет необходимости приготовления широкого набора флюоресцирующих специфических сывороток, а применяется лишь одна флюоресцирующая антиглобулиновая сыворотка.

Также выделяют 4-х компонентную разновидность непрямой РИФ, когда дополнительно вводится комплемент (сыворотка морской свинки). При положительной реакции образуется комплекс АГ-АТ – меченные АТ-комплемент.

### Радиоиммунологический анализ (РИА)

В качестве метки используются радиоактивные изотопы ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ , или  $^3\text{H}$  и  $^{14}\text{C}$ ).

В зависимости от техники постановки выделяют два способа РИА:

1) техника «жидкая фаза» (классический РИА).

Недостаток этой техники постановки – необходимость специального разделения свободного и связанного меченного антигенов (или антител);

2) техника «твёрдая фаза».

АГ или АТ известной специфичности связываются на сорбентах (твёрдой фазе) – стенках полистироловой лунки или пластиковой пробирки. На иммобилизованный АГ (АТ) последовательно сорбируются остальные компоненты ИК.

В зависимости от характера реакции различают следующие методы:

а) **конкурентный метод** – метод, основанный на конкуренции антигенов (определяемого и меченного) за присоединение с адсорбированными на сорбенте антителами или антител (определяемого и меченного) за присоединение с адсорбированными на сорбенте антигенами.

Компоненты реакции:

1) определяемый АГ (исследуемый материал – кровь, мокрота и др.) или АТ (сыворотка крови);

2) идентичный к исследуемому АГ-у антиген или исследуемому АТ антитело, меченые радиоизотопом;

3) специфические АТ или АГ известной концентрации, связанные на сорбенте;

4) стандартный АГ или АТ (контрольный);

5) буферный раствор.

Сначала в реакцию вводят исследуемый АГ (или АТ). Происходит образование комплекса АГ-АТ на поверхности сорбента. Сорбент отмывают, затем вводят меченый АГ (или АТ). Чем больше содержание исследуемого АГ (или АТ), тем меньше меченного АГ (или АТ) связывается с АТ (АГ) на поверхности сорбента. Концентрацию меченного АГ (или АТ) определяют измерением радиоактивности реакции с помощью счетчиков. Величина радиоактивности реакции будет обратно пропорциональной количеству АГ (АТ) в исследуемой пробе.

б) **неконкурентный метод**.

Компоненты реакции:

1) определяемый АГ;

2) специфические АТ известной концентрации, связанные на сорбенте;

3) идентичные к связанному антителу антитела, меченые радиоизотопом;

4) стандартный АГ;

5) буферный раствор.

К связанным АТ добавляют исследуемый АГ. В процессе инкубации на сорбенте образуются комплексы АГ-АТ. Сорбент отмывают от свободных компонентов и добавляют меченые АТ, которые связываются со свободными валентностями АГ в составе комплекса. Величина радиоактивности пропорциональна концентрации исследуемого АГ.

в) «Сэндвич-метод» (непрямой метод) – наиболее распространённый метод.

Компоненты:

- 1) исследуемая сыворотка (или исследуемый АГ);
- 2) АГ, связанные на сорбенте (или АТ, связанные на сорбенте при определении АГ).
- 3) диагностические АТ против иммуноглобулинов, меченные радиоизотопами;
- 4) контрольные сыворотки (или АГ);
- 5) буферные раствор.

Исследуемые АТ (или АГ) реагируют с твёрдофазными АГ (АТ), после чего инкубат удаляется и в реакцию вводят меченые антиглобулиновые АТ, которые связываются со специфическими комплексами АГ-АТ на поверхности сорбента. Величина радиоактивности реакции прямо пропорциональна количеству исследуемого АТ (или АГ).

Достоинства РИА:

- высокая специфичность и чувствительность;
- простота техники постановки;
- точность количественной оценки результатов;
- легко поддаётся автоматизации;

Недостаток: использование радиоактивных изотопов.

## Иммуноферментный анализ (ИФА)

В качестве метки используются ферменты: пероксидаза, щелочная фосфатаза и др.

Индикатором реакции является способность ферментов вызывать цветные реакции при действии на соответствующий субстрат. Например, субстратом для пероксидазы является раствор ортофенилдиамина.

Наиболее широко применяется твердофазный ИФА (рис.10, 11, 12).

Сущность ИФА аналогична РИА.

Результаты ИФА можно оценить визуально и измерением оптической плотности на спектрофотометре.

К преимуществам ИФА следует отнести:

- отсутствие контакта с радиоактивными веществами;
- простота методов оценки реакции;
- стабильность конъюгатов;
- легко поддаётся автоматизации.

Однако по сравнению с РИА отмечают более низкую чувствительность метода, но в некоторых случаях чувствительность превосходит РИФ и РИМ.

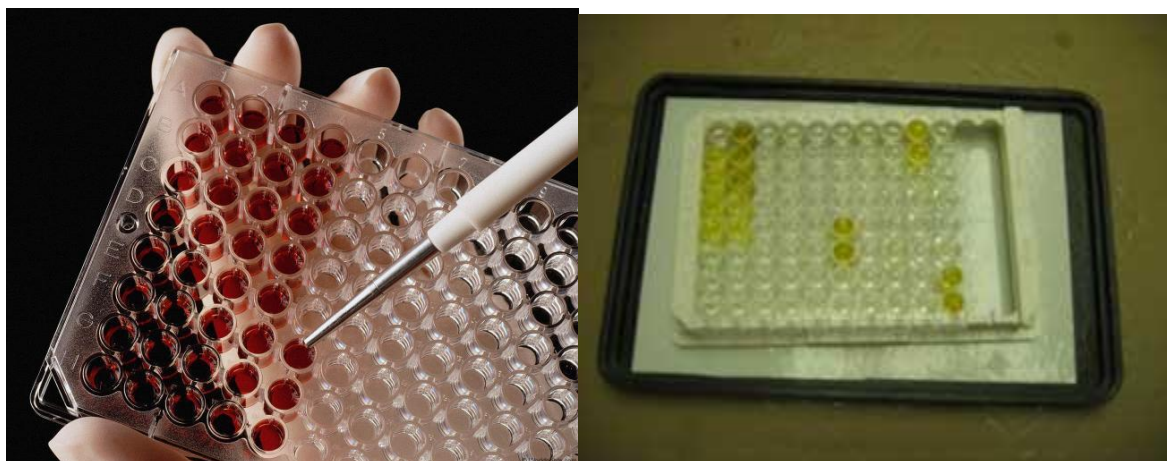


Рис. 10. Иммуноферментный анализ (твердофазный)

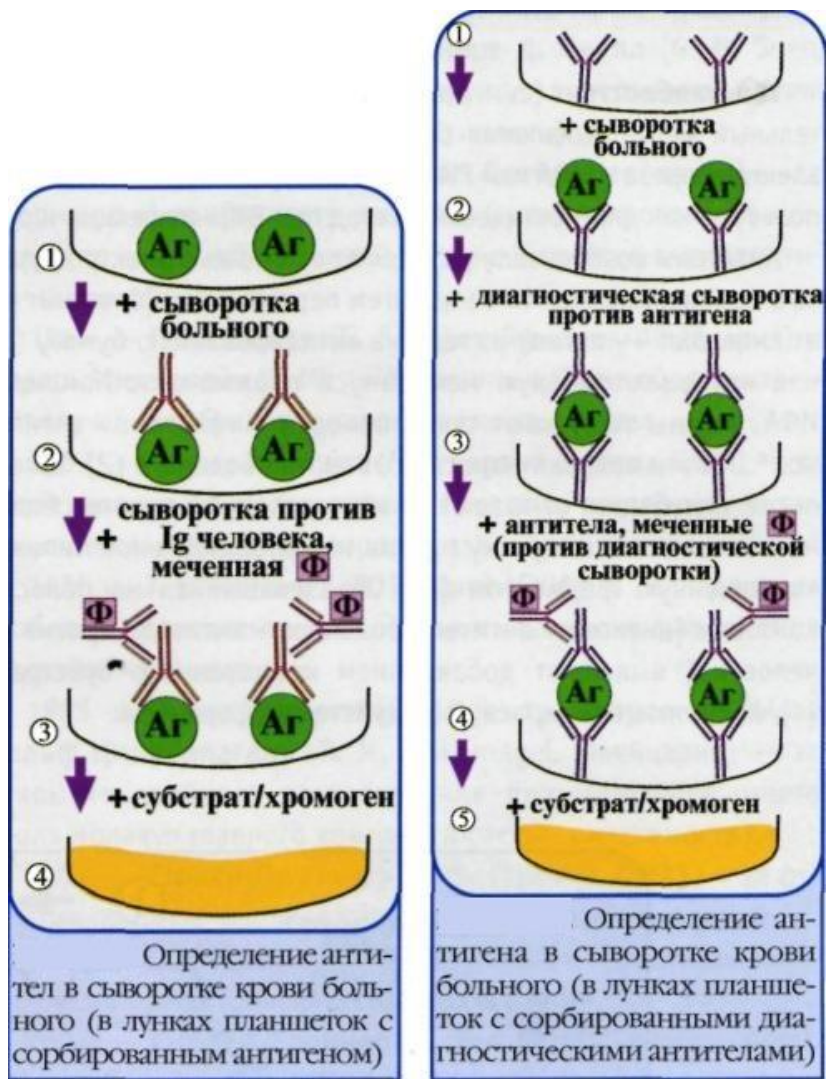


Рис. 11. Иммуноферментный анализ

### Прямой твердофазный ИФА (схема)

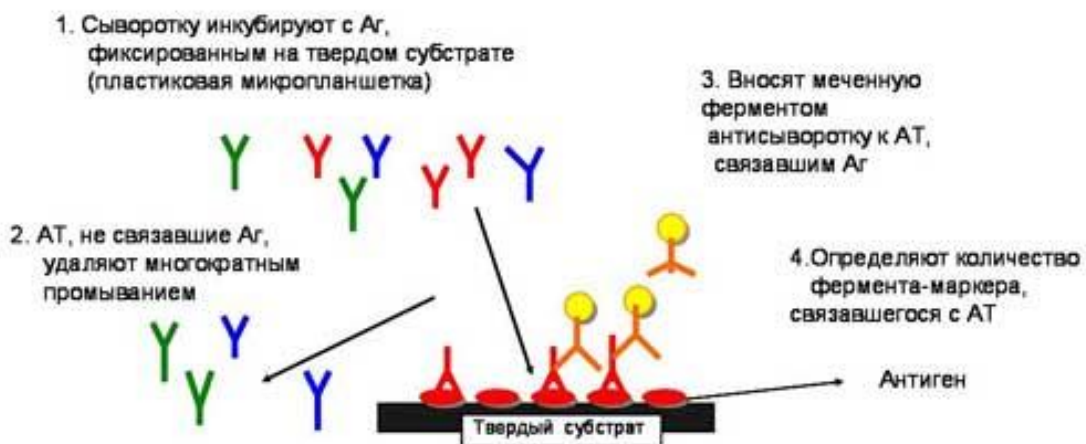


Рис. 12. Схема прямого твердофазного ИФА

В качестве примеров приводятся следующие типы ИФА:

**а) конкурентный тип**

Предназначен для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs Ag) в сыворотках и плазме крови при диагностики вирусного гепатита В и определение носительства HBs Ag.

Компоненты:

- 1) исследуемый материал – сыворотка или плазма крови;
- 2) антитела к HBs Ag, адсорбированные на поверхности лунки полистиролового микропланшета;
- 3) конъюгат – мышиные моноклональные антитела к HBs Ag, меченые пероксидазой;
- 4) ортофенилендиамин (ОФД) – субстрат;
- 5) фосфатно – солевой буфер;
- 6) контрольные сыворотки:
  - положительная (сыворотка с HBs Ag);
  - отрицательная (сыворотка без HBs Ag).

Ход работы:

1. Внесение контрольных и исследуемых сывороток.
2. Инкубация 1 час при 37 °С.
3. Отмывание лунок.
4. Внесение конъюгата.
5. Инкубация 1 час при 37 °С.
6. Отмывание лунок.
7. Внесение ОФД. При наличии HBs Ag раствор в лунках желтеет.
8. Учёт ИФА проводят по оптической плотности с помощью фотометра.

Степень оптической плотности будет обратно пропорциональной концентрации исследуемых HBs Ag.

Реакция протекает в три фазы:

1. HBs Ag исследуемой сыворотки (плазмы) связывается с гомологичными АТ, адсорбированными на поверхности лунки. Образуется ИК АГ-АТ. (HBs Ag – anti HBs АТ).

2. Антитела к HBs Ag, меченые пероксидазой связываются с оставшимися свободными детерминантами HBs Ag комплекса АГ-АТ. Образуется комплекс АТ-АГ-меченые АТ (anti HBs АТ-HBs Ag-anti HBs АТ, меченые пероксидазой).

3. ОФД взаимодействуют с пероксидазой комплекса АТ-АГ-АТ и происходит жёлтое окрашивание.

### **в) непрямой тип**

Является основной тестовой реакцией диагностики ВИЧ – инфекции.

Цель: Серологическая диагностика ВИЧ-инфекции – обнаружение антител к антигенам ВИЧ.

Компоненты:

- 1) исследуемый материал – сыворотка крови (АТ к АГ-м ВИЧ);
- 2) синтетические пептиды имитирующие 2-х антигенов ВИЧ: gp 120 и gp 41, адсорбированные на поверхности полистироловой лунки;
- 3) антиглобулиновая сыворотка, меченная пероксидазой, полученная путём иммунизации кроликов глобулинами человека (АТ к АТ);
- 4) ОФД;
- 5) фосфатно-солевой буфер;
- 6) контрольные сыворотки:
  - положительная;
  - отрицательная.

Ход работы:

1. Внесение контрольных и исследуемых сывороток.
2. Инкубация 30 минут при 37 °С.
3. Отмывание.
4. Внесение антиглобулиновой сыворотки меченой ферментом.
5. Инкубация 30 минут при 37 °С.
6. Отмывание.



## 7. Внесение ОФД.

Реакция протекает в 3 фазы:

1. Антитела к ВИЧ исследуемой сыворотки связываются с гомологичными антигенами (gp 120 и gp 41), и на поверхности сорбента образуется ИК АГ-АТ (АГ ВИЧ - АТ к ВИЧ).

2. Образование ИК АГ-АТ-АТ, меченое пероксидазой, т.к. АТ исследуемой сыворотки являются антигенами для антиглобулиновой сыворотки.

3. ОФД взаимодействует с пероксидазой комплекса АГ-АТ-АТ, и происходит жёлтое окрашивание раствора лунки. Степень ферментативной активности прямо пропорциональна концентрации исследуемых АТ.

### Реакция иммуноблотинга (РИ)

РИ разработана на основе ИФА. Является самым специфичным и чувствительным методом иммунохимического анализа. Иммуноблотинг (от англ. blot – промокать, пятно) сочетает ИФА с электрофорезом. Применяется для выявления не комплексных антител к ВИЧ, а антитела к отдельным его структурным белкам (белки-p24, гликопротеины-gp120, gp 41 и др.). Относится к экспертным (подтверждающим) реакциям диагностики ВИЧ-инфекции. Принцип метода (на примере выявления антител к ВИЧ) (рис.13).

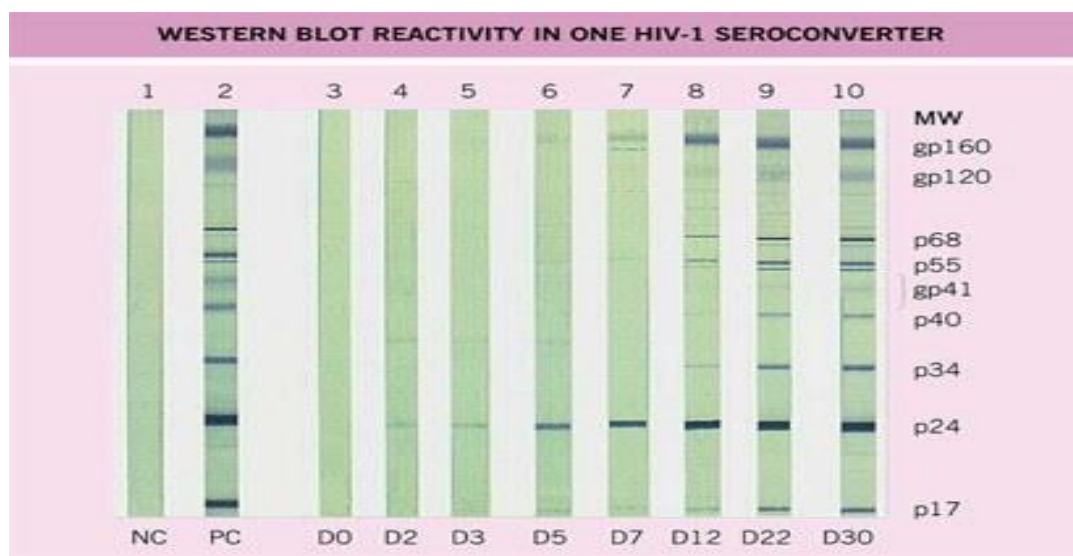


Рис. 13. Результат реакции иммуноблотинга:

1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 - полоски, вдоль которых распределились антигены ВИЧ:

р – это протеины (белки), гр – гликопротеины (белки с углеводами)

Реакция проводится в несколько этапов:

1. Вирус разрушают на компоненты - антигены (p24, gp120, gp 41 и др. ), которые подвергаются электрофорезу в полиакриламидном геле, то есть разделению антигенов на фракции по молекулярной массе.

2. Гель покрывают нитроцеллюлозной мембраной и на неё при помощи электрофореза переносятся фракции антигенов. Нитроцеллюлоза ведёт себя подобно промокательной бумаге. Мембрану разрезают на полоски (стрипы). Фирмы выпускают такие полоски с «блотами» антигенов.

3. Стрипы с нанесёнными на него антигенами ВИЧ погружают в сыворотку обследуемого и затем отмывают от несвязавшегося материала.

4. Стрипы инкубируют антиглобулиновой сывороткой, меченой пероксидазой, отмывают .

5. Добавляют субстрат и отмечают число окрашенных фракций (пятен), которые соответствуют в зоне локализации комплекса АГ-АТ.

### **Проточная цитометрия (ПЦ)**

В качестве метки используются флюоресцирующие красители (флюоресцеинизотиоцианат, дающий зеленую флюоресценцию, или фикоэритрин, дающий красное свечение).

ПЦ применяется для определения клеток крови, основных популяций лимфоцитов, цитокинов, функциональной активности НК-клеток, активности фагоцитоза, особенностей апоптоза и др.

Образец крови после обработки мечеными моноклональными антителами против CD-антигенов клеток пропускают через тонкую трубку. Лазерный луч, пропускаемый через исследуемый образец, возбуждает свечение флюорохрома. Фотоумножитель улавливает и регистрирует флюоресценцию, свидетельствующую о количестве меченных антител, связанных с исследуемой клеткой (рис.14).

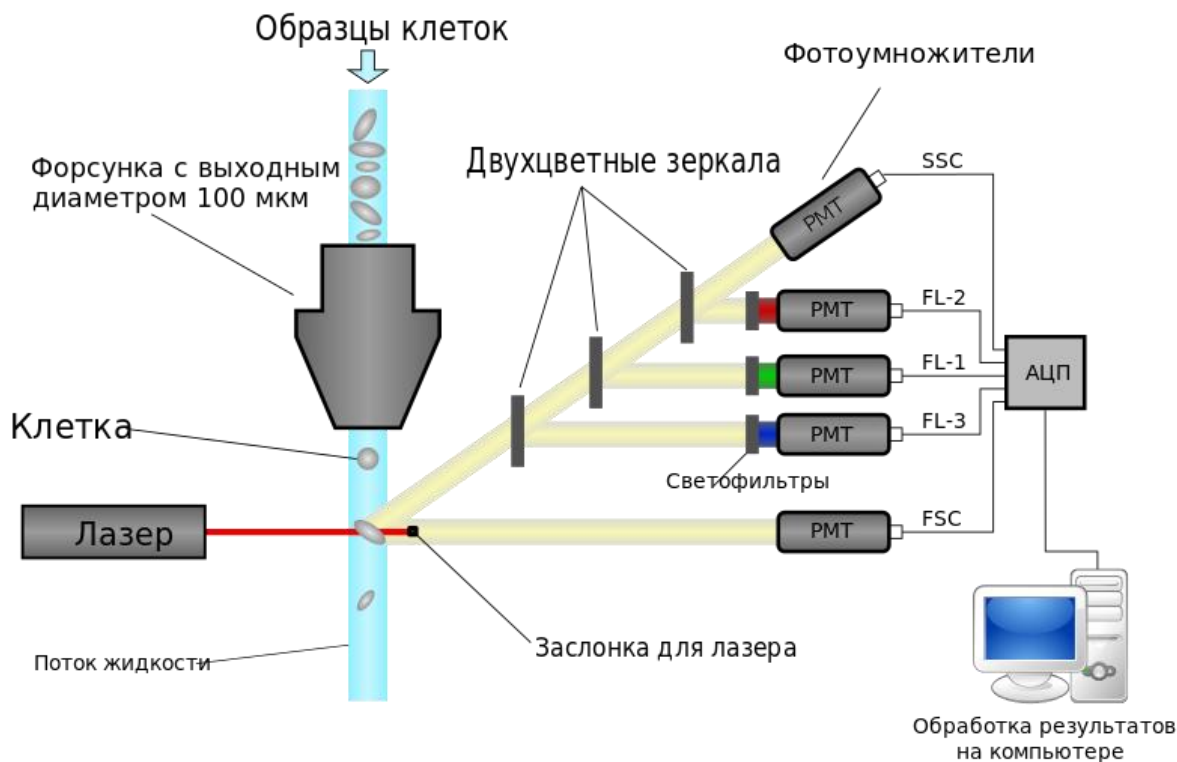


Рис. 14. Проточная цитометрия

Компоненты реакции:

- 1) исследуемый материал(образец крови);
- 2) моноклональные антитела против антигенов (напр., CD4+, CD8+ клеток), меченные флюорохромом;
- 3) проточный цитометр.

### **Иммунная электронная микроскопия (ИЭМ)**

ИЭМ представляет собой метод непосредственной визуализации взаимодействия антигена с антителом. Это было впервые предложено для вирусологических исследований Дж. Альмейда и А. Ватерсоном в 1969г.

Методически тест ИЭМ выполняется в следующей последовательности:

1. Материал, в котором предполагается наличие искомого вируса, смешивается и инкубируется со стандартной иммунной сывороткой.
2. Комплекс вирус-антитело осаждается центрифугированием в подходящих для него режимах.

3. К ресуспендированному осадку добавляется контрастирующее вещество, и полученный препарат исследуется под электронным микроскопом.

В случае положительной реакции выявляются характерные агрегаты, состоящие из вирусных частиц, соединенных между собой мостиками из антител. Порог чувствительности ИЭМ невысок. Преимуществом метода является возможность оценивать не только исход серологической реакции, но и идентифицировать ее морфологический субстрат, т. е. определить форму и размер вирусных частиц. При наличии препаратов вируса с известным содержанием частиц ИЭМ может применяться и для количественного определения антител в сыворотках, для чего предложена специальная система учета интенсивности взаимодействия вируса и антител.

На начальных этапах работы с вирусными гепатитами ИЭМ широко использовалась в диагностических и исследовательских целях; с ее помощью, в частности, были идентифицированы вирус гепатита А и вирус гепатита Е. После появления новых, более практичных, тестов для массовых исследований клинических материалов диагностика гепатитов с помощью ИЭМ постепенно утратила свое значение, но ее возможности по-прежнему ценны для характеристики морфологически отличных от вируса антигенов или каких-либо ранее неизвестных вирусных агентов.

## РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ (РН)

### Реакции нейтрализации токсина антитоксической сывороткой

Этот тип иммунологической реакции основан на способности специфических антител – антитоксинов подавлять биологическую активность бактериальных экзотоксинов.

Реакции нейтрализации токсина антитоксической сывороткой *in vitro*:

**1. Реакция флоккуляции.** Феномен флоккуляции – помутнение – внешнее проявление образования комплекса экзотоксин (анатоксин) + антитоксин в оптимальных количественных соотношениях ингредиентов.

Реакция применяется:

- для определения специфической активности токсинов (анатоксинов) по стандартной антитоксической сыворотке. Активность выражается в Limes flocculationis (Lf – порог флоккуляции) или иммуногенной единицей (ИЕ). Lf – это то количество токсина (анатоксина), которое даёт интенсивную, «инициальную» флоккуляцию с 1МЕ сыворотки

- для титрования антитоксических сывороток по известному анатоксину или токсину (метод Рамона). Сила антитоксических сывороток выражается содержанием международных антитоксических единиц (МЕ) в 1 мл. 1МЕ называют минимальное количество сыворотки, которое даёт интенсивную «инициальную» флоккуляцию с определенной дозой (Lf) анатоксина (токсина). Например, это реакция применяется для определения активности дифтерийного, столбнячного, ботулинического, гангренозного анатоксинов и титрования противодифтерийной, противостолбнячной, противоботулинической, противогангренозной и др. антитоксических сывороток.

**2. Выявление токсигенности возбудителя дифтерии в РП в геле по Оухтерлоне** (см. раздел «РП»).

Реакция нейтрализации токсина антитоксической сывороткой *in vivo*:

Реакция нейтрализации на животных применяется

- для определения специфической активности анатоксинов и опытной дозы токсина по стандартной антитоксической сыворотке (дифтерийной, столбнячной и др.). Активность анатоксинов выражается в единицах связывания (ЕС). ЕС – количество анатоксина, которое целиком связывается с 1МЕ/мл антитоксической сыворотки;

- для идентификации токсина бактерий (возбудителей газовой анаэробной инфекции, столбняка, ботулизма и др.) по стандартной антитоксической сыворотке;

- для титрования антитоксических сывороток (противодифтерийная, противостолбнячная, и др.) по стандартному токсину. Титрование – это определение количества антитоксинов в 1 мл. сыворотки. Специфическая активность сывороток выражается в международных антитоксических единицах (МЕ). 1МЕ – минимальное количество сыворотки, которое способно нейтрализовать определенную дозу токсина, выражающуюся в стандартных единицах: смертельных, некротических или реактивных дозах в зависимости от вида токсина и способа титрования.

Титрование антитоксических сывороток может производиться следующими методами:

- **метод Эрлиха.** Титрование антитоксических сывороток по известной смертельной (опытной) дозе токсина.

Проводится в 2 этапа:

1. Определение опытной дозы токсина. Смертельная доза – это количество токсина, которое в смеси с 1МЕ стандартной сыворотки вызывает гибель 50 % взятых в опыт животных.

2. К различным разведениям испытуемой сыворотки добавляют опытную дозу токсина, инкубируют 45 минут и вводят животным. По результатам производят расчет титра сыворотки.

- **метод Ремера.** Титрование антитоксических сывороток по известной некротической дозе токсина.

Проводится в 2 этапа:

1. Определение опытной некротической дозы токсина путём внутрикожного введения морской свинке различного количества токсина со стандартной сывороткой. Некротическая доза токсина – это его минимальное количество, которое в смеси с 1/50МЕ стандартной сыворотки вызывает на месте внутрикожного введения некроз на 4-5 – й день;

2. К различным разведениям испытуемой сыворотки добавляют опытную дозу токсина и вводят внутрикожно морской свинке.

По результатам производят расчёт титра сыворотки. Так титруется противодифтерийная сыворотка.

### **Реакция нейтрализации вирусов**

Реакция нейтрализации основана на способности специфических вируснейтрализующих антител блокировать инфекционные, гемагглютинирующие, гемадсорбирующие, цитопатические, бляшкообразующие и др. свойства вирусов. Она применяется в двух направлениях:

1) для идентификации вирусов;

2) для серодиагностики вирусных инфекций, т.е. для определения нарастания титра вируснейтрализующих антител в «парных» сыворотках.

Компоненты:

1) исследуемый вирус (при идентификации выделенного вируса) или исследуемая сыворотка (при серодиагностике инфекции).

2) диагностическая (группо-, видо-, типоспецифическая) сыворотка (при идентификации вируса) или известный вирус – диагностикум (при серодиагностике).

3) индикаторный объект: животные, куриные эмбрионы, культуры тканей или эритроциты.

Реакции нейтрализации **in vivo** ставят в культурах клеток (рис.15), куриных эмбрионах и на лабораторных животных.

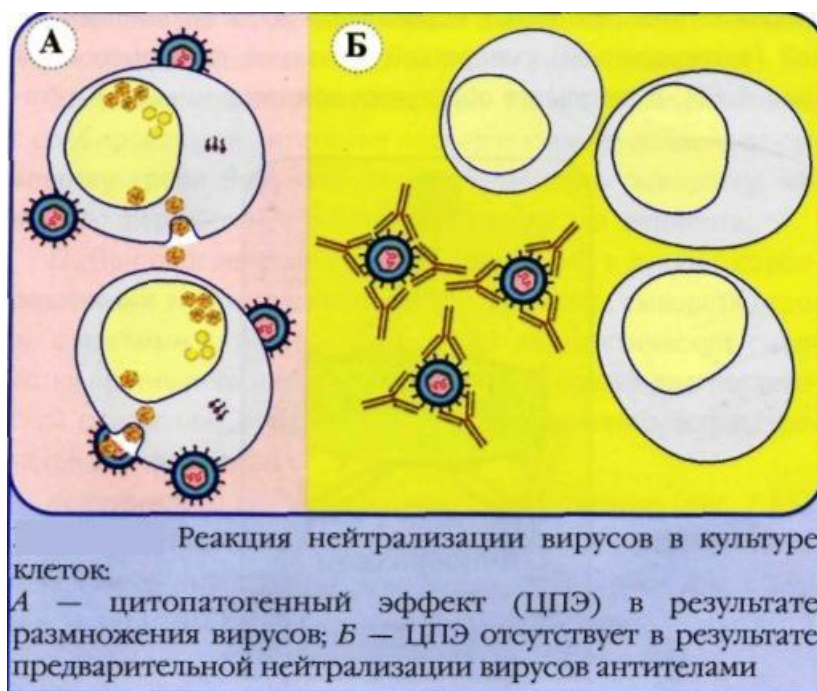


Рис. 15. Реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток.

Принцип. Смесью вирус (исследуемый или известный) + сыворотка (диагностическая или исследуемая), выдержанной в течение определенного времени, заражают культуру клеток, куриный эмбрион или лабораторное животное. При (+) реакции, т.е. при нейтрализации вируса антителами индикаторные объекты продолжают нормально существовать, а в контроле – гибель или характерные изменения.

Реакция нейтрализации **in vitro** – реакция торможения гемагглютинации (РТГА).

РТГА применяется:

- 1) для серотипирования вирусов;
- 2) для серодиагностики инфекций.

Выделяют два способа постановки:

- 1) капельный способ на стекле (ориентировочная реакция), применяется для серотипирования вирусов;



2) развернутый в пробирках.

Механизм. У некоторых вирусов (например, гриппа) есть гемагглютинин, вызывающий агглютинацию эритроцитов различных животных в зависимости от вида вируса. При наличии в сыворотке антител – антигемагглютининов наблюдается ингибированные активности вирусов (рис.1).

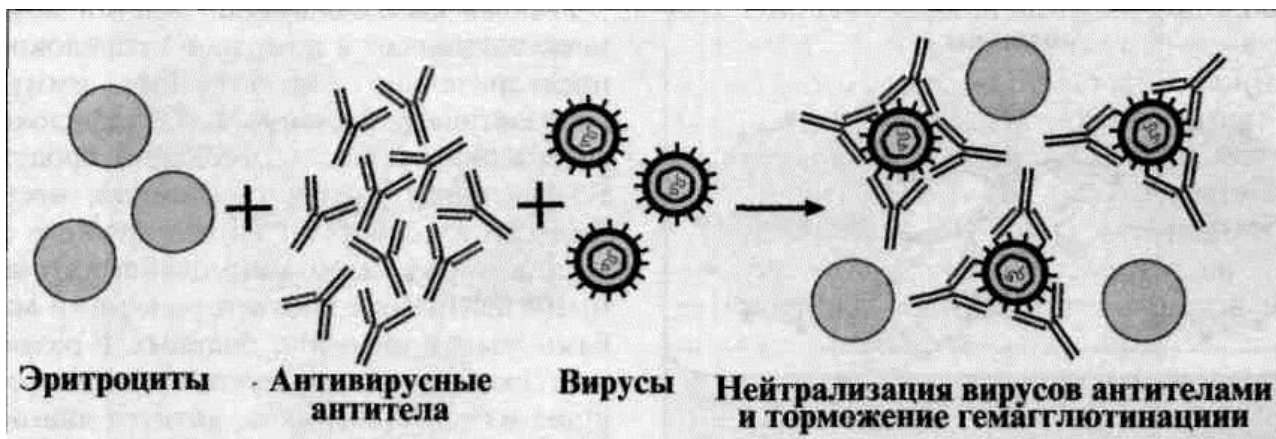


Рис. 16. Реакция торможения гемагглютинации

Компоненты.

- 1) исследуемый материал – аллантоисная жидкость куриного эмбриона;
- 2) диагностические противогриппозные типоспецифические сыворотки;
- 3) 3,5 % взвесь куриных эритроцитов;
- 4) физиологический раствор.

Реакция ставится на стекле капельным способом. На стекло наносят по 1 капле диагностических сывороток и исследуемого материала, перемешивают, затем добавляют 1 каплю взвеси эритроцитов. При положительной реакции наблюдается гомогенное покраснение, а при отрицательной – выпадение хлопьев красного цвета (гемагглютинация).

## ОПСОНО – ФАГОЦИТАРНАЯ РЕАКЦИЯ

Применяется для определения опсопинов – антител, стимулирующих фагоцитарную активность лейкоцитов, т.е. серодиагностики инфекций, например, бруцеллёза.

Усиление фагоцитоза происходит за счёт присоединения опсопинов с активными центрами (Fав – фрагмент) к детерминантам бактерий, а затем с помощью Fс – фрагментов к Fс – рецепторам фагоцитов. В нормальной сыворотке содержится небольшое количество опсопинов, которые проявляют свое действие в присутствии комплемента. В иммунной сыворотке опсопинов больше и их активность в меньшей степени зависит от комплемента.

Компоненты	Опыт	Контроль
Исследуемая сыворотка	+	-
Нормальная сыворотка	-	+
Суточная микробная культура (напр., стафилококковая)	+	+
Фагоциты – взвесь нейтрофилов	+	+

Инкубация при 37 °С в течение 30 минут. Из каждой пробирки готовят мазки, окрашивают по Романовскому – Гимзе и считают под микроскопом количество микробов в 100 и более нейтрофилах, т.е. определяют фагоцитарный показатель.

Фагоцитарный показатель – количество микробов, поглощенных одним нейтрофилом.

Опсонический индекс – фагоцитарный показатель иммунной (исследуемой) сыворотки / фагоцитарный показатель нормальной сыворотки.

Чем выше опсонический индекс (должен быть > 1), тем выше иммунитет.

Опсоно-фагоцитарный индекс – это цифровой показатель = количество фагоцитов x оценка фагоцитоза (в зависимости от количества поглощенных микробов). Максимальный показатель – 75.

## ИММУННЫЙ СТАТУС

Иммунный статус определяется совокупностью показателей специфических и неспецифических факторов защиты и характеризует индивидуальную иммунореактивность организма. Оценка иммунного статуса имеет значение:

- для выявления иммунологической недостаточности (иммунодефицита) и других патологических нарушений работы иммунной системы;
- наблюдения за эффективностью иммунодепрессивной или иммуностимулирующей терапии;
- определения показаний и выбора терапевтических препаратов.

Исследование иммунного статуса включает проведение тестов 1-го и 2-го уровней.

Тесты 1-го уровня (ориентирующие):

1. Определение факторов естественной резистентности (БАС, лизоцим, комплемент и др.);
2. Подсчет абсолютного и относительного числа лимфоцитов в периферической крови;
3. Подсчет числа Т- и В- лимфоцитов;
4. Оценка фагоцитарной активности лейкоцитов;
5. Определение концентрации разных классов иммуноглобулинов.

Тесты 2-го уровня (аналитические):

1. Определение субпопуляции Т- лимфоцитов;
2. Определение функциональной активности Т- и В- лимфоцитов;
3. Определение медиаторов иммунной системы;
4. Тесты на ГЧЗТ.

## Оценка неспецифической резистентности

### 1. Оценка бактерицидной активности кожи по Клемпарской.

Принцип метода: на поверхность кожи предплечья наносится культура *E.coli*. Через определенные промежутки времени определяют количество жизнеспособных бактерий методом отпечатков.

На основании полученных результатов рассчитывается индекс бактерицидности (ИБ) по формуле:

$$\text{ИБ} = \frac{K_0 - K_{20}}{K_0} \times 100,$$

где:  $K_0$  – количество колоний сразу после контаминации кожи;

$K_{20}$  – количество колоний через 20 минут.

В норме ИБ 95 %

### 2. Определение активности комплемента с помощью РСК.

### 3. Определение активности лизоцима.

Титр лизоцима – это максимальное разведение исследуемого материала (слюны), в котором еще проявляется литическая активность лизоцима по отношению к эталонному штамму микроорганизмов (*Micrococcus lysodeicticus*).

### 4. Оценка фагоцитоза.

А. Определение процента активных фагоцитов – это количество клеток, обладающих фагоцитарной активностью. В норме – не менее 50 %.

Фагоцитарное число – среднее количество микробов, поглощенных одним фагоцитом. В норме 4-6.

Принцип метода: в цитратную кровь вносят культуру стафилококков и инкубируют в термостате 30 минут. Затем готовят мазки, окрашивают их по Романовскому, микроскопируют и рассчитывают показатели.

### Б. Оценка завершенности фагоцитоза.

Принцип метода: в цитратную кровь вносят культуру кишечной палочки и делают мерный высеv на питательную среду. После 120 минутной инкубации в

термостате мерный высев повторяют и инкубируют оба посева в термостате. Через сутки проводят подсчет колоний и рассчитывают процент завершенности фагоцитоза (ЗФ) по формуле:

$$\text{ЗФ} = \frac{K_0 - K_{30}}{K_0} \times 100,$$

где:  $K_0$  – количество колоний сразу после инокуляции;

$K_{30}$  – количество колоний через 120 минут.

В норме завершенность фагоцитоза – 50-99 %

## **Методы оценки клеточного иммунитета**

### **- количественная оценка:**

1. *Определение количества Т- лимфоцитов методом Е – розеткообразования (Е-РОК).*

Принцип метода: на первом этапе методом центрифугирования в градиенте плотности из крови выделяют лимфоциты. На втором этапе с помощью реакции розеткообразования с эритроцитами барана определяют процент Т-лимфоцитов от общего числа. Реакция розеткообразования основана на наличии на поверхности Т-лимфоцитов рецепторов, способных фиксировать эритроциты барана. Поэтому при добавлении к суспензии лимфоцитов эритроцитов барана, последние адсорбируются Т- лимфоцитами. Образующиеся при этом структуры называются розетками. Розеткообразующей считается клетка, окруженная с тремя и более эритроцитами. Общее количество лимфоцитов подсчитывают под микроскопом и количество розеток.

2. *Определение количества Т-лимфоцитов (CD3+) и их субпопуляций - Т-хелперов (CD4+) и Т-киллеров (CD8+) в реакциях иммунофлюоресценции (РИФ), ИФА и проточной цитометрии.*

Принцип РИФ: лимфоцитарная взвесь обрабатывается моноклональными антителами против отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов, а затем – меченой флюорохромом антиглобулиновой сывороткой. Подсчет флюоресцирующих клеток проводят под люминесцентным микроскопом (двухэтапная РИФ).

### *3. Определение иммунорегуляторного индекса (соотношения CD4+/CD8+)*

#### **- качественная (функциональная) оценка:**

*1. Оценка способности к пролиферации в реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ).*

Принцип метода: Т- лимфоциты под воздействием некоторых биостимуляторов, например, фитогемагглютинина (ФГА) в культуре *in vitro* способны превращаться в большие бластоподобные клетки с разрыхленным ядром и базофильной цитоплазмой, активно синтезирующие ДНК.

*2. Определение цитокинов (ИФН- $\alpha$ , ИЛ-2, -4, -6, ФНО) с помощью ИФА и проточной цитометрии.*

*3. Постановка кожно-аллергических проб с целью выявления Т клеток ГЗТ и другие.*

#### **Методы оценки гуморального иммунитета**

#### **- количественная оценка:**

*1. Определение количества В-лимфоцитов методом ЕАС – розеткообразования (ЕАС-РОК).*

Принцип метода: аналогичен реакции розеткообразования для выявления Т-лимфоцитов, но вместо эритроцитов барана используются эритроциты быка (Е), нагруженные антителами (А) и комплементом (С). Взаимодействие обусловлено наличием у В-лимфоцитов рецепторов к комплементу.

*2. Определение числа В-лимфоцитов (CD20+ или CD19+) с помощью ИФА и проточной цитометрии.*

#### **- качественная (функциональная) оценка:**

*1. Определение концентрации иммуноглобулинов в реакции преципитации по Манчини и ИФА.*

Принцип метода по Манчини: образцы исследуемой сыворотки помещают в лунки агарового геля, который содержит антитела против иммуноглобулина

определенного класса. Иммуноглобулины, диффундирующие в агар, при взаимодействии с соответствующими антителами образуют кольца преципитата, диаметр которых пропорционален концентрации иммуноглобулинов соответствующего класса в исследуемой сыворотке. Концентрацию иммуноглобулина определяют по заранее построенному с помощью эталонных сывороток графику (калибровочной кривой).

*2. Определение функциональной активности лимфоцитов с помощью РБТЛ на В-митоген.*

*3. Определение продукции ИЛ-6 с помощью ИФА и проточной цитометрии.*

## КОЖНЫЕ АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ ПРОБЫ

Применяются для выявления ГЗТ (инфекционной аллергии). ГЗТ – реакция, опосредованная Т-лимфоцитами играют важную роль в патогенезе многих инфекций (туберкулеза, лепры, бруцеллеза, сифилиса и др.).

Для постановки аллергических проб применяются аллергены (корпускулярные и растворимые):

- растворимые аллергены - отдельные фракции клеточной стенки, выделенные из микробов:

1) очищенный туберкулин (ППД-Л) – очищенный белок (низкомолекулярный белок) туберкулезной палочки. Применяется для выявления аллергии к возбудителю туберкулеза (проба Манту);

2) аллерген бруцеллезный (бруцеллин) – полисахаридно-белковый комплекс *B. abortus*. Применяется для выявления аллергии к возбудителю бруцеллеза.

3) аллерген сибироязвенный (антраксин) – белковонуклиосахаридный комплекс. Применяется для выявления аллергии к возбудителю сибирской язвы.

- корпускулярные аллергены (взвесь убитых микробов):

1) аллерген тулярийный (тулярин) применяется для выявления аллергии к возбудителю туляремии.

2) лепромин применяется для выявления аллергии к возбудителю лепры.

Принцип метода: внутрикожно или накожно в ладонную поверхность предплечья вводится небольшое количество аллергена. При наличии инфекционной аллергии через 24-48-72 час. Развивается инфекционная аллергия в виде гиперемии, инфильтрата, отека кожи (рис.17).



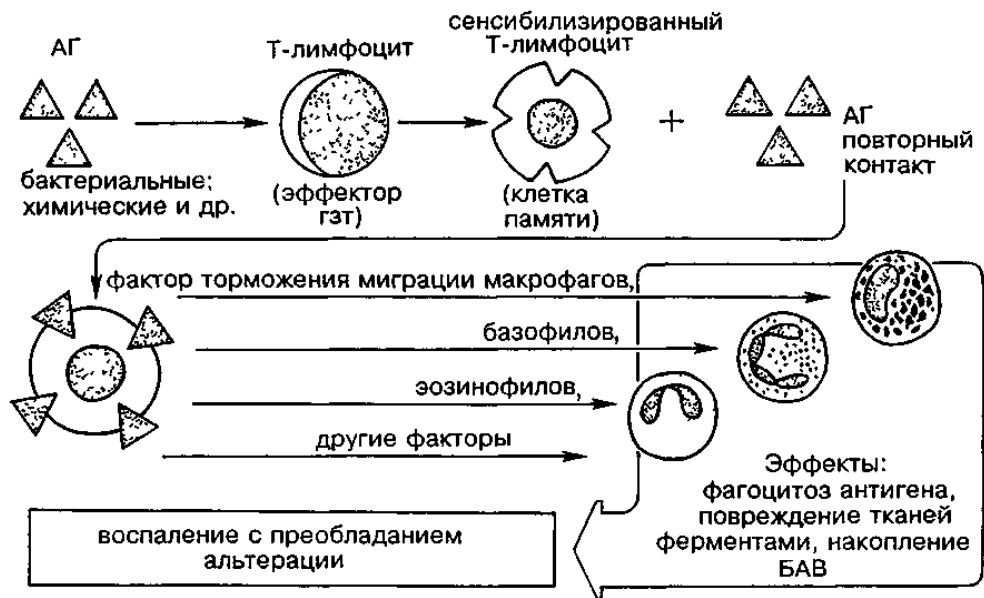


Рис. 17. Механизм ГЗТ.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ

1. С какой целью применяется реакция Кумбса?

- 1) для обнаружения опсоинов;
- 2) для обнаружения неполных антител;
- 3) для установления вида микроорганизма;
- 4) для определения серовара микроорганизма;
- 5) для обнаружения антитоксинов.

2. Укажите механизм первой стадии серологической реакции

- 1) агглютинация;
- 2) преципитация;
- 3) соединение АГ с АТ;
- 4) лизис;
- 5) связывание комплемента.

3. Какую реакцию можно использовать для оценки состояния Т-звена иммунной системы?

- 1) РСК;
- 2) РПГА;
- 3) проточную цитометрию;
- 4) опсоно – фагоцитарную реакцию.

4. Какой феномен серологических реакций наблюдается, если антигеном является экзотоксин?

- 1) преципитация;
- 2) агглютинация;
- 3) опсонизация;
- 4) лизис;
- 5) нейтрализация.

5. ЕАС-РОК основан на выявлении...

- 1) С3 рецептора В-клеток;
- 2) С3 рецептора А-клеток;
- 3) рецепторов к эритроцитам;
- 4) Fc-рецепторов.

6. ЕА-РОК основан на выявлении...

- 1) С3 рецепторов В-клеток;
- 2) Fc-рецепторов А-клеток;
- 3) Fc-рецепторов Т-клеток;
- 4) рецепторов к эритроцитам.

7. Назовите компоненты системы комплемента, обладающие опсонизирующими свойствами

- 1) С 5;
- 2) С 7;
- 3) С 9;
- 4) С3В С4В.

8. Назовите компоненты системы комплемента, обеспечивающие литическое действие

- 1) С2;
- 2) С3В;
- 3) С8, С9;
- 4) С3А, С3В;
- 5) С1.

9. Рабочая доза комплемента равна ...

- 1) титру комплемента;
- 2) титру, сниженному на 25-30 %;
- 3) титру, увеличенному на 25-30 %;
- 4) 1/2 титра.

10. Назовите маркера Т-киллеров

- 1) HLA - A;
- 2) HLA - DR;
- 3) CD - 3;
- 4) CD - 8;
- 5) CD - 4.

11. Активацию Т – лимфоцитов вызывает...

- 1) митоген Лаконоса;
- 2) липополисахарид;
- 3) фитогемагглютинин;
- 4) декстрансульфат;
- 5) поливинилпирролидон.

12. Лимфобласт – это...

- 1) лимфоцит в конечной фазе дифференцировки;
- 2) лимфоцит с цитотоксическими эффекторными свойствами;
- 3) предшественник зрелых лимфоцитов;
- 4) лимфоцит в фазе интенсивного размножения.

13. Назовите цитокина Т-хелпера, стимулирующего пролиферацию и дифференцировку других субпопуляций Т-клеток

- 1) интерлейкины;
- 2) IL 2;
- 3) IL 3;
- 4) IL – 6;
- 5) IL – 5.

14. В реакции агглютинации участвует антиген...

- 1) растворимые;
- 2) корпускулярные;
- 3) любые.

15. Повышением чувствительности бактерий к фагоцитозу является реакция...

- 1) агглютинации;
- 2) нейтрализации токсина;
- 3) опсонизации;
- 4) связывание комплемента;
- 5) преципитации.

16. Какие антигены участвуют в реакции агглютинации?

- 1) белки;
- 2) полисахариды;
- 3) экзотоксин;
- 4) микробные клетки.

17. Назовите антигены - маркеры Т-киллеров

- 1) HLA - A;
- 2) HLA - DR;
- 3) CD - 3;
- 4) CD - 8;
- 5) CD - 4.

18. Какая реакция применяется для идентификации Т-лимфоцитов?

- 1) М - РОК;
- 2) ЕА - РОК;
- 3) ЕАС - РОК;
- 4) Е - РОК.

19. Активацию Т – лимфоцитов вызывает...

- 1) митоген Лаконоса;
- 2) липополисахарид;
- 3) фитогемагглютинин;
- 4) декстрансульфат;
- 5) поливинилпирролидон.

20. Лимфобласт – это...

- 1) лимфоцит в конечной фазе дифференцировки;
- 2) лимфоцит с цитотоксическими эффекторными свойствами;
- 3) предшественник зрелых лимфоцитов;
- 4) лимфоцит в фазе интенсивного размножения.

21. Показателем активности инфекционного процесса является...

- 1) Ig M;
- 2) IgG;
- 3) IgM и IgG.

22. АГ – 2-х млрд. взвесь бактерий на физиологическом растворе вызывает следующий феномен серологической реакции:

- 1) преципитация;
- 2) агглютинация;
- 3) опсонизация;
- 4) лизис;
- 5) флокуляция.

23. Детерминанты иммуноглобулинов, взаимодействующие с антиглобулиновыми антителами, применяемыми в «непрямых» серологических реакциях?

- 1) идиотипическими;
- 2) аллотипическими;
- 3) изотипическими.

24. Иммуни́м интерфероно́м являе́тся...

- 1) бетта-интерферон;
- 2) гамма-интерферон;
- 3) альфа-интерферон.

25. Ча́сть молекулы антитела, отве́тственная за активацию компле́мента

- 1) «L» - цепи;
- 2) Fc-фрагмент;
- 3) Fав – фрагмент;
- 4) активные центры;
- 5) H-цепи.

26. Назовите цитокин Т-хелпера, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку других субпопуляций Т-клеток

- 1) IL - 1;
- 2) IL - 2;
- 3) IL - 3;
- 4) IL - 6;
- 5) IL - 5.

27. Какие антитела используют для иммуноферментного анализа?

- 1) антител, реагирующих с ферментами;
- 2) антител, конъюгированных с ферментами
- 3) антител, нейтрализующих действие ферментов.

28. Какое время требуется для проявления ГЗТ к аллергену?

- 1) несколько минут;
- 2) 24 часа;
- 3) 72 часа;
- 4) 12 часов;
- 5) не ранее 6 часов.

29. Какие лимфоциты играют главную роль при ГЗТ?

- 1) В1-лимфоциты;
- 2) В-лимфоциты;
- 3) Т-хелперы;
- 4) сенсibiliзирoванные Т - лимфоциты;
- 5) Т-киллеры.

30. Активацию В – лимфоцитов не вызывают...

- 1) фитогемагглютинин;
- 2) коканавалин А;
- 3) липополисахарид;
- 4) антигены;
- 5) цитокины.

31. Классический путь активации комплемента запускается...

- 1) комплексом АГ – АТ;
- 2) липополисахаридами микробов;
- 3) через пропердиновую систему.

32. Назовите функцию, которую не вызывают активированные компоненты комплемента.

- 1) разрушают клетки;
- 2) усиливают фагоцитоз;
- 3) участвуют в анафилактических реакциях;
- 4) вызывают хемотаксис;
- 5) стимулируют антителообразование.



33. Какие рецепторы имеются на макрофагах?

- 1) Fc - Ig G;
- 2) Fc – Ig A;
- 3) эритроцитов.

34. Укажите название сыворотки, необходимую для постановки реакции агглютинации с целью серодиагностики

- 1) диагностикум;
- 2) испытуемая сыворотка;
- 3) физиологический раствор;
- 4) диагностическая сыворотка;
- 5) комплемент.

35. Назовите способ постановки реакции агглютинации

- 1) в специальных пробирках диаметром 0,5 см;
- 2) на стекле;
- 3) в геле.

36. Назовите рецептор – маркер Т лимфоцитов

- 1) FC - рецепторы для Ig;
- 2) к эритроцитам мыши;
- 3) C3 рецепторы для комплемента;
- 4) к эритроцитам барана.

37. Назовите рецептор, имеющийся на В-лимфоцитах

- 1) вируса кори;
- 2) вируса герпеса;
- 3) вируса Эпштейн – Барра;
- 4) эритроцитов барана.

38. Активацию В-лимфоцитов вызывают следующие вещества

- 1) фитогемагглютинин;
- 2) коканавалин А.

39. Цитокины – это...

- 1) белки, образуемые активированными клетками иммунной системы;
- 2) интерфероны;
- 3) интерлейкины;
- 4) ФНО;
- 5) лейкины.

40. Назовите антиген, участвующий в реакции РП

- 1) корпускулярный;
- 2) растворимый.

41. Назовите основные способы постановки РП

- 1) реакция на стекле;
- 2) реакция в геле;
- 3) развернутая реакция.

42. Назовите условия, определяющие скорость серологических реакций

- 1) оптимальное соотношение антигена и антитела;
- 2) рН среды;
- 3) степень специфичности антигена и антитела;
- 4) температура;
- 5) концентрация электролитов.

43. Назовите рецептор – маркер Т- лимфоцитов

- 1) Fc – рецептор для IgA;
- 2) для эритроцитов мыши;
- 3) C3 – рецептор для комплемента;
- 4) для эритроцитов барана.

44. Кожно-аллергические пробы применяются для выявления следующих реакций

- 1) анафилактической реакции;
- 2) цитотоксической реакции;
- 3) иммунокомплексной реакции;
- 4) клеточно-опосредованной реакции.

45. Назовите компонент-антиген РНГА

- 1) эритроцитарный диагностикум;
- 2) физиологический раствор;
- 3) сыворотка больного;
- 4) сыворотка морской свинки;
- 5) гемолитическая сыворотка.

46. Назовите аллергены, применяемые для выявления ГЗТ

- 1) взвесь убитых бактерий;
- 2) пыльца растений;
- 3) вирусы.

47. Инфекционная аллергия - это повышенная чувствительность к...

- 1) аллергенам микроорганизмов;
- 2) сывороточным аллергенам;
- 3) пыльцам растений;
- 4) пищевым аллергенам.

48. Кожно-аллергические пробы, применяемые при туберкулезе

- 1) р. Манту;
- 2) р. Бюрне;
- 3) р. с тулярином;
- 4) р. с антраксином;
- 5) р. с кандидозным аллергеном.

49. Диагностическая система РСК включает следующий антиген

- 1) комплемент;
- 2) диагностикум;
- 3) сыворотку крови больного;
- 4) эритроциты барана;
- 5) гемолитическую сыворотку.

50. Индикаторная система РСК включает следующий антиген

- 1) комплемент;
- 2) диагностикум;
- 3) сыворотку крови больного;
- 4) эритроциты барана;
- 5) гемолитическую сыворотку.

51. С какой целью применяется р. опсонизации?

- 1) выявления АТ в исследуемой сыворотке;
- 2) выявления АТ к вирусам;
- 3) идентификации микробных АГ;
- 4) установления серовара бактерий.

52. Назовите реагенты, используемые для выявления антител в непрямом методе иммуноферментного анализа

- 1) меченые антитела против антигена;
- 2) меченые антитела против иммуноглобулинов;
- 3) немеченые антитела против иммуноглобулинов;
- 4) комплемент.

53. Назовите ингредиент, служащей меткой для постановки иммуноферментного анализа

- 1) индикаторный фермент;
- 2) антигены;
- 3) энзиммеченные антитела;
- 4) немеченые антитела;
- 5) хромоген.

54. Назовите методы иммунохимического анализа, в которых используется хромогенный субстрат

- 1) радиоиммунный анализ;
- 2) иммунофлюоресцентный анализ;
- 3) иммуноэлектрофорез;
- 4) иммуноблоттинг.

55. Выберите характеристику метода иммуноблоттинга

- 1) основан на сочетании электрофореза и иммуноферментного анализа.;
- 2) позволяет выявлять нуклеотидов;
- 3) позволяет судить о сероконверсии;
- 4) включает использование меченых антител.

56. С какой целью применяется реакция нейтрализации?

- 1) опсопинов
- 2) токсинов
- 3) неполных антител
- 4) антигена, полученного путем кипячения.

57. Назовите антигены, участвующие в реакции нейтрализации

- 1) белки;
- 2) полисахариды;
- 3) корпускулярные антигены;
- 4) экстракты клеток.

58. Реакция преципитации применяются с целью...

- 1) выявления антител в исследуемой сыворотке;
- 2) выявления антител к вирусам;
- 3) идентификации микробных антигенов;
- 4) установления серовара бактерий;
- 5) установления серогруппы микроорганизмов.

59. Назовите реакцию используемую для определения неполных антител

- 1) реакция Оухтерлони;
- 2) реакция Кумбса;
- 3) реакция Вассермана

60. Назовите сыворотку, применяемую для нейтрализации биологической активности вируса

- 1) антитоксическая сыворотка;
- 2) противовирусная сыворотка;
- 3) экзотоксин;
- 4) вируссодержащий материал.

61. Назовите индикаторный объект в РН для определения цитопатогенного действия вируса

- 1) куриные эмбрионы;
- 2) лабораторные животные;
- 3) вируссодержащий материал;
- 4) иммунная сыворотка;
- 5) тканевая культура

62. Реакции нейтрализации основаны на ингибировании антителами...

- 1) инфекционного свойства вирусов;
- 2) куриного эмбриона

63. Реакции РН применяются для определения...

- 1) активности экзотоксинов;
- 2) активности эндотоксинов

64. Назовите способы постановки РН.

- 1) в организме лабораторных животных;
- 2) на стекле капельным способом

65. Индикаторами РН являются...

- 1) латекс-частицы;
- 2) эритроциты

66. Определение иммуноглобулинов по Манчини – это...

- 1) РП в геле;
- 2) РП в пробирках;
- 3) РА;
- 4) РПГА.

## СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

**Задача 1.** Из испражнения больного с подозрением на дизентерию выделена чистая культура *Sh. flexneri*. Какая серологическая реакция позволит определить серотип возбудителя для расшифровки эпидемиологической обстановки? Назовите компоненты реакции.

**Задача 2.** В клинику поступил больной с предполагаемым диагнозом: «Грипп», «Парагрипп». Для экспресс - диагностики поставлен непрямой способ РИФ. Назовите компонентов реакции.

**Задача 3.** В инфекционную больницу поступили двое больных с предполагаемым диагнозом «Гепатит А». У первого больного в сыворотке крови обнаружены IgM против вируса гепатита А, а у второго – IgG. С помощью какого метода можно определить Ig? У кого из больных подтвержден диагноз и почему?

**Задача 4.** Выделена чистая культура вируса полиомиелита. Требуется определение серотипа вируса (1,2,3) в реакции нейтрализации на тканевой культуре. Назовите ингредиентов и механизм реакции.

**Задача 5.** В вирусологическую лабораторию поступил материал (ликвор) от больного с предположительным диагнозом: «Клещевой энцефалит». После выделения чистой культуры вируса осуществляется идентификация вируса в РН на мышцах. Назовите ингредиентов и механизм реакции.

**Задача 6.** В лабораторию поступила сыворотка крови пациента переболевшего брюшным тифом. С помощью какой серологической реакции можно установить брюшнотифозное бактерионосительство? Назовите ингредиентов.

**Задача 7.** Выделить чистую культуру *M.pneumoniae* удастся редко и не ранее через месяц. В связи с этим основным методом диагностики пневмоний является серодиагностика, которая осуществляется постановкой РСК. Назовите компонентов реакции.

**Задача 8.** При исследовании отделяемого зева больного выделена культура *S.diphtheriae*. Какой метод следует применить для определения ее токсигенности? Назовите ингредиентов реакции.



**Задача 9.** Для уточнения диагноза заболевания больного с подозрением на бруцеллез необходимо использовать опсонофагоцитарную реакцию. Какие ингредиенты следует подготовить для ее постановки? Что такое опсонины, фагоцитарный показатель и опсонический индекс?

**Задача 10.** Какие ингредиенты необходимо подготовить для постановки непрямого способа ИФА с целью определения Т-хелперов?

**Задача 11.** У больного с хроническим сепсисом необходима оценка иммунологического статуса. Какие ингредиенты необходимо подготовить для постановки непрямого способа ИФА с целью определения В-лимфоцитов?

**Задача 12.** У ребенка 3 лет подозревают наличие иммунодефицитного состояния. Какие показатели будут использованы для оценки В-системы иммунитета и какие тесты будут включены в иммунологический анализ?

**Задача 13.** В лабораторию поступила кровь от больного брюшным тифом для постановки реакции агглютинации. Какие ингредиенты будут использованы для ее постановки? Какой показатель реакции будет использован в качестве диагностического?

**Задача 14.** Из испражнений больного выделена *E.coli*. Какие методики реакции агглютинации будут использованы для идентификации культуры?

**Задача 15.** В детском саду планируется ревакцинация детей против туберкулеза. Какую аллергическую пробу и с какой целью предварительно сделать детям? Какой препарат применяется для постановки пробы?

**Задача 16.** В лабораторию поступил материал (кожа из полушубка) для выявления возбудителя сибирской язвы. Какую серологическую реакцию следует применить для обнаружения антигенов возбудителя в исследуемом материале? Какие ингредиенты необходимо подготовить для ее постановки?

**Задача 17.** В лабораторию поступила кровь больного с подозрением на грипп. Для подтверждения диагноза необходимо поставить РСК. Какие ингредиенты необходимо подготовить для ее постановки? По какому признаку будете оценивать положительный или отрицательный результат реакции?

**Задача 18.** Выделена культура вируса гриппа А заражением в аллантаоисную полость куриного эмбриона. Необходимо поставить РТГА с целью определения серотипа вируса гриппа. Какие ингредиенты необходимо подготовить для ее постановки? По какому признаку можно оценить результат реакции?

**Задача 19.** В лабораторию поступил смыв из носоглотки больного аденовирусной инфекцией. Необходимо поставить реакцию нейтрализации с диагностической целью. Какие ингредиенты необходимо подготовить для ее постановки? Оцените результат.

**Задача 20.** В детском садике планируется осуществить вакцинацию против дифтерии и столбняка АДС вакциной. Какую иммунологическую реакцию используют для определения напряженности поствакцинального иммунитета? Какие ингредиенты следует подготовить? Как оценивается реакция?

**Задача 21.** В лабораторию института вакцин и сывороток поступила противодифтерийная сыворотка для определения ее специфической активности. Какую реакцию следует использовать для этой цели? Какие ингредиенты следует приготовить для ее постановки?

**Задача 22.** В лабораторию поступила кровь от больного с подозрением на эпидемический сыпной тиф. При изучении ее в реакции агглютинации получен положительный результат (титр сыворотки 1:800). Антитела при сыпном тифе обнаруживаются с 5-6-го дня болезни, достигая максимума к 14-16-му дню и сохраняются в организме переболевших долгие годы.

Удалось ли поставить этиологический диагноз? Почему? Какие дополнительные исследования можно предложить?

**Задача 23.** У доярки совхоза при исследовании крови на наличие антител к бруцеллам обнаружен титр 1:200. Как доказать, больна ли доярка в настоящий момент или этот показатель – результат прививки?

**Задача 24.** В хирургическом отделении у больного развилось осложнение послеоперационной раны. Клинически была заподозрена газовая гангрена. Поставлена РНГА для обнаружения экзотоксина в крови больного. Какие ингредиенты необходимо подготовить для ее постановки?

**Задача 25.** В порт прибыл корабль с грузом из Африки. Карантинная служба порта обнаружила в трюмах трупы крыс. Укажите метод серологического исследования термоэкстракта трупного материала крыс. Предполагаемый диагноз чума.

**Задача 26.** Мужчина 40 лет обратился к врачу на 8-й день болезни. Несколько дней назад он купался в реке, выше по течению которой было место скота. Среди животных в данной местности регистрировались заболевания лептоспирозом. Врач заподозрил возможность лептоспироза. Для подтверждения диагноза необходимо поставить реакцию агглютинации - лизиса. Какие ингредиенты необходимо подготовить для ее постановки? По какому признаку будете оценивать положительный или отрицательный результат реакции? Как оценивается реакция? Назовите механизм реакции.

**Задача 27.** В одном из детских садов зарегистрированы случаи заболевания скарлатиной. Как проверить наличие антитоксического иммунитета к скарлатине у контактных детей? Какие ингредиенты необходимо подготовить для ее постановки?

**Задача 28.** Первые опыты по противотуберкулезной иммунизации были проведены Р. Кохом. Он многократно вводил туберкулин морской свинке, а затем и инфицировал ее микобактериями туберкулеза. Животное погибало от туберкулеза через 2-4 недели. Почему у животных отсутствовал иммунитет против туберкулеза?

## ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ И СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

### Тестовые задания

1. 2	23. 2	45. 1
2. 3	24. 2	46. 1
3. 3	25. 2	47. 1
4. 5	26. 2	48. 1
5. 1	27. 2	49. 2
6. 3	28. 5	50. 4
7. 4	29. 4	51. 1
8. 3	30. 1	52. 2
9. 3	31. 1	53. 1
10. 4	32. 5	54. 4
11. 3	33. 1	55. 1
12. 4	34. 2	56. 2
13. 2	35. 2	57. 1
14. 2	36. 4	58. 3
15. 3	37. 3	59. 2
16. 4	38. 2	60. 2
17. 4	39. 1	61. 5
18. 4	40. 2	62. 1
19. 3	41. 2	63. 1
20. 4	42. 1	64. 1
21. 1	43. 4	65. 2
22. 2	44. 4	66. 1

## Ситуационные задачи

**1.** РА на стекле капельным способом.

Компоненты: Выделенная чистая культура *Sh.flexneri*, диагностические моноклональные сыворотки против 1 и 2 типов *Sh.flexneri*, физиологический раствор.

**2.** Отделяемое носоглотки, диагностические видоспецифические сыворотки (противогриппозная и противопарагриппозная), антиглобулиновая сыворотка, меченная флюорохромом; изотонический раствор хлорида натрия

**3.** Ig отдельных классов определяют с помощью ИФА. Гепатит А подтверждается у первого больного, так как Ig M является показателем активности инфекционного процесса.

**4.** Исследуемый вирус, диагностические типоспецифические сыворотки с антителами против трех серотипов вируса полиомиелита, тканевые культуры. Учет реакции проводится по отсутствию ЦПД на тканевой культуре из-за нейтрализации патогенного свойства вируса специфическими антителами

**5.** Исследуемый вирус, диагностическая видоспецифическая сыворотка с антителами против вируса клещевого энцефалита, белые мыши для опыта и контроля (вирус без сыворотки). При положительной реакции мышка выживает из-за нейтрализации инфекционного свойства вируса гомологичными антителами.

**6.** Реакция пассивной Vi-гемагглютинации. Ингредиенты: сыворотка больного, эритроцитарный Vi-диагностикум (Vi - АГ *S.typhi*, адсорбированной на поверхности эритроцитов барана), физиологический раствор.

**7.** Сыворотка крови больного, диагностикум *M.pneumoniae*, сыворотка морской свинки (комплемент), эритроциты барана, гемолитическая сыворотка, физиологический раствор.

**8.** РП в геле по Оухтерлони. Ингредиенты: выделенная чистая культура *S.diphtheriae*, полоска фильтровальной бумаги, пропитанной противодифтерийной антитоксической сывороткой, чашка Петри с питательной средой.

**9.** Ингредиенты: исследуемая сыворотка крови, суточная микробная культура, взвесь нейтрофилов (фагоцитов).

Опсонины – антитела (IgG, частично IgA), усиливающие фагоцитоз микробов. Роль опсонин выполняют также компоненты комплемента, белки острой фазы, сурфактантные белки легких и другие факторы.

Фагоцитарный показатель – количество микробов, поглощенных одним нейтрофилом, определяют путем подсчета среднего количества фагоцитированных бактерий на один лейкоцит.

Опсонический индекс – фагоцитарный показатель иммунной (исследуемой) сыворотки / фагоцитарный показатель нормальной сыворотки.

Чем выше опсонический индекс (должен быть  $> 1$ ), тем выше иммунитет.

**10.** Ингредиенты: плазма крови (взвесь лимфоцитов), моноклональные антитела против CD3 клеток, антиглобулиновая сыворотка, меченная пероксидазой; субстрат для пероксидазы (ОФД), фосфатно-солевой буфер.

**11.** Ингредиенты: плазма крови (взвесь лимфоцитов), моноклональные антитела против CD19-22 клеток, антиглобулиновая сыворотка, меченная пероксидазой; субстрат для пероксидазы (ОФД), фосфатно-солевой буфер.

**12.** Определение количества В-лимфоцитов методом ЕАС – розеткообразования (ЕАС-РОК), ИФА, ПЦ. Определение концентрации иммуноглобулинов в реакции преципитации по Манчини, ИФА. Определение продукции ИЛ-4, 5, 6 с помощью ИФА и проточной цитометрии.

**13.** Ингредиенты: сыворотка крови больного в разведениях 1:100, 1:200, 1:400, 1:800; диагностикумы (S.typhi, S.P.A., S.P.B), физиологический раствор. Диагностический титр – 1:200, т.е. реакция считается положительной при наличии агглютинации в разведении сыворотки 1:200 и более. Обычно она наступает в больших разведениях. Если наблюдается групповая агглютинация с двумя или тремя антигенами, то учет реакции проводится по максимальному разведению сыворотки.

**14.** РА на стекле капельным способом. Положительная реакция подтверждается развернутой РА.

**15.** Перед вакцинацией ставится проба Манту с целью определения поствакцинального противотуберкулезного нестерильного иммунитета. Ревакцинации подлежат лица с отрицательной пробой Манту. Для постановки пробы применяются очищенный туберкулин (ППД-Л) – очищенный белок туберкулезной палочки.

**16.** РП по Асколи. Для постановки реакции преципитации необходимо иметь: преципитиноген - гаптен *B. anthracis* (экстракт из тканей), преципитин (преципитирующая противосибиреязвенная сыворотка) и физиологический раствор.

**17.** Ингредиенты: парные сыворотки крови (сыворотки, взятые в начале и конце заболевания), диагностикум вируса гриппа, комплемент (сыворотка морской свинки), гемолитическая сыворотка, 3 % взвесь эритроцитов барана, физиологический раствор. При положительной реакции наблюдается гемагглютинация, при отрицательной - гемолиз эритроцитов (лаковая кровь). Диагностическое значение имеет четырехкратное увеличение титра антител во второй сыворотке.

**18.** Аллантаисная жидкость куриного эмбриона, диагностические противогриппозные типоспецифические сыворотки: А0, А1, А2; 5 % взвесь куриных эритроцитов, физиологический раствор.

Реакция ставится на стекле капельным способом. На стекло наносят по 1 капле диагностических сывороток и исследуемого материала, перемешивают, затем добавляют 1 каплю взвеси эритроцитов. При положительной реакции наблюдается гомогенное покраснение, а при отрицательной – выпадение хлопьев красного цвета (гемагглютинация).

**19.** Смыв из носоглотки, диагностическая видоспецифическая сыворотка с антителами против аденовируса, индикатор реакции (тканевые культуры или эритроциты). При положительной реакции отмечается задержка цитопатогенного действия в культуре тканей или отсутствие гемагглютинации).

**20.** РПГА. Необходимые ингредиенты: испытуемая сыворотка в различных разведениях (1:10, 1::20, 1:40 и др); эритроцитарные диагностикумы (дифтерийный и столбнячный), физиологический раствор, контрольные сыворотки (противодифтерийная и противостолбнячная) с активностью 10МЕ/мл.

Учет реакции проводят по степени агглютинации эритроцитов. При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде компактной точки или толстого кольца, при положительной - оседают в виде ровного слоя клеток с неровным краем (в виде зонтика).

Титром антитоксина в исследуемом материале считают последнее максимальное разведение, где еще наблюдается агглютинация.

**21.** Можно использовать реакцию флоккуляции. Ингредиенты реакции: противодифтерийная сыворотка в различных разведениях, дифтерийный анатоксин с активностью 1Lf, физиологический раствор.

Активность сыворотки выражается в МЕ/мл. (минимальное количество сыворотки, которое даёт интенсивную «инициальную» флоккуляцию с 1Lf анатоксина). Феномен флоккуляции – (помутнение) – внешнее проявление образования комплекса анатоксин + антитоксин в оптимальных количественных соотношениях ингредиентов.

**22.** Нет, т.к. реакция может быть положительной в 3-х случаях: у больных, переболевших и вакцинированных. Рекомендуются повторная постановка реакции через 10 – 14 дней для определения нарастания титра антител в 4 и более раза, что определяется только у больных.

**23.** Подтвердить диагноз можно с помощью ИФА определением противобруцеллезных IgM и IgG. IgM является показателем острого бруцеллеза.

**24.** Двухкратные разведения исследуемой сыворотки, эритроцитарный антигеновый диагностикум (эритроциты с адсорбированными антитоксинами к экзотоксинам соответствующих видов возбудителей газовой гангрены), физиологический раствор.

**25.** Реакция термокольцепреципитации по Асколи.



**26.** Ингредиенты реакции: исследуемая сыворотка крови в различных разведениях, живая лабораторная культура лептоспир, комплемент, физиологический раствор. Учет реакции проводят в препаратах «раздавленной» капли в темном поле или при фазово-контрастной микроскопии. Под воздействием противолептоспирозных бактериолизин в присутствии комплемента лептоспиры теряют подвижность и распадаются.

**27.** Проверить наличие иммунитета к скарлатине у контактных детей можно с помощью РПГА.. Ингредиенты реакции: испытуемая сыворотка (разводят физ. раствором от 1:10 до 1:20480 в 12 лунках. полистероловой пластины), диагностикум скарлатинозный эритроцитарный (анатоксин *Str.pyogenes* , адсорбированный на поверхности эритроцитов), противодифтерийная контрольная сыворотка с активностью 10 МЕ/мл, физиологический раствор;

Титром антитоксина в исследуемом материале считают последнее максимальное разведение, которое еще вызывает агглютинацию эритроцитов.

**28.** Туберкулин применяется для постановки кожно-аллергической пробы с целью выявления специфической сенсибилизации к инфекционному аллергену, что возникает в результате текущего, перенесенного заболеваний, вакцинации или инфицирования. Для специфической профилактики применяется вакцина BCG.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

### Основная литература:

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник для студентов мед. вузов / под ред. А. А. Воробьева. – 2-е изд., испр. и доп. М. : МИА, 2012. – 702 с.

2. Коротяев А. И., Бабичев. С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология [Электронный ресурс]: учебник для мед. вузов. СПб.: СпецЛит, 2010.

Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785299004250.html>.

3. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология [Электронный ресурс]: учебник: в 2 т. Т. 1. М.:Гэотар Медиа, 2010.

Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN97859704142241.html>.

4. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология [Электронный ресурс] : учебник : в 2 т. Т. 2. М.:Гэотар Медиа, 2010.

Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN97859704142242.html>.

5. Хаитов Р.М. Иммунология: учебник второе издание. - М.: Гэотар Медиа, 2011. – 312с.

6. Хаитов Р.М. Иммунология [Электронный ресурс]: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.

Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970412220.html>.

### Дополнительная литература:

1. Л. В. Ковальчук, Г. А. Игнатьева, Л. В. Ганковская и др. Иммунология. Практикум. Клеточные, молекулярные и генетические методы исследования [Электронный ресурс]: учебное пособие. М.: Гэотар Медиа, 2010.

2. Р. М. Хаитов, А. А. Ярилин, Б. В. Пинегин Иммунология [Электронный ресурс]: атлас. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.

Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970418581.html>

3. Е.Н. Медуницына, Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин. Методы диагностики в аллергологии и иммунологии [Электронный ресурс]. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.

Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/970409039V0001.html>.

4. Н. Ф. Снегова, Р. Я. Мешкова, М. П. Костинов, О. О. Магаршак. Вакцинопрофилактика в аллергологии и иммунологии [Электронный ресурс]. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.

Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/970409039V0005.html>.

Давлетшина Гульшат Кинзябулатовна

Габидуллин Зайнулла Гайнулович

Ахтариева Айгуль Атласовна

Туйгунов Марсель Маратович

Булгаков Айдар Казбекович

Савченко Татьяна Алексеевна

Хуснаризанова Рауза Фазыловна

Габидуллин Юлай Зайнуллович

Алсынбаев Махамат Махаматуллович

### **Иммунодиагностические реакции**

Учебное пособие

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.

Подписано к печати 26.11.2014 г.

Отпечатано на цифровом оборудовании

с готового оригинал-макета,

представленного авторами.

Формат 60x84 1/16. Усл.-печ. л. 4,88.

Тираж 110 экз. Заказ № 01.

450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3,

Тел.: (347) 272-86-31

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

## **ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ**

**Учебное пособие**

**Уфа**

**2016**