

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И ЗООТЕХНИИ

З.А. Литвинова, Н.И. Землянская

ИММУНОЛОГИЯ

*Учебно-методическое пособие
для лабораторных занятий*

*для студентов специальности 36.05.01 – Ветеринария
и направлений подготовки 06.03.01 – Биология,
36.03.01 – Ветеринарно-санитарная экспертиза*



Благовещенск
Издательство ДальГАУ
2015

УДК 575(027)

Литвинова, З.А. Иммунология: учебно-методическое пособие для лабораторных занятий / сост. З.А. Литвинова, Н.А. Землянская. – Благовещенск: ДальГАУ, 2015. – 47 с.

В пособии содержатся сведения о правилах работы в иммунологической лаборатории, представлена тематика и методика проведения лабораторных занятий.

Предназначено для студентов специальности 36.05.01 – Ветеринария и направлений подготовки 06.03.01 – Биология, 36.03.01 – Ветеринарно-санитарная экспертиза.

Рецензент – И.П. Диких, канд.биол.наук, доцент

Рекомендованы к изданию методическим советом факультета ветеринарной медицины и зоотехнии Дальневосточного государственного аграрного университета (Протокол №8 от 10 марта 2015 года)

Издательство ДальГАУ

2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЁННЫХ НАИМЕНОВАНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Техника безопасности при работе иммунологической лаборатории	7
Изготовление диагностических препаратов для постановки серологических реакций.....	10
Реакция агглютинации и её модификации	14
Реакция преципитации и её модификации. Реакции нейтрализации токсинов.....	22
Реакция связывания комплемента. Титрация гемолизина	26
Реакция связывания комплемента. Титрация комплемента	30
Главный опыт реакции связывания комплемента	32
Опсоно-фагоцитарная реакция	34
Метод флуоресцирующих антител или реакция иммунофлуоресценции....	37
Иммуноферментный анализ	40
Гибридомы. Получение моноклональных антител.....	43
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	47

СПИСОК СОКРАЩЁННЫХ НАИМЕНОВАНИЙ

РА – реакция агглютинации,

РП – реакция преципитации,

РН - реакция нейтрализации,

РИФ – реакция иммунофлуоресценции или

МФА - метод флуоресцирующих антител,

РСК – реакция связывания комплемента,

ОФР – опсоно-фагоцитарная реакция,

ИФА – иммуноферментный анализ,

ФЭК – фотоэлектрокалориметр,

РПГА - реакция пассивной (непрямой) геммагглютинации,

РТГА - реакция торможения геммагглютинации,

ГА – гемагглютинация,

РДП - реакция диффузной преципитации,

ЗФР/Т - забуференный фосфатами физиологический раствор,

МКА – моноклональные антитела,

Среда ГАТ - среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин,

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) - твердофазный гетерогенный иммунный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Иммунология не только теоретический, но и сугубо практический раздел медицины, ветеринарии, биологии. Для оценки естественно и искусственно иммунитета организма животных и человека, диагностики инфекционных заболеваний, установления видовой принадлежности возбудителя болезни, определения антигенов групп крови применяют серологические реакции. В основе всех серологических реакций лежит иммунологической взаимодействие между антигенами и антителами *in vitro* (в пробирке), в результате чего образуется комплекс антиген-антитело.

Антигены – генетически чужеродные вещества, которые при введении в организм животного или человека вызывают специфическую перестройку лимфоретикулярной ткани, сопровождающуюся продукцией (выработкой) антител. Различают антигены корпускулярные, или клеточные (бактерии, эритроциты), и растворимые (молекулярно-дисперсные). Антигены поливалентны – имеют несколько рецепторов для связи с антителами и способны вступать в реакцию с ними как в организме животного или человека (*in vivo*), так и вне организма – в пробирке (*in vitro*) [3].

Антитела - высокомолекулярные белки глобулиновой фракции сыворотки крови (иммуноглобулины). По проявлению феномена взаимодействия между антигеном и антителами *in vitro* различают: осадочные (прямые) реакции, лизирующие и нейтрализующие.

Антитела, участвующие в осадочные реакциях, получили название по своему взаимодействию с антигеном: **агглютинины** – вызывают склеивание корпускулярного антигена – **агглютиногена** и осаждение комплекса антиген - антитела (**агглютината**); **преципитины** – образуют преципитат с растворимым антигеном – **преципитиногеном**. В лизирующих реакциях участвуют **бактериолизины** (вызывают лизис бактерий) и **гемолизины** (вызывают лизис эритроцитов). В реакциях нейтрализации нейтрализующие антитела обезвреживают токсическое действие антигена (токсина).

Осадочные серологические реакции протекают в две фазы:

- **первая фаза** – специфическая, невидимая простым глазом, при ней происходит образование комплекса антиген-антитело;

- **вторая фаза** – неспецифическая - проявляется конечный эффект – видимый результат, осаждение агглютината.

Серологические реакции в микробиологических и иммунологических лабораториях используют для:

- определения специфического антигена с помощью известного антитела (иммунной диагностической сыворотки),

- качественного и количественного выявления антитела в сыворотке крови организма животного или человека с помощью известного антигена (диагностикума) [4,5].

В лабораторной практике используют реакции агглютинации (РА), преципитации (РП), нейтрализации (РН), иммунофлуоресценции (РИФ), связывания комплемента (РСК), опсоно-фагоцитарные реакции (ОФР), иммуноферментный анализ (ИФА) и ряд других методик.

Техника безопасности при работе иммунологической лаборатории

Цель занятия: ознакомиться с лабораторией и её оборудованием, необходимым для проведения иммунологических исследований; усвоить правила техники безопасности при работе в иммунологической лаборатории.

Материальное обеспечение: помещение лаборатории и лабораторное оборудование, необходимое для иммунологических исследований: центрифуга, термостат, люминесцентный микроскоп, фотоэлектроколориметр, спиртовки, стеклянная посуда (дозаторы, пробирки, чашки Петри, пипетки, серологические планшеты, центрифужные пробирки), документация и инструкции по правилам работы в лаборатории.

Примерный план занятия (2 часа)

1. Объяснение преподавателя.
2. Записи в тетради требований техники безопасности при работе в лаборатории.
3. Расписка в журнале по технике безопасности.
4. Демонстрация лаборатории и её основного оборудования; организации рабочего места при проведении иммунологических исследований; работы с горелками, пипетками и стерильными инструментами; пользования дезинфицирующим раствором.
5. Самостоятельная работа студентов: отработать правила работы с пипеткой и стерильными инструментами; ознакомиться с документами и инструкциями по правилам работы в лаборатории.
6. Подведение итогов занятия.
7. Задание к следующему занятию.

Иммунологические исследования проводятся в иммунологических лабораториях, хотя отдельные виды исследований могут выполняться и в микробиологических лабораториях, например серологическая диагностика инфекционных болезней.

Помещения базовой лаборатории должны быть просторными для обеспечения безопасного проведения лабораторной работы. Стены, потолок, пол должны иметь гладкую, легко моющуюся поверхность, непроницаемую для жидкостей, устойчивую к дезинфектантам. Поверхность рабочих столов должна быть водонепроницаемой, устойчивой к дезинфектантам, кислотам, щелочам, органическим растворителям и умеренному нагреванию. Лабораторная мебель должна быть прочной. Пространство под столами и между мебелью должно быть легкодоступно для уборки. В лаборатории должен находиться автоклав для обеззараживания отходов.

Лабораторию оснащают автоклавом, термостатами, сушильными и стерилизационными шкафами, аппаратом для свертывания сыворотки, дистиллятором, центрифугами (рис. 1), ФЭК (рис. 2), магнитной мешалкой (рис. 4), лабораторными весами (рис. 5), рН-метром, микроскопами (рис. 7) .



Рисунок 1 - Центрифуга лабораторная



Рисунок 2 - AP-101 - Цифровой ФЭК



Рисунок 3 - Лабораторный дозатор



Рисунок 4 - Магнитная мешалка



Рисунок 5 - Весы лабораторные



Рисунок 6 - Иммунохимический
анализатор ABBOTT Architect i2000SR



Рисунок 7 - Люминесцентный микроскоп МИКМЕД-2

Рабочие помещения лаборатории должны быть снабжены подводкой холодной и горячей воды, электричеством. В некоторых кабинетах оборудуются боксы и вытяжные шкафы.

Основные правила работы в базовой лаборатории включают: запрет работ с пипеткой при помощи рта; запрет приема пищи, питья, курения, хранения пищи и применения косметических средств в рабочих помещениях; поддержание чистоты и порядка; дезинфекцию рабочих поверхностей не реже 1 раза в день и после каждого попадания на них заразного материала; мытье рук персоналом после работы с исследуемым материалом, животными, перед уходом из лаборатории; обеззараживание всех инфицированных материалов перед выбросом или повторным использованием; находиться в лаборатории можно только в специальном халате и шапочке [6,7].

Изготовление диагностических препаратов для постановки серологических реакций

Цель занятия: изучить методы приготовления диагностических препаратов.

Материальное обеспечение: основные реактивы: отмытые эритроциты барана, бактериальные, вирусные, риккетсиозные и эритроцитарные диагностикумы, сыворотка крови и другой материал; набор инструментов, необходимых для взятия крови (стерилизатор со шприцами и инъекционными иглами).

Примерный план занятия (2 часа)

1. Объяснение преподавателя.
2. Записи в тетради о способах взятия крови у различных видов животных и приготовление диагностических сывороток; методы приготовления диагностикумов для постановки иммунологических реакций.
3. Подведение итогов занятия.
4. Задание к следующему занятию.

Первый этап постановки серологических реакций – это сбор материалов для исследования. В большинстве случаев материалом является сыворотка крови. При некоторых заболеваниях материалом могут служить ликвор, моча, фильтрат испражнений, промывные воды бронхов, полости рта, глотки, носа.

Техника взятия крови для серологических исследований

У лошадей, крупного и мелкого рогатого скота кровь берут из ярёмной вены верхней трети шеи. Шерсть в этом месте выстригают, а кожу дезинфицируют спиртом. Иглы стерилизуют кипячением. При ведении иглы в кровеносный сосуд с правой стороны животного пальцем левой руки нажимают на ярёмную вену и ждут наполнение её кровью. Когда кровеносный сосуд наполнится кровью, и выделится в виде тяжа под углом 45° , вводят иглу через кожу в просвет сосуда. Кровь, которая выделяется через отверстие иглы необходимо спускать в приготовленную пробирку по стенке, не допуская вспенивания.

У свиней кровь берут из хвоста, который предварительно тщательно моют и дезинфицируют, а затем кончик хвоста отрезают ножницами. После получения крови культю хвоста дезинфицируют йодом или прижигают. Иногда кровь берут у свиней иглой из краевой вены уха. У крупных животных берут 7 - 10 мл крови, у птиц – 2 - 3 мл.

Техника получения сыворотки крови

Для получения сыворотки крови кровь оставляют на час при комнатной температуре или термостате при 37°C на 30 минут. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок пробирки спицей, пробирку помещают в холодильник для лучшего отделения сыворотки, которую затем отсасывают пипеткой. Сыворотку можно освободить от форменных элементов центрифугированием.

Приготовление взвеси эритроцитов

У барана из ярёмной вены берут кровь стерильной иглой в стерильную колбочку или флакон со стеклянными бусами. Кровь встряхивают круговыми движениями, фибрин оседает на шариках, кровь становится дефибринированной. Жидкую часть сливают в центрифужные пробирки, центрифугируют, жидкость над осадком отсасывают, осадок ресуспензируют физиологическим раствором, вновь центрифугируют и надосадочную жидкость удаляют. Такое отмывание эритроцитов проводят несколько раз, пока жидкость над осадком эритроцитов не станет прозрачной, затем её удаляют, а осадок разводят физиологическим раствором 1:40.

Получение иммунных диагностических (позитивных) сывороток

Иммунные диагностические сыворотки - препараты, содержащие известные антитела для определения родовой, видовой и типовой принадлежности антигена.

Иммунные сыворотки готовят в производственных условиях. Их получают из крови животного (кролики, лошади), которым предварительно был введён антиген. В качестве антигена для иммунизации применяют взвесь живых или убитых микробов, лизаты и экстракты клеток и тканей, эритроциты. При получении сывороток определяют их титр, то есть наибольшее разведение, в

котором сыворотка сохраняет способность реагировать с соответствующим антигеном. Готовую сыворотку разливают в ампулы и указывают на этикетке её название и титр. В большинстве случаев сыворотку лиофилизируют (высушивают). Сухую сыворотку перед употреблением растворяют дистиллированной водой до первоначального объёма.

Техника получения антигенных диагностических препаратов (диагностикумов)

Диагностикум — это стандартный препарат, используемый в качестве антигена при серологических исследованиях. Существует несколько видов диагностикумов: бактериальные, вирусные, риккетсиозные и эритроцитарные.

1. Диагностикум бактериальный — это препарат, представляющий собой взвесь живых или убитых бактерий, а также полученных из них антигенов.

Взвесь живых микробов. Для приготовления взвеси испытуемого микроба пользуются чаще всего 4 - часовой культурой. Микробную массу, выросшую на скошенном агаре, смывают 4 мл физиологического раствора. Полученная взвесь должна быть гомогенной и содержать примерно 3 млрд. микробных тел в 1 мл.

Взвесь убитых микробов. Взвесь убитых микробов готовят в производственных условиях. Инактивация осуществляется физическими и химическими средствами. Технология приготовления антигенов разнообразна, но основой для антигенов любого типа служат исходные, без признаков диссоциации культуры микроорганизмов. Устанавливают титр антигена, проверяют антиген на стерильность.

Антигены получают путём экстрагирования из разрушенных бактерий, физическими и химическими методами. К физическим методам относят:

а) механическое разрушение — массу отмытых физиологическим раствором бактериальных клеток растирают в ступке с песком, затем наливают небольшое количество физиологического раствора, центрифугируют до получения прозрачной жидкости, которую используют как антиген; **б) замораживание и оттаивание** (особенно повторное) густой взвеси бактерий, что приводит к разру-

шению клеточной стенки. После центрифугирования надосадочную жидкость используют в работе; в) **метод звуковых колебаний** – специальный аппарат погружают внутрь жидкости с взвесью бактерий и включают – клетки разрушаются; г) **кипячение** – бактериальную взвесь кипятят в физиологическом растворе 1 - 2 часа, фильтруют через асбестовую вату. Для разрушения бактерий в условиях производства используют *химические методы*: аутолиз бактериальных клеток, их разрушение ферментами, высушиванием в ацетоне.

2. Диагностикум вирусный — это препарат, изготовленный из культуры соответствующего вируса. Для изготовления диагностикумов из разных вирусов используются следующие инфицированные материалы: аллантоисная жидкость, амниотическая или аллантоисная жидкость, желточные мешки куриных эмбрионов, мозговая ткань мышей, куриных эмбрионов или культура тканей, культуральные жидкости. Диагностикумы из аллантоисной и амниотической жидкости употребляют в нативном виде, другие - требуют специальной обработки.

3. Диагностикум риккетсиозный - препарат представляет собой выращенные в желточных оболочках куриных эмбрионов и инаktivированные формалином риккетсии Провачека, очищенные методом центрифугирования в сочетании с мембранной технологией.

4. Диагностикум эритроцитарный — это препарат, представляющий собой взвесь формализированных эритроцитов, сенсibilизированных каким-либо микробным антигеном. Принцип приготовления: дефибринированную кровь человека или барана трижды отмывается на центрифуге физиологическим раствором. После этого производится обработка эритроцитов формалином. В дальнейшем эти эритроциты либо обрабатывают дополнительно таннином, либо соединяют с антигеном без этой обработки, затем центрифугируют и отмывают фосфатным буфером [11].

Реакция агглютинации и её модификации

Цель занятия: усвоить суть реакции агглютинации, методы её постановки и практическое применение.

Материальное обеспечение: позитивная, нормальная, исследуемая сыворотка; антиген; физиологический раствор; градуированные пипетки; пробирки; резиновые груши.

Примерный план занятия (2 часа)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: постановка реакции агглютинации в пробирках; зарисовка схемы реакции агглютинации в тетради. Учёт реакции агглютинации проводят через 24 часа.
4. Подведение итогов.
5. Задание к следующему занятию.

Контрольные вопросы:

1. Компоненты, техника постановки пробирочной реакции агглютинации, её учет.
2. Сущность и техника постановки капельной реакции агглютинации и кольцевой реакции с молоком.
3. Техника постановки реакции Кумбса.

Реакции агглютинации – простые реакции склеивания корпускулярного антигена с помощью антител, в результате чего образуются осадок (агглютинат). РА применяют как для идентификации видов и сероваров бактерий с помощью диагностических агглютинирующих сывороток, так и для определения присутствия антител в сыворотке крови по известным антигенам (диагностикумам). Различают:

- *прямые реакции агглютинации в пробирках, на предметном стекле (капельная и кровекapельная РА)* - используют для диагностики

сальмонеллеза, лептоспироза, бруцеллёза и других бактериальных инфекций;

- *реакцию Кумбса* – метод выявления неполных антител;

- *реакцию пассивной (непрямой) геммагглютинации (РПГА)* – применяют для диагностики инфекционных болезней, определения гонадотропного гормона в моче, для выявления повышенной чувствительности к лекарственным препаратам, гормонам и в некоторых других случаях;

- *реакцию торможения геммагглютинации (РТГА)* – для идентификации болезни Ньюкасла, кори, краснухи, большинства подтипов вируса гриппа, микоплазмоза кур и индеек;

- *кольцевую реакцию с молоком* – применяют для выявления бруцеллёза крупного рогатого скота;

- *реакцию коагглютинации* - используют для индикации и типирования корпускулярных и растворимых антигенов.

Техника постановки реакции агглютинации (РА) в пробирках

В штатив помещают ряд пробирок (рис. 7). Пробирки подписывают. Готовят основное разведение испытуемой сыворотки, а также контрольных сывороток – позитивной и нормальной. Для этого в первую пробирку вносят 2,4 мл физиологического раствора и 0,1 мл сыворотки (разведение 1:25). Затем готовят рабочее разведение сывороток: во вторую, в третью, четвёртую пробирку вносят по 0,5 мл физиологического раствора. Затем из первой пробирки во вторую пробирку вносят по 0,5 мл основного разведения сыворотки. В третьей пробирке всё смешивают (разведение 1:50). Из третьей пробирки 0,5 мл сыворотки переносят в четвёртую и смешивают (разведение 1:100); 0,5 мл разведённой сыворотки переносят в пятую и смешивают (разведение 1:200). Из последней пробирки 0,5 мл сыворотки выливают в чашку с дезинфицирующим раствором.

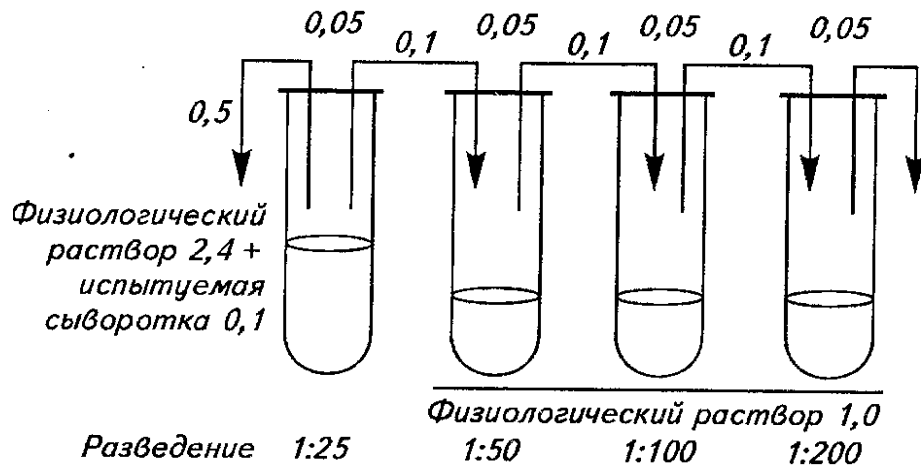


Рисунок 7 – Схема постановки реакции агглютинации

Во все пробирки вносят антиген. Предварительно антиген разводят 1:10, так чтобы в 1 мл физиологического раствора содержалось 1 млрд. микробных тел. После внесения антигена пробирки в штативах помещают в термостат на 24 часа, после чего проводят учёт реакции.

Учёт реакции проводят невооружённым взглядом визуально.

Результаты реакции агглютинации проводят в крестах по схеме:

++++ - 100% - полное просветление жидкости над осевшим на дно пробирки осадком в виде белого зонтика. При встряхивании зонтик разбивается на хлопья и комочки, а жидкость остаётся прозрачной.

+++ - 75% - неполное просветление жидкости, но хорошо выраженный зонтик. При встряхивании осадок разбивается на хлопья, жидкость слегка мутная.

++ - 50% - заметное просветление жидкости, зонтик умеренно выражен, при встряхивании осадок разбивается на более мелкие комочки, жидкость мутная.

+ - 25% - едва заметное просветление жидкости, зонтик слабо выражен, при встряхивании осадок разбивается на небольшое количество хлопьев и комочков, жидкость явно мутная.

(минус) - просветление жидкости и образование зонтика отсутствует, на дне пробирки видна «пуговка» - осадок антигена.

Показатели агглютинации в пробирках в два, три, четыре креста характеризуются как положительная реакция. Последнее разведение сыворотки, в котором наблюдается агглютинация с оценками два, три и четыре креста, считают её титром.

Результат можно учитывать в раздавленной капле жидкости на предметном стекле под микроскопом, при этом каплю берут каплю из пробирки, в которой соединены сыворотка и антиген (реакция микроагглютинации). Применяют эту реакцию в диагностике лептоспироза.

Постановка капельной и кровекapельной реакции агглютинации

При капельной РА на предметное стекло наносят каплю известной специфической сыворотки, и отдельно каплю физиологического раствора (для контроля). В каждую каплю добавляют культуру испытуемого микроба в количестве, взятом бактериологической петлёй, и равномерно размешивают. Положительная реакция указывает на гомологичность антигена с известными антителами.

Методику постановки кровекapельной РА применяют для диагностики пуллороза (сальмонеллёза) и респираторного микоплазмоза птиц. На обезжиренное предметное стекло наносят каплю цельной крови (берут у птицы из гребешка или серёжки), в неё добавляют каплю стандартного антигена и смешивают стеклянной палочкой. В положительных случаях через 30-60 секунд в капле смеси появляются глыбки, хлопья склеенного антигена (агглютинат).

Кольцевая реакция с молоком

Её используют при обследовании крупного рогатого скота на бруцеллёз. В агглютинационные пробирки наливают по 2 - 3 мл свежего цельного молока и добавляют антиген, окрашенный гематоксилином, по 0,2 мл (2 капли). Пробирки встряхивают до равномерного окрашивания молока, выдерживают в водяной бане (или в термостате) при 37 °C 45 - 60 минут. Если в молоке имеются антитела, специфические бруцелллёзному антигену, образуется

комплекс антиген-антитело, который адсорбируется на капельках жира и при отстаивании всплывает вверх, образуя синее кольцо в нижнем слое сливок; столбик молока обесцвечивается. Отрицательная реакция характеризуется синей окраской всего молока в пробирке.

Реакция коаггутинации

Реакцию коаггутинации применяют для определения антигенов с помощью антител, адсорбированных на белке А клеток стафилококка (антительный диагностикум) (рис. 8). Белок А имеет сродство к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, поэтому такие бактерии, обработанные иммунной диагностической сывороткой неспецифически адсорбируют антитела сыворотки, которые затем взаимодействуют активными центрами с соответствующими микробами, выделенными от больных. В результате коаггутинации образуются хлопья, состоящие из стафилококков, антител диагностической сыворотки и определяемого микроба (рис. 9).

Для постановки реакции применяют стафилококковые реагенты. К реагенту добавляют 0,01 - 0,1 мл исследуемой культуры или растворимого антигена, инкубируют при комнатной температуре 10 - 30 минут (в условиях постановки реакции на стекле) или 18 - 20 часов (в условиях постановки реакции в капиллярах). Учет проводят так же, как при обычной РА.

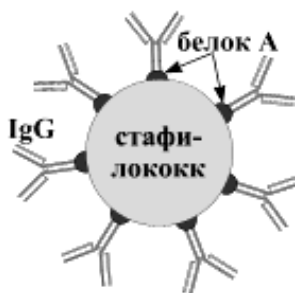


Рисунок 8 - Антительный диагностикум

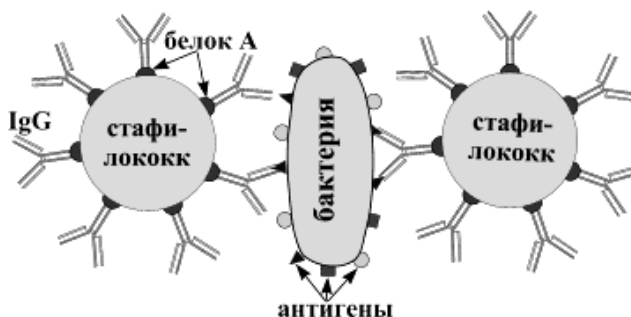


Рисунок 9 – Реакция коаггутинации

Реакция Кумбса (антиглобулиновый тест)

В ряде случаев при постановке РА и РСК происходит явление прозоны – отрицательный результат в малых разведениях позитивных сывороток. Это

объясняется наличием неполных (блокирующих) антител, которые тормозят образование агглютината (РА) или взаимодействию полных антител с антигеном в РСК. Неполные антитела существуют независимо от полных антител, выполняют те же функции. Реакция Кумбса позволяет выявить неполные антитела. Метод основан на применении антиглобулиновой сыворотки, служащей посредником для соединения неполных антител, фиксированных на корпускулярных антигенах (эритроциты, бактерии). Антиглобулиновую сыворотку получают путём иммунизации кроликов сывороткой крови или белками глобулиновой фракции того вида животного, у которого исследуют неполные антитела. Антиглобулиновую сыворотку выпускает биологическая промышленность. Её выпускают в сухом (лиофилизированном) виде.

В ветеринарной практике реакцию Кумбса применяют для диагностики бруцеллёза крупного рогатого скота.

Существует два варианта постановки реакции Кумбса.

1. Прямая реакция заключается в том, что используют отмытые сенсibilизированные эритроциты исследуемого больного животного (или иммунизированного). На поверхности эритроцитов адсорбированы неполные антитела. К ним добавляют антиглобулиновую сыворотку (содержащую антитела против глобулина), происходит агглютинация эритроцитов.

2. Непрямая реакция отличается тем, что исследуют не эритроциты, а сыворотку больного (содержащую неполные антитела), добавляют эритроциты здорового животного (для адсорбции неполных антител) и антиглобулиновую сыворотку. Неполные антитела соединяются с эритроцитами, а антиглобулиновая сыворотка вступает в реакцию с неполными антителами — происходит агглютинация эритроцитов.

Методика постановки реакции Кумбса. Компоненты реакции: бруцеллёзный антиген, испытуемая сыворотка крупного рогатого скота, антиглобулиновая сыворотка. Предварительно ставят обычную РА в четырёх разведениях исследуемой сыворотки 1:50 - 1:400. Учитывают результат, определяют предельный титр антител. Пробирку с сывороткой предельного титра

оставляют, а содержимое следующих пробирок исследуют на наличие неполных антител: в эти пробирки добавляют по 2 мл физиологического раствора, содержимое каждой пробирки переносят в центрифужные пробирки, центрифугируют при 4000 об/мин, надосадочную жидкость удаляют, осадок ресуспендируют. После второго отмывания и удаления надосадочной жидкости осадок ресуспендируют в 1 мл антиглобулиновой сыворотки, смесь помещают в термостат на 18 часов (37°C), затем оставляют на 2 - 4 часа при комнатной температуре, после чего учитывают результат, как при обычной РА. Минимальный рабочий титр реакции Кумбса при бруцеллёзе крупного рогатого скота учитывается 1:200. титр 1:100 считается сомнительным результатом (рис. 10).

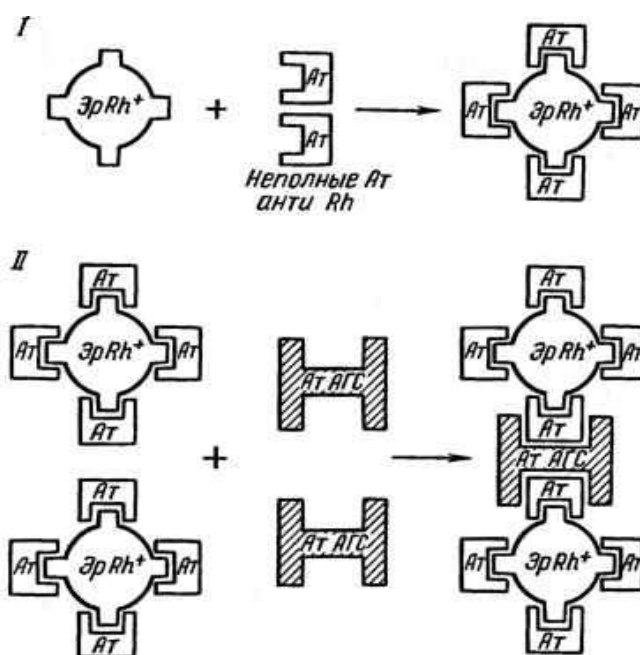


Рисунок 10 – Реакция Кумбса (схема)

Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА)

Феномен гемагглютинации проявляется в результате способности бактерий некоторых видов бактерий и вирусов адсорбироваться на поверхности эритроцитов животных разных видов (в том числе и птиц), вызывая их склеивание и осаждение. Феномен ГА используют в РПГА, РТГА и РНА.

Для постановки РПГА используют эритроцитарный диагностикум (рис.11). Берут стерильно кровь у барана (петуха), дефибринируют её, эрит-

роциты несколько раз отмывают фосфотно-буферным раствором (рН 7,2) при 3-5-кратном центрифугировании. Надосадочную жидкость отсасывают, а эритроциты разбавляют физиологическим раствором до концентрации 1:40. Затем берут равные объёмы (по 1 мл) приготовленной взвеси эритроцитов и взвеси бактерий исследуемого вида микроба в концентрации 5-10 млрд клеток в 1 мл. Эритроциты легко адсорбируют на своей поверхности антиген полисахаридной природы. Для адсорбции антигена белковой природы эритроциты обрабатывают танином в возведении 1:200000. Смесь эритроцитов и антигена оставляют для адсорбции на 2 часа в термостате при 37°C, затем с фосфатно-буферным раствором вновь центрифугируют 5 мин при 3 - 4 тыс.об/мин, надосадочную жидкость удаляют, осадок ресуспензируют физиологическим раствором. Полученный эритроцитарный диагностикум разливают в пробирки и добавляют к нему стандартную иммунную сыворотку (к искомому виду антигена). Смесь встряхивают, выдерживают при комнатной температуре 2-2,5 часа. В положительных случаях произойдёт реакция РГА – осаждение эритроцитов в характерный хлопьевидный осадок, распределённый по всей поверхности дна пробирки (гемагглютинат). Это значит, что исследуемый вид микроба специфичен антителам сыворотки. В отрицательных случаях эритроциты не склеиваются и осаждаются на дно в виде ровного кружка (рис.12).



Рисунок 11 - Эритроцитарный
диагностикум

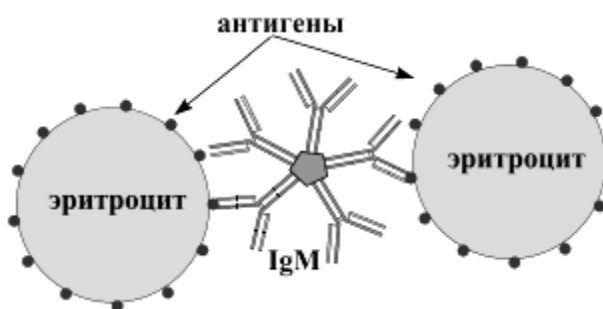


Рисунок 12 - Реакция непряой агглютинации

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Сущность РТГА заключается в том, что в пробирке смешивают специфическую диагностическую сыворотку и взвесь испытуемых бактерий

(антиген). Эту смесь выдерживают 1 - 2 часа при 370С, затем добавляют взвесь эритроцитов. Если испытуемый антиген гомологичен антителам диагностической сыворотки, они взаимодействуют между собой, и добавленные эритроциты не агглютинируют – результат реакции положительный. Если испытуемый антиген не гомологичен антителам сыворотки крови или не содержится в материале, добавленные эритроциты адсорбируют антиген и происходит РГА – результат отрицательный.

Реакция преципитации и её модификации. Реакции нейтрализации токсинов

Цель занятия: усвоить суть реакции преципитации, методы её постановки и практическое применение.

Материальное обеспечение: пробирки Уленгута и штативы к ним; пастеровские пипетки; антиген; исследуемая сыворотка; иммунная сыворотка.

Примерный план занятия (2 часа)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: постановка реакции преципитации; учёт результатов реакции преципитации; зарисовка схемы реакции преципитации в тетради.
4. Подведение итогов.
5. Задание к следующему занятию.

Контрольные вопросы:

1. Реакция преципитации, её практическое применение.
2. Методы постановки диффузной преципитации.

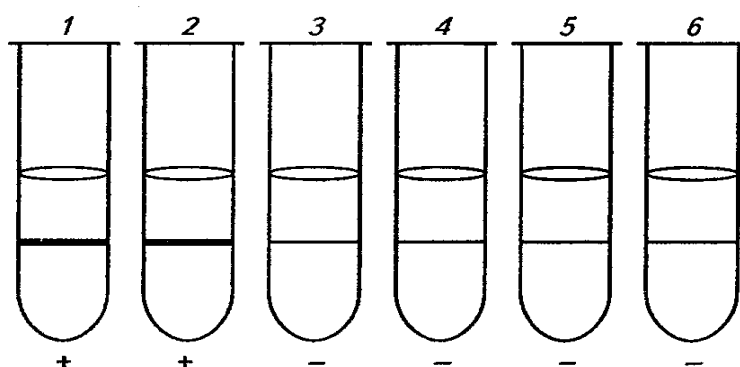
Реакция преципитации — это серологическая реакция, заключающаяся во взаимодействии растворимого антигена с антителом с последующим выпадением мелкозернистого осадка (преципитата).

Реакции преципитации применяют для диагностики инфекционных заболеваний, распознавания видовой принадлежности крови, определения фальсификации мясных и других продуктов. В биологии определяют филогенетическое родство различных видов животных.

Постановка РП осуществляется в пробирках в жидкой среде или в плотной агаровой среде на предметном стекле и в чашках Петри (диффузная преципитация).

Постановки реакции кольцепреципитации (метод Асколи)

Реакция кольцепреципитации используется при диагностике сибирской язвы. В узкие пробирки Уленгута пастеровской пипеткой вносят 0,3 мл исследуемой сыворотки и 0,3 мл антигена. Постановку реакции осуществляют наслаиванием антигена на сыворотку, либо подслаиванием сыворотки под антиген. Наслаивание антигена проводят по стенке пробирки, при подслаивании сыворотки пипетку вводят осторожно до дна пробирки и спускают жидкость, затем пипетку осторожно вынимают. В случаях положительного результата на границе двух жидкостей в течение 1 - 2 минут образуется кольцо – преципитат (рис. 13).



1 – преципитирующая сыворотка + исследуемый материал; 2 – преципитирующая сыворотка + гомологичный преципитат; 3 – преципитирующая сыворотка + контрольный экстракт без антигена; 4 – преципитирующая сыворотка + изотонический раствор натрия хлорида; 5 – нормальная сыворотка + исследуемый антиген; 6 – нормальная сыворотка + контрольный экстракт без антигена; «+» - преципитат; «-» - отсутствие преципитата

Рисунок 13 – Схема постановки реакции преципитации

Специфичность реакции проверяют контролями нормальных и иммунных сывороток с антигеном. Контроль сыворотки: на иммунную сыворотку в отдельных пробирках наслаивают в одну пробирку 0,1 мл физиологического раствора, в другую – 0,1 мл стерильной среды, на которой готовился антиген, в третьей – к 0,1 мл сыворотки и 0,1 мл гетерогенного антигена. Для контроля антигена в отдельные 2 - 3 пробирки разливают нормальную сыворотку того же вида животного (не гипериммунизированного), от которого получена преципитирующая сыворотка, сверху добавляют по 0,1 мл антигена, оставляют при комнатной температуре и учитывают через 1 - 2 минуты.

Реакция считается положительной: если диск (кольцо) преципитата появляется вскоре после наслаивания антигена (или наслаивания сыворотки) через несколько минут (не позже 1 - 2 минут); если в контрольных пробирках реакция отрицательная – нет преципитата.

Реакция диффузной преципитации (РДП)

Метод простой диффузии по Удену: агар, содержащий специфическую преципитирующую сыворотку, разливают в чашки Петри. Когда он застынет, антиген наслаивают на поверхность агара. По *методу Аухтерлони* сыворотку вносят в специальные лунки в агаре, содержащем антиген.

Более широк распространение получил *метод двойной диффузии в агаровом геле*. В застывшем агаре на предметном стекле и в чашках Петри делают углубления (луночки) на некотором расстоянии одно от другого. В одну из них вносят специфическую сыворотку, в другие, расположенные вокруг первой, - разные пробы антигена (исследуемого материала). Оба компонента в луночках (сыворотка и исследуемый материал) диффундируют во встречном направлении в слое агарового геля. На месте встречи специфических антигена и антитела выпадает сероватый преципитат в виде полосок, линий.

Вариантов методик постановки двойной диффузии много. В основном суть состоит в следующем: на предметное стекло, лежащее горизонтально, наливают тонким слоем 1% отмытый агар (толщина 2-3 мм). Когда агар за-

стынет, на его поверхность наливают второй слой агара. После застывания среды вырезают луночки верхнего слоя агара диаметром до 3 мм с помощью стандартного штампа. Расстояние между лунками 4 мм. Концом пипетки Пастера (для каждой лунки отдельно) в луночки (соответственно) вносят сыворотки и антигены. Стёкла помещают в эксикатор, оставляют при комнатной температуре. В положительных случаях образуются чёткие линии преципитата на границе встречи антигена - антител (сыворотки). Ставят диффузную преципитацию в агаровом геле в чашках Петри: в стерильные чашки Петри с ровным дном наливают тонким слоем 1% расплавленный агар (с мертилатом), распределяют тонким слоем по всей поверхности дна чашки – этим создаётся предохранительный слой, препятствующий подтеканию компонентов реакции под слой геля, в котором происходит преципитация. Когда слой агара застынет, на его поверхности расставляют металлические цилиндрики 5-8 мм в диаметре и наливают слой агара. После застывания агара цилиндрики осторожно вынимают за верхний край, при этом образуются лунки. Расстояние между лунками 15 мм. Если исследуют несколько антигенов, то одну лунку образуют в центре и в неё вносят специфическую преципитирующую сыворотку, а вокруг – лунки с разными антигенами (экстракты исследуемого материала), чашки помещают в эксикатор и термостат. Реакцию учитывают через сутки (рис.14) [12].

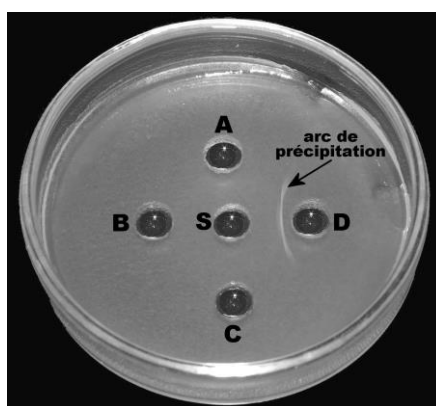


Рисунок 14 – Метод двойной диффузии в агаровом геле

Постановка реакция нейтрализации (метод Эрлиха)

Метод Эрлиха используют для определения типа микробного токсина (возбудители злокачественного отёка, дизентерии ягнят, энтеротоксемии

овец) и активности антитоксических сывороток (и для типизации некоторых видов вирусов). Техника постановки РН: в пробирки с равным количеством антигена в 1 мл добавляют равный объём убывающего количества (убывающей концентрации) специфической гипериммунной сыворотки. Смесь токсин – антитоксин встряхивают в пробирках и помещают в термостат при 37 °С на 1 - 2 часа, затем из каждой пробирки смесь вводят лабораторным животным (по два животных на каждую дозу антитоксина, чаще морским свинкам). Животные, получившие смесь из пробирок, где произошла нейтрализация токсина, остаются живыми (остальные гибнут). Наименьшее количество сыворотки (наибольшее её разведение), нейтрализовавшее токсин, принимают за *единицу активности антитоксической сыворотки (АЕ)*. Чем меньше это количество, тем активнее сыворотка.

Реакция флоккуляции (по Рамону) (от лат. floecus - хлопья шерсти) - появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммунопреципитации) в пробирке при реакции токсин - антитоксин или анатоксин – антитоксин. Ее применяют для определения активности антитоксической сыворотки или анатоксина.

Реакция связывания комплемента. Титрация гемолизина

Цель занятия: усвоить сущность постановки РСК, методику титрации гемолизина.

Материальное обеспечение: штативы с пробирками; пипетки; резиновые груши; физиологический раствор; водяная баня (37 - 38 °С) с термометром; гемолизин в ампулах; взвесь эритроцитов барана. **Примерный план занятия (2 часа)**

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: проведение титрации гемолизина; учёт полученных результатов; зарисовка полученных данных в тетради.

4. Подведение итогов.

5. Задание к следующему занятию.

Контрольные вопросы:

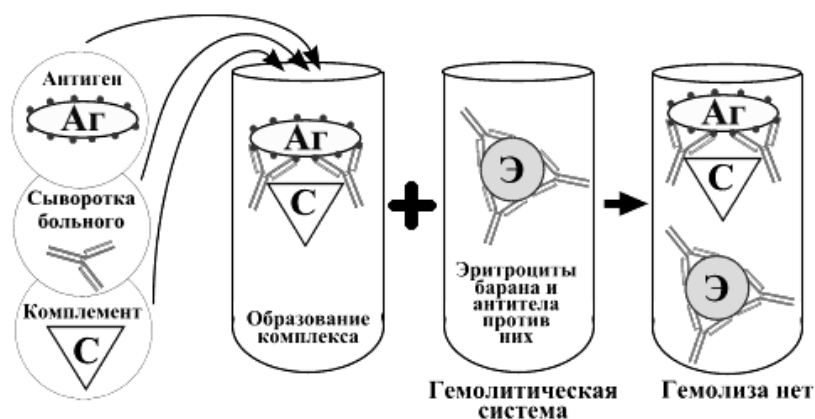
1. Сущность реакции связывания комплемента, её компоненты.

2. Схема титрации гемолизина.

Реакция связывания комплемента (РСК) – серологическая реакция, используемая для количественного определения комплементсвязывающих антител и антигенов. Впервые описана Борде и Жангу (1901). Принцип РСК состоит в том, что специфический иммунный комплекс адсорбирует добавленный в систему комплемент. Реакция образования комплекса антиген - антитело – комплемент – невидимая. Для выявления компонентов реакции используют дополнительную индикаторную гемолитическую систему. РСК осуществляется в два этапа. Сначала готовят бактериолитическую систему – в пробирках смешивают по 0,5 мл исследуемую инактивированную сыворотку с антигеном, добавляют комплемент. Смесь антиген – антитело (сыворотка) – комплемент (бактериолитическая система) помещают в водяную баню (или термостат) при 37 – 38 °С на 20 – 40 минут. Далее во все пробирки добавляют компоненты гемолитической системы (гемолизин, эритроциты) и вновь ставят в водяную баню на 15 – 20 минут. Затем учитывают результат, оставляют при комнатной температуре до следующего дня и производят окончательный учёт РСК.

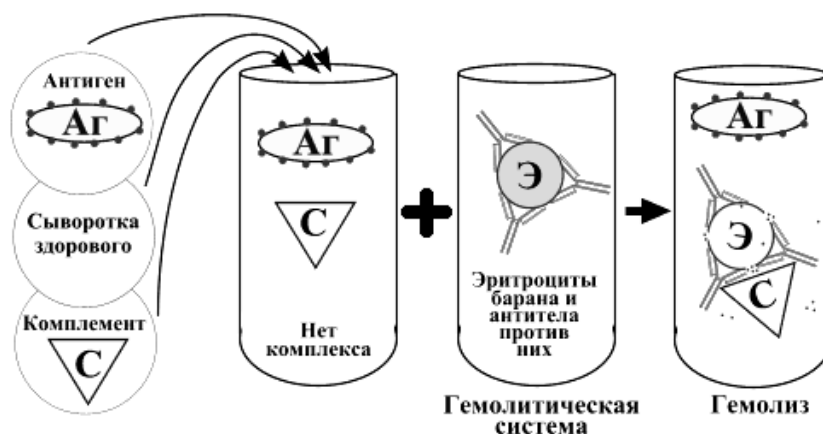
Отсутствие гемолиза (положительный диагностический результат) свидетельствует, что в испытуемой сыворотке имеются антитела, специфичные взятому антигену, комплекс антиген – антитело в первой системе образовался, комплемент связался (рис.15). Если в исследуемой сыворотке нет антител, специфичных к взятому антигену, комплекс антиген – антитело не образуется и комплемент не адсорбируется, остаётся в пробирке свободным, то при добавлении гемолитической системы комплемент взаимодействует с комплексом антиген – антитело (гемолизин – эритроциты) и происходит ге-

молиз (лизис эритроцитов) – диагностический результат – отрицательный (рис.16).



Аг – антиген, Ат – антитело, Э – эритроциты, С- комплемент

Рисунок 15 - Реакция связывания комплемента (схема). Реакция положительная.



Аг – антиген, Ат – антитело, Э – эритроциты, С- комплемент

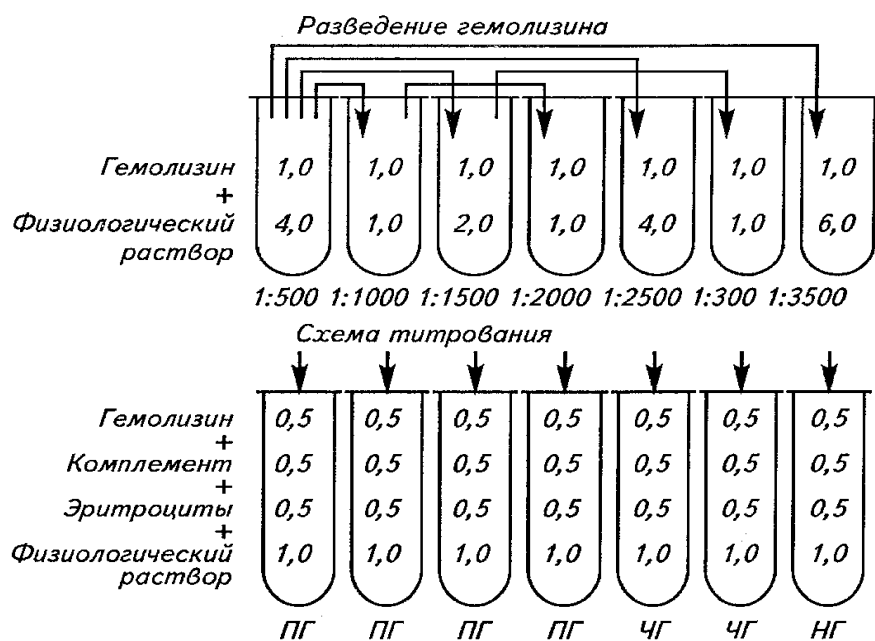
Рисунок 16 - Реакция связывания комплемента (схема). Реакция отрицательная.

Таким образом, в РСК участвуют 5 компонентов: антиген, антитело (исследуемая сыворотка в разведении 1:5 или 1:10), комплемент, гемолизин, взвесь эритроцитов барана, физиологический раствор.

Схема титрации гемолизина. Для титрации готовят гемолизин в разведении 1:100 (0,2 мл гемолизина, консервированного глицерином; +0,98 мл физиологического раствора); комплемент - 1:20; взвесь эритроцитов барана – 1:40; физиологический раствор.

В штатив размещают два ряда пробирок: один ряд – вспомогательный, только для приготовления нужных разведений; второй – собственно для титрации.

Для разведения гемолизина в первую пробирку вспомогательного ряда вносят исходное разведение гемолизина 1:100, а затем проводят последовательные разведения, как показано на рисунке: из каждой пробирке соответствующего разведения гемолизина переносят в отдельную пробирку второго ряда по 0,5 мл. Во все пробирки второго ряда добавляют по 0,5 мл комплемента; по 0,5 мл взвеси эритроцитов и по 1 мл физраствора, чтобы в каждой пробирке объём жидкости составил 2,5 мл (рис. 17). Все пробирки встряхиваются и помещаются в водяную баню при 37°C на 10 - 15 минут.



ПГ – полный гемолиз; ЧГ – частичный гемолиз; НГ – нет гемолиза

Рисунок 17 – Разведение и схема титрования гемолизина

Учёт результатов титрации начинают с пробирок с наименьшим содержанием гемолизина. В пробирке с наименьшим количеством гемолизина, где произойдёт полный гемолиз, жидкость станет красной и прозрачной. Это количество принимают за предельный титр гемолизина. Для дальнейшей работы гемолизин используют в 2 раза – концентрированнее – удвоенное количество, называемое рабочим титром гемолизина. Если фактический титр равен 1:2000, для получения рабочего раствора гемолизин разводят физраствором 1:1000.

Реакция связывания комплемента. Титрация комплемента

Цель занятия: усвоить сущность постановки РСК, методику титрации комплемента.

Материальное обеспечение: штативы с пробирками; градуированные пипетки; резиновые груши; физиологический раствор; водяная баня (37-38⁰С) с термометром; гемолизин в ампулах; взвесь эритроцитов барана. Таблицы хода постановки реакции и титрации гемолизина.

Примерный план занятия (2 часа)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: проведение титрации комплемента; учёт полученных результатов; зарисовка полученных данных в тетради.
4. Подведение итогов.
5. Задание к следующему занятию.

Контрольные вопросы:

1. Схема титрации комплемента.

Схема титрации комплемента. Комплемент титруют дважды: в гемолитической и бактериолитической системе.

Титрация комплемента в гемолитической системе. Готовят исходное разведение комплемента: 1:20 (1 мл комплемента + 19 мл физиологического раствора); гемолизин разведённый соответственно рабочему титру; взвесь эритроцитов барана (1:40); физиологический раствор. В пробирки, поставленные в один ряд в штатив, разливают пипеткой разное количество комплемента, увеличивая дозу в каждую следующую пробирку на 0,03 мл (0,13; 0,16; 0,19; 0,22 до 0,43). Затем в эти пробирки добавляют физраствор в количестве, составляющем вместе с комплементом 0,5 мл, то есть в первую 0,37; в последующие - 0,34; 0,31; 0,28 ... 0,16 мл. Затем добавляют во все

пробирки по 0,5 мл гемолизина; по 0,5 мл эритроцитов барана и по 1 мл физиологического раствора. Все пробирки встряхивают и помещают в водяную баню на 10 -15 минут при 37⁰С. После чего учитывают результат, определяют титр комплемента – его наименьшее количество, обеспечивающий полный гемолиз (рис. 18).

Физиологический раствор	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
+								
Эритроциты	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
+								
Гемолизин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
+								
Антиген	0,37	0,34	0,31	0,28	0,25	0,22	0,19	0,16
+								
Комплемент	0,13	0,16	0,19	0,22	0,25	0,28	0,31	0,34

Рисунок 18 – Титрация комплемента в гемолитической системе

Учитывать результат начинают с пробирки с наибольшим содержанием комплемента, где должен произойти гемолиз (справа налево).

Титрация комплемента в бактериолитической системе. Готовят комплемент (1:20); взвесь эритроцитов барана (1:40); гемолизин в рабочем титре; две позитивные и две нормальные сыворотки; специфический антиген. Сыворотки (1:10) инактивируют при 56 – 58 ⁰С 30 минут. Каждую сыворотку разливают в два ряда пробирок по 0,5 мл, во все пробирки добавляют комплемент в возрастающих количествах, начиная с дозы его титра в гемолитической системе, в последующие пробирки увеличивают количество на 0,03 мл, как в титрации комплемента в гемолитической системе, добавлением физраствора выравнивают объём до 0,5 мл. Во все пробирки одного ряда каждой сыворотки добавляют по 0,5 мл антигена; во второй ряд этих же сывороток добавляют по 0,5 мл физраствора. Все пробирки помещают в водяную баню при 37⁰С на 30 – 40 минут, после чего во все пробирки вносят по 0,5 мл гемолизина и 0,5 мл взвеси эритроцитов, встряхивают и вторично помещают в водяную баню на 15 минут.

Учет результатов начинают с просмотра с пробирок второго ряда каждой сыворотки без антигена и нормальных сывороток с антигеном. В этих пробирках следует ожидать полный гемолиз, учитывая лишь наименьшее ко-

личество комплемента, вызывающий этот гемолиз при условии, что в первых рядах пробирок с позитивными сыворотками и антигеном с той же дозой комплемента будет полная задержка гемолиза. Наименьшее количество комплемента, обеспечивающее полный гемолиз в нормальной сыворотке с антигеном и без него, при полной задержке его в позитивной сыворотке с антигеном называют титром комплемента в бактериолитической системе.

Главный опыт реакции связывания комплемента

Цель занятия: ознакомиться с методикой постановки реакции связывания комплемента.

Материальное обеспечение: антиген; комплемент; гемолизин; исследуемая, позитивная и нормальная сыворотки; взвесь эритроцитов барана; градуированные пипетки; пробирки; резиновые груши; штативы; водяная баня с термометром. Для демонстрации – схема постановки главного опыта РСК.

Примерный план занятия (2 часа)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: проведение главного опыта РСК; учёт полученных результатов; зарисовка полученных данных в тетради. Окончательный учёт результатов опыта необходимо провести через 24 часа.
4. Подведение итогов.
5. Задание к следующему занятию.

Контрольные вопросы:

1. Схема проведения реакции связывания комплемента, её компоненты.

Техника постановки главного опыта РСК. Каждую пробу сыворотки разводят 1:10 и разливают в две пробирки по 0,5 мл. Во все пробирки первых рядов сывороток добавляют по 0,5 мл антигена. Во вторые ряды всех сывороток добавляют по 0,5 мл физиологического раствора, затем во все пробир-

ки первого и второго ряда вносят комплемент (1:20) по 0,5 мл, встряхивают и помещают в водяную баню на 20 -40 минут при 37°C. После выдерживание в водяной бане во все пробирки добавляют гемолизин (1:10) и взвесь эритроцитов (1:40) по 0,5 мл. Содержимое пробирок встряхивают и вторично ставят в водяную баню на 20 минут. Одновременно ставят контроль на нормальную и позитивную сыворотку (рис. 19).

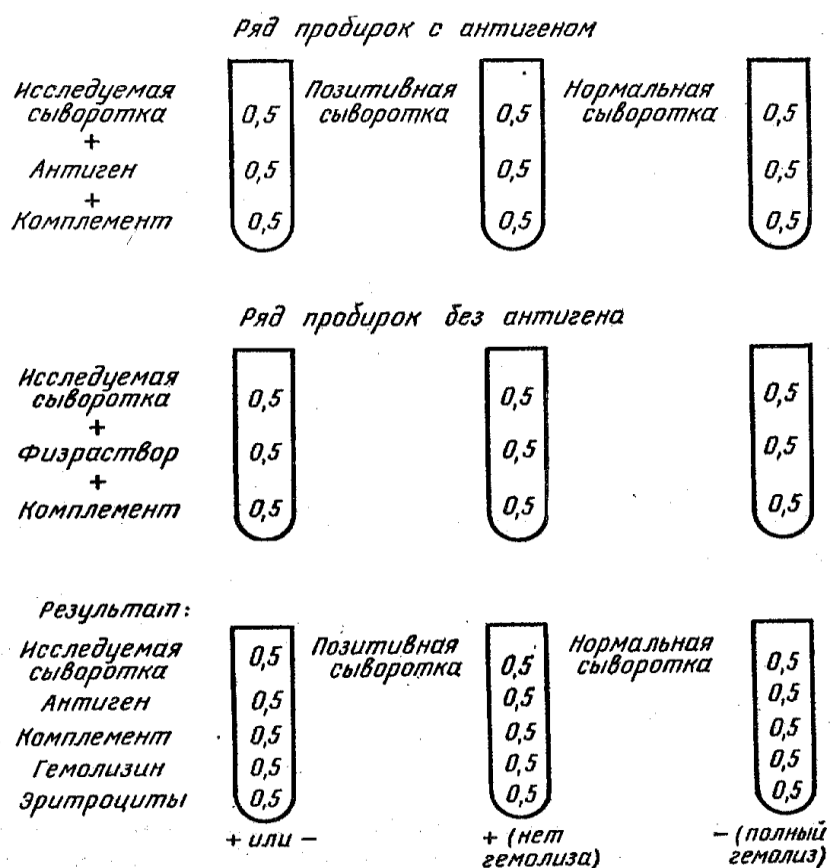


Рисунок 19 – Главный опыт реакции связывания комплемента

Учёт результатов проводят дважды: после водяной бани и через 24 часа пребывания пробирок при комнатной температуре. Результат учитывают в крестах.

++++ - полная задержка гемолиза (полное осаждение эритроцитов), результат положительный;

+++ - задержка гемолиза хорошо выражена (имеется значительный осадок эритроцитов, жидкость над осадком слабо-розового цвета) результат положительный;

++ - частичная задержка гемолиза (имеется компактный осадок эритроцитов, жидкость интенсивно окрашена), сомнительный результат;

+ - слабая задержка гемолиза (незначительный осадок, жидкость интенсивно окрашена в красный цвет), результат отрицательный;

(минус) - полный гемолиз («лаковая» кровь, отсутствие осадка), результат отрицательный.

Опсоно-фагоцитарная реакция

Цель занятия: ознакомиться с методами определения фагоцитарной активности лейкоцитов; усвоить постановку и учёт ОФР.

Материальное обеспечение: бактериальная взвесь стафилококка или сальмонелл; свежая кровь; предметные стёкла; центрифуга; краска Романовского - Гимзы; микроскоп. Для демонстрации: таблицы с микроскопической картины фагоцитоза.

Примерный план занятия (2 часа)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: проведение реакции; приготовление мазков и их микроскопия; учёт полученных результатов; зарисовка полученных данных в тетради.
4. Подведение итогов.
5. Задание к следующему занятию.

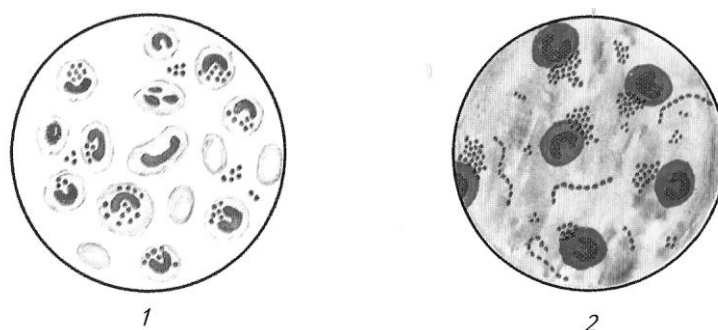
Контрольные вопросы:

1. В чём суть явления фагоцитоза, его стадии.
2. Методика проведения опсоно-фагоцитарной реакции.
3. Определение фагоцитарного числа, опсонического индекса.

Применяется ОФР для определения **опсонинов** — антител, стимулирующих фагоцитарную активность лейкоцитов, применяют для серодиагностики инфекций, например, бруцеллёза. В нормальной сыворотке содержится небольшое количество опсонинов, в иммунной сыворотке - опсонинов боль-

ше. На способности взаимодействия нейтрофилов и опсопинов основаны методы расчетов интенсивности опсоно-фагоцитарной реакции.

Техника постановки опсоно-фагоцитарной реакции. В центрифужные пробирки наливают и перемешивают 0,25 мл 2%-ного раствора лимоннокислого натрия и 0,25 мл крови больного животного. В эту смесь добавляют 0,25 мл двухмиллиардной взвеси бактерий, выдерживают 30 минут в водяной бане при 37°C, центрифугируют и отсасывают пастеровской пипеткой верхний слой осадка, состоящий из лейкоцитов. На предметных стёклах делают мазки, высушивают, фиксируют жидкостью Никифорова (спирт – эфир; 1:1) в течение 20 минут, затем окрашивают по Романовскому-Гимзы. Мазки микроскопируют, определяют количество бактерий, фагоцитированных 50 нейтрофилами в нескольких полях зрения (рис. 20).



1 – окраска по Романовскому-Гимза; 2 – окраска методом Циль-Нильсона

Рисунок 20 – Фагоцитоз кокков лимфоцитами

О фагоцитарной способности лейкоцитов крови можно судить по данным их фагоцитарной активности, показателям общей фагоцитарной емкости, фагоцитарного числа и индекса, а также показателю заверщенного фагоцитоза.

Фагоцитарная активность выражается процентным отношением активных, участвовавших в фагоцитозе лейкоцитов к общему числу подсчитанных нейтрофильных лейкоцитов.

Фагоцитарный индекс определяется средним числом фагоцитированных микробов, приходящихся на один активный лейкоцит. Фагоцитарный

индекс характеризует интенсивность фагоцитоза. Для определения фагоцитарного индекса служат те же самые мазки, по которым определялась фагоцитарная активность лейкоцитов. В препаратах, приготовленных описанным выше способом, подсчитывают не менее 100 лейкоцитов и количество поглощенных ими микробных тел. Вычисляется фагоцитарный индекс путем деления числа фагоцитированных бактерий на число активных лейкоцитов. Пример: При изучении мазка установлено, что из 100 просмотренных лейкоцитов в фагоцитозе приняло участие 80 лейкоцитарных клеток, которые фагоцитировали 400 микробных тел. Следовательно, фагоцитарный индекс равен 5 ($400 : 80$).

Фагоцитарное число является дополнительным показателем, характеризующим как агрессивность лейкоцитов, так и активность их. Вычисляется фагоцитарное число путем деления числа фагоцитированных бактерий на общее число подсчитанных лейкоцитов.

Пример: При просмотре мазка установлено, что на 100 учтенных лейкоцитов приходится 400 фагоцитированных микробных тел. Тогда фагоцитарное число будет равно 4 ($400:100$).

Фагоцитарная емкость определяется количеством микробных тел, фагоцитированных лейкоцитами 1 мм³ крови. Этот показатель характеризует общую фагоцитарную активность крови и зависит от количества лейкоцитов, содержащихся в 1 мм³ ее. Некоторые авторы этот показатель называют фагоцитарной интенсивностью, абсолютным фагоцитозом или общим фагоцитозом. Определяется фагоцитарная емкость умножением фагоцитарного числа на количество лейкоцитов в 1 мм³ крови.

Пример: Подсчетом мазков установлена величина фагоцитарного числа 4, а в 1 мм³ крови найдено 7 тыс. лейкоцитов. Следовательно, фагоцитарная емкость будет равна 28 тыс. микробных тел (4×7000).

Опсонический индекс - показатель, получаемый от деления фагоцитарного числа иммунной сыворотки на фагоцитарное число нормальной сыворотки. Если индекс больше единицы, то это значит, что в испытуемой сы-

воротке содержится большое количество опсонинов, чем в контрольной нормальной сыворотке. Полученный результат указывает на благоприятное защитное состояние организма.

Фагоцитоз in vivo (в живом организме) можно демонстрировать в опыте на белых мышах: в брюшную полость мыши стерильным шприцем вводят 2-3 мл стерильного МПБ, что способствует созданию лимфоцитоза в месте введения; через 2 – 6 часов этой же мыши внутрибрюшинно вводят 0,5 - 1 мл густой взвеси живой культуры стафилококка (или другого микроба); через 15 - 40 минут из брюшной полости шприцем берут небольшое количество экссудата, из которой на предметных стёклах делают мазки, которые подсушивают на воздухе и фиксируют жидкостью Никифорова (или этиловым спиртом), окрашивают метиленовым синим 1 – 3 минуты, промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют. В мазке обнаруживают множество лейкоцитов с фагоцитированными бактериями, интенсивно окрашенных в синий цвет на фоне светло-голубой цитоплазмы фагоцитов. В препарате можно увидеть отдельные этапы фагоцитарного процесса: поглощение, частичное и полное переваривание микробов .

Метод флуоресцирующих антител или реакция иммунофлуоресценции

Цель занятия: ознакомиться с сущностью методики РИФ.

Материальное обеспечение: Для демонстрации: таблицы – схемы МФА, флуоресцирующая сыворотка, исследуемый материал, чашки Петри, фильтровальная бумага, люминисцентный микроскоп.

Примерный план занятия (2 часа)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: проведение реакции; приготовление мазков и их микроскопия; учёт полученных результатов; зарисовка полученных данных в тетради.

4. Подведение итогов.
5. Задание к следующему занятию.

Контрольные вопросы:

1. Сущность РИФ.
2. Варианты МФА.

Метод флуоресцирующих антител (МФА) - комплексный метод, сочетающий серологическую реакцию, при которой происходит специфическое взаимодействие антигена и антитела с образованием иммунного комплекса, и микроскопическое исследование, позволяющее обнаружить этот комплекс на предметном стекле. В реакции иммунофлуоресценции используют антитела, к которым присоединены флуорохром. Такие антитела сохраняют способность реагировать с антигеном и благодаря наличию флуорохрома – светиться при воздействии ультрафиолетовых лучей.

При выявлении возбудителя инфекции на предметном стекле готовят мазки-отпечатки из органов или другого материала. Для обнаружения антител в сыворотке крови на предметном стекле готовят мазки из известного антигена (сальмонелл, возбудителя сибирской язвы и другие). Препарат подсушивают на воздухе и фиксируют, наливая на препарат ацетон на 5 минут, этанол на 10-15 минут, метанол на 5 – 10 минут. Окрашивание готовых препаратов можно проводить несколькими вариантами.

Прямой вариант МФА разработан Кунсом с соавторами (1950). На предметное стекло с фиксированным антигеном наносят каплю люминисцентной сыворотки, содержащей антитела против искомого антигена. Препарата во избежание высыхания помещают в влажную камеру (чашку Петри) с фильтровальной бумагой, смоченной водой, и выдерживают в термостате при 37 – 38 °С в течение 15 - 30 минут. Затем препарат промывают 5 – 10 минут в проточной (водопроводной) воде. Промытый препарат высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют (рис. 21).

Непрямой двухступенчатый вариант МФА предложен Weller и Coons (1954). На первом этапе на антиген наносят каплю немеченой иммун-

ной сыворотки (первая сыворотка). Препарат выдерживают в термостате (см. прямой вариант) 15 - 30 минут, затем для удаления несвязавшихся белков иммунной сыворотки его промывают и просушивают, как описано выше. На втором этапе на подсушенный препарат наносят каплю люминесцирующей антивидовой сыворотки (вторая сыворотка). Препарат повторно помещают в термостат во влажной камере. Антивидовая сыворотка представляет собой меченные флуорохромом антитела против глобулинов крови того вида животного, от которого получена иммунная сыворотка. Таким образом, антитела первой сыворотки являются антигеном для меченых антител антивидовой сыворотки. В результате к образовавшемуся на первом этапе комплексу антиген – антитело присоединяются антитела второй сыворотки, образуется двойной комплекс, который можно обнаружить в люминесцентном микроскопе (рис. 22).



Рисунок 21 - Прямая РИФ



Рисунок 22 - Непрямая РИФ

Для подтверждения специфичности результатов МФА необходимы контроли. Для прямого варианта проводят окраску гомологичных и гетерологичных в антигеном отношении микроорганизмов люминесцирующей сывороткой. Свечение бактерий должно в первой случае и отсутствовать во втором.

При оценки результатов необходимо учитывать яркость свечения, цвет, локализацию и структуру свечения. Бактерии, окрашенные люминесцирующей сывороткой, имеют яркое зелёное свечение по периферии клетки в виде

ободка или ореола, центральная часть светится мало. У пластичных бактерий (лептоспиры, вибрионы) светится вся клетка.

Интенсивность свечения оценивается по четырёхкрестовой системе: ++++ - очень яркая флуоресценция по периферии микробной клетки, чётко контрастирующая с телом клетки; +++ - яркая флуоресценция периферии клетки; ++ - слабое свечение периферии клетки; + - нет контрастного свечения периферии и тела микробной клетки. Отсутствие свечения обозначают знаком «минус» (видны тени микроорганизмов). Положительным результатом считают специфическое свечение не ниже чем на четыре или три креста [3].

Иммуноферментный анализ

Цель занятия: ознакомиться с методом иммуноферментного анализа.

Материальное обеспечение: Для демонстрации: таблицы со схемами проведения ИФА.

Примерный план занятия (2 часа)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: записи в тетради методики проведения ИФА.

Контрольные вопросы:

1. В чём суть ИФА, его стадии.
2. Методика проведения ИФА.

Иммуноферментный анализ (ИФА) является лабораторным иммунологическим методом, основанный на выявлении комплекса антиген-антитело, а присоединение к антителам ферментной метки позволяет учитывать результат реакции антиген-антитело по появлению ферментативной активности или по изменению ее уровня. ИФА был разработан в 1972 г. А. И. Рубинштейном. Метод ИФА используется для определения антител при раз-

личных инфекционных заболеваниях, уровня гормонов, аутоантител и различных маркеров онкологических заболеваний.

Различают несколько десятков модификаций ИФА. Наибольшее распространение получил твердофазный гетерогенный иммунный анализ - ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) [9].

Механизм реакции. Первая реакция происходит между определяемым антителом и антигеном, фиксированным к поверхности лунок иммунологического планшета. Для выявления образовавшихся иммунных комплексов проводят вторую иммунологическую реакцию, в которой в качестве антигена выступает связавшееся антитело, а в качестве антител к нему — конъюгат, представляющий собой иммуноглобулин человека, меченный ферментом пероксидазой. Далее происходит ферментативная реакция. Субстратом данной реакции служит бесцветное вещество — хромоген, который в ходе реакции образует окрашенное вещество. Интенсивность окраски в лунке определенным образом зависит от количества содержащихся в пробе иммуноглобулинов. Положительный результат - окрашивание; отрицательный результат — отсутствие окрашивания. После остановки реакции проводят фотометрирование лунок с помощью спектрофотометров. При сравнении со значений оптической плотности контрольных проб проводят математическую обработку результатов анализа. Чем выше оптическая плотность в данной ячейки, тем большее количество специфических антител содержится в пробе (рис. 23).

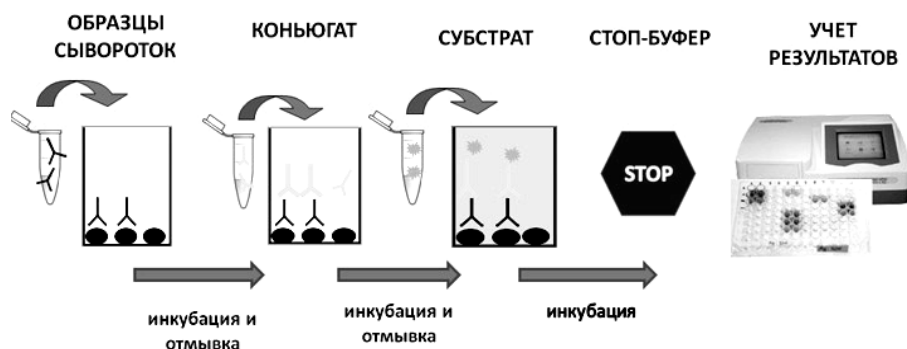


Рисунок 23 – Схема проведения ИФА

Техника проведения иммуноферментного анализа.

Для серодиагностики используются 96 луночные планшеты (рис. 23), на стенках ячеек которых адсорбируют антиген. В лунки планшета вносят по 100 мкл раствора антигенов (модифицированного ацетальдегидом или не модифицированного альбумина) с концентрацией белка 2,8 мкг в 1 мл; 0,05 мл карбонат-бикарбонатного буфера, рН 9,5. Сорбцию осуществляют в течение 18 — 20 часов при температуре 20—22°C, после чего не связавшиеся с планшетом антигены трижды отмывают холодной водопроводной водой и еще трижды - забуференным фосфатами физиологическим раствором с рН 7,2 — 7,4 (ЗФР/Т). В лунки планшет вносят по 100 мкл исследуемой сыворотки крови, при этом гомологичные антигену антитела прикрепляются к нему. После инкубации в течение 1 часа при 37°C планшеты отмывают по описанной выше методике, при этом не прикрепившиеся антитела удаляются промыванием. В лунки вносят по 100 мкл иммунопероксидазного реагента, представляющего собой антитела к иммуноглобулинам человека класса А, меченные пероксидазой. Инкубацию планшетов осуществляют в течение 1 часа при 37°C, после чего отмывают водопроводной водой и еще три раза - ЗФР/Т. Если в исследуемой сыворотке присутствовали определяемые антитела, то они на этом этапе выступают в роли антигенов, с которыми прореагируют меченные антитела. После промывки в лунки планшет добавляют краситель ортофенилендиамин, проводят инкубацию в течение 30 минут при температуре 20—22° в темноте, после чего дальнейшее развитие окраски ингибируют добавлением 50 мкл серной кислоты. Интенсивность окраски при этом пропорциональна количеству фермента, следовательно, и количеству антител. Результаты учитывают спектрофотометрически при длине волны 490 нм. Учет результатов осуществляют исходя из разности величин оптической плотности. За титр сыворотки принимается величина, обратная разведению сыворотки, при котором разность величин оптической плотности оказывается не меньше 0,1 [10].

Гибридомы. Получение моноклональных антител

Цель занятия: ознакомиться с техникой получения моноклональных антител.

Материальное обеспечение: Для демонстрации: таблицы – схемы получения гибридом, моноклональных антител; препараты МКА

Примерный план занятия (2 часа)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: записи в тетради методики получения гибридом и моноклональных антител.
4. Задание к следующему занятию.

Контрольные вопросы:

1. Процесс получения гибридом.
2. Получение и практическое применение моноклональных антител.

Гибридома – клеточный гибрид, получаемый слиянием нормальной клетки (иммунный лимфоцит) с опухолевой (например, миеломы). Обладает способностью к синтезу антител (свойство нормальной клетки) и неограниченному росту (свойство опухолевой клетки). Гибридомы синтезируют антитела, получивших названия **моноклональных** (МКА). Моноклональные антитела используют для диагностики многих вирусных заболеваний, в генной инженерии, в качестве лекарственных препаратов для лечения раковых заболеваний (герцептин, мабтера и другие).

Методика получение моноклональных антител.

Способ получения моноклональных антител с помощью гибридомных технологий был разработан Г. Кёлером и Ц. Мильштейном в 1975 году. Процедура получения моноклональных антител включает в себя следующие этапы: иммунизация животных; подготовка клеток к слиянию; слияние и отбор клонов; культивирование и идентификация клеточных клонов; массовая наработка моноклональных антител; очистка антител (рис. 24).

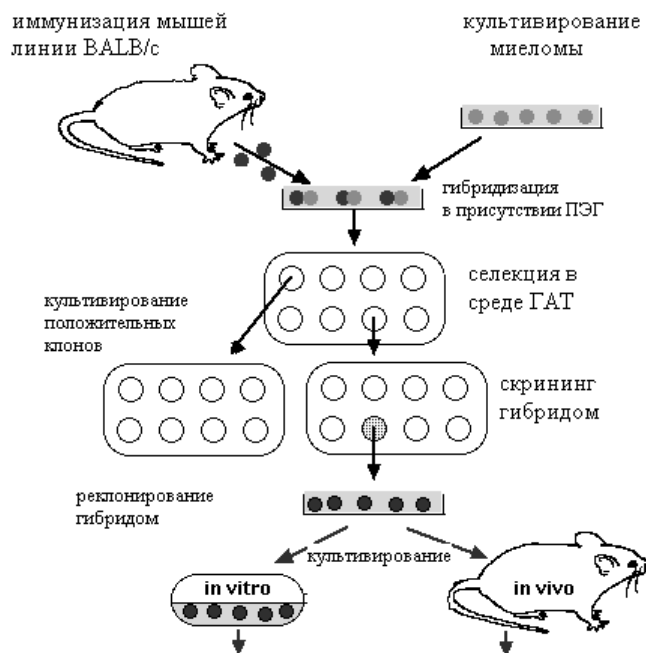


Рисунок 24 – Схема получения моноклональных антител

1. Иммунизация. Для иммунизации используют мышей и крыс, которым вводят очищенные антигены необходимой специфичности. В-лимфоциты иммунной системы мыши производят антитела, распознающие этот антиген. Схема иммунизации зависит от природы и иммуногенности антигена. По ходу иммунизации необходимо определять титр антител к антигену. В опыт набирают животных с высоким титром антител (рис. 25).

2. Подготовка клеток к слиянию. У животных с высоким уровнем антител берут селезенку, промывают ее, измельчают и слегка встряхивают для высвобождения единичных клеток, среди которых находятся и антителопродуктивные В-клетки. Клетки селезенки смешивают с суспензией специальных миеломных клеток (рис. 26).

3. Слияние и отбор клонов. Суспензию клеток селезенки и миеломных клеток в течение нескольких минут инкубируют в 35% растворе полиэтиленгликоля, а затем переносят в среду, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда ГАТ). В среде ГАТ родительские миеломные клетки погибают, а нормальные клетки селезенки не обладают способностью расти при данных условиях культивирования, так что выживают и размножаются

только гибридные клетки селезёнки-миеломы. На 10 - 14-е сутки после слияния клеток в среде ГАТ остаются и растут только слитые гибридомы селезёнки-миеломы (рис. 26), которые затем переносят в микротитровальные планшеты и выращивают в культуральной среде без ГАТ [1,4].

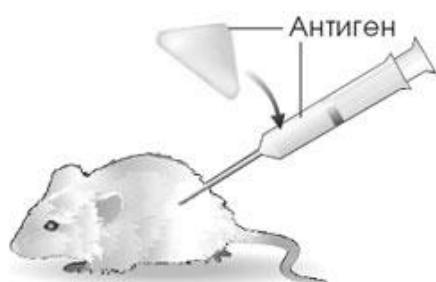


Рисунок 25 - Иммунизация лабораторной мыши

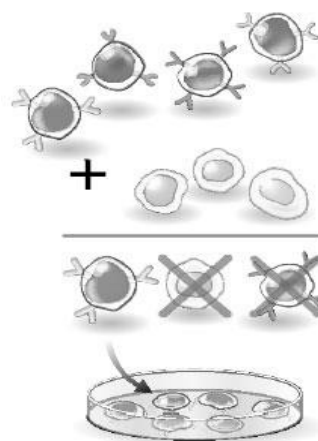


Рисунок 26 – Схема слияния, отбора и культивирования гибридом

4. Культивирование и идентификация гибридом. Чтобы получить линии, которые происходят от одной клетки (клоны), клеточную суспензию разбавляют культуральной средой и высевают в другие лунки планшеты. При первом клонировании активной может оказаться только небольшая часть клонов, при повторном клонировании (реклонирование) доля положительных клонов будет возрастать. После получения гибридомы нужно осуществить идентификацию (скрининг) гибридных клеточных линий. Для этого обычно проводят скрининг культуральных сред, содержащих антитела, которые секретируются, например, иммуноферментным анализом.

5. Массовая наработка моноклональных антител. После отбора гибридомных клеток приступают к их массовому наращиванию с целью получения больших количеств моноклональных антител. Один из способов получения моноклональных антител основан на инъекции гибридомы в брюшную полость мышки, где гибридома вызывает образование асцитной опухоли (скопления клеток, плавающих в жидкости, заполняющей брюшную полость). Предварительно животным вводят агенты, повышающие способность гибридом расти в брюшной полости. В качестве такого агента чаще всего вы-

стует пристан – 0,5 мл за 10 -14 суток до введения клеток. Асцитная жидкость, выделенная из этой мыши, представляет суспензию, содержащую антитела в концентрации 1-10 мг/мл. Клетки и белки, не относящиеся к МКА, удаляются. Оставшийся материал, представленный преимущественно антителами, используют. Моноклональные антитела можно получать путём выращивания гибридом в роллерных культурах. Для получения максимальной продукции моноклональных антител клеткам позволяют расти до предельной плотности. В такой культуре через определенное время наблюдается гибель гибридомных клеток. Надосадочная жидкость собирается, а клеточный осадок отбрасывается.

6. Очистка моноклональных антител. Для многих целей не требуется очистка антител, и они используются в виде культуральных жидкостей или асцитных жидкостей. Грубую иммуноглобулиновую фракцию можно получить высаливанием белков сульфатом аммония с последующим диализом [1].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелев, Г.И. Моноклональные антитела / Г.И. Абелев // Соросовский образовательный журнал. – 1998. - №1. – С.1 – 6.
2. Авдеева, Ж.И. Требования к производству и контролю препаратов на основе моноклональных антител, применение в лечении / Ж.И.Авдеева, Н.А.Алпатова, Р.А.Волкова // Биопрепараты . – 2010. - №2. – с.11 – 14.
- 3.Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / А.С.Быкова, Е.П.Пашкова, А.А.Воробьева, М.Я.Корн, А.В.Караулова, С.А.Быкова. – М.: МИА, 2003. – 232 с.
- 4.Байтубаев, Н.Г. Получение и использование моноклональных антител в диагностике гриппа лошадей: автореферат на соик. уч.ст. канд.вет.наук. – М., 1992. – 18 с.
- 5.Костенко, Т.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Т.С.Костенко, Е.И.Скаршевская, С.С.Гительсон. – М.: Агропромиздат, 1989. – 272 с.
6. Костенко Т.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Т.С.Костенко, В.Б.Родионова, Д.И.Скородубов. – М.: Колос, 2001. – 341 с.
7. Кишкун, А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике / А.А.Кишкун. – М.:МИА, 2009. – 712 с.
8. Полушкина, Н.Н. Диагностический справочник иммунолога / Н.Н.Полушкина. – М.: Астрель, 2010. – 480 с.
9. Самуилов, В.Д. Иммуноферментный анализ / В.Д.Самуилов // Соросовский образовательный журнал. – 1999. - №12. – с.9 – 15.
10. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М.Егоров, А.П.Осипов, Б.Б.Дзантиев.- М.: Высшая школа, 1991.
11. Хаитов, Р.М. Иммунология / Р.М.Хаитов, Г.Л.Игнатьева, И.Р.Сидорович. – М.:Медицина, 2000. – 432 с.
12. Электронная справочная система <http://www.wikipedia.org/>

Лицензия ЛР 020427 от 25.04.1997 г.

Подписано к печати 27.03.2015 г. Формат 60×90/16.

Уч.-изд.л. – 2,2. Усл.-п.л. – 3,0.

Тираж 100 экз. Заказ 68.

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии издательства ДальГАУ
675005, г. Благовещенск, ул. Политехническая, 86