

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ИВАНОВСКАЯ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ

Кузнецов О. Ю., Кириленко М. А.

Микробиологические лабораторные реакции



Иваново 2019

Рецензенты: почетный работник высшего профессионального образования РФ, профессор, доктор медицинских наук, зав. кафедрой микробиологии с вирусологией и иммунологией ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет Минздрава России» **В.А. Романов**
профессор, доктор медицинских наук, зав. кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия Минздрава России» **В.Ф.Баликин**

Кузнецов О. Ю., Кириленко М. А. Микробиологические лабораторные реакции: учебное пособие для студентов медицинских вузов. – Иваново : ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, 2019. – 73 с.

Печатается по решению методической комиссии по естественнонаучным дисциплинам от __.__.2019 г. (протокол №1).

В пособии рассматриваются особенности проведения лабораторных реакций, которые используются в настоящее время в микробиологической практике с целью постановки или подтверждения клинического диагноза при заболеваниях инфекционной природы. Приведены конкретные примеры данных реакций, например ПЦР, кроме того, рассматриваются возможности других перспективных реакций, таких как метод NASBA, MALDI TOF, применяемый для идентификации микроорганизмов.

Предназначено для самостоятельной подготовки студентов к лабораторным занятиям и экзаменам по медицинской микробиологии.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ РЕАКЦИИ

Введение

Микробиологическая диагностика в первую очередь необходима для определения причины инфекционных заболеваний. Существует 5 основных методов лабораторной диагностики: микроскопический, бактериологический, биологический, серологический и аллергический. Их принципы мы и рассмотрим в данной методичке. Также рассмотрим вопросы организации лабораторной микробиологической службы, методы выделения и идентификации бактерий, обнаружения вирусов, грибов и простейших. Данная тема очень актуальна в наше время, так как с развитием общества и с увеличением численности населения все более масштабным становится распространение инфекций и своевременное обнаружение их носителей способно предотвратить возникновение эпидемий. Обнаружение новых микроорганизмов, вызывающих заболевания, позволяет своевременно найти способ лечения.

ПРИНЦИПЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Цель микробиологических исследований — установить факт наличия или отсутствия возбудителя в организме больного и на объектах окружающей среды.

Задачи микробиологических исследований — идентифицировать микроорганизмы в исследуемом материале, определить их видовую принадлежность, морфологические, биохимические, токсигенные и антигенные свойства, а также установить чувствительность выделенных микроорганизмов к антимикробным препаратам. Несмотря на то, что проведение микробиологических исследований относится к компетенции микробиологов, каждый врач, имеющий дело с инфекционными заболеваниями, должен знать, как и когда необходимо отбирать материал для исследований, на какие исследования его направлять и как интерпретировать полученные результаты.

Отбор материала.

Первый этап любого микробиологического исследования составляет правильный выбор материала для исследования. Его определяют свойства возбудителя и патогенез вызываемого им заболевания. При поражениях отдельных органов и систем целесообразно отбирать материал соответствующей локализации. При отсутствии поражений исследуют кровь, а затем отбирают образцы с учётом клинической картины заболевания и доступности материала для исследования.

- Образцы следует забирать до назначения антимикробной терапии, с соблюдением правил асептики для предупреждения загрязнения материала. Каждый образец следует рассматривать как потенциально опасный. При заборе, транспортировке, хранении и работе с ним необходимо соблюдать правила биологической безопасности. Материал собирают в объеме достаточном для всего комплекса исследований. Микробиологические исследования следует начинать немедленно после поступления образца в лабораторию.
- Выбор материала для исследования должен соответствовать характеру инфекционного процесса. Так, например, при установлении этиологии пневмонии материалом должна быть мокрота, а не слюна, а при раневых инфекциях отделяемое следует забирать из глубины раны, а не с её поверхности.

Выбор лабораторных исследований

Основу микробиологической диагностики инфекционных заболеваний составляют микроскопические, микробиологические, биологические, серологические и аллергологические методы.

Микроскопические методы

Микроскопические методы включают приготовление мазков и препаратов для микроскопирования. *В большинстве случаев результаты микроскопических исследований носит ориентировочный характер* (например, определяют отношение возбудителей к окраске), так как многие микроорганизмы лишены морфологических и тинкториальных особенностей. Тем не менее микроскопией материала можно определить некоторые морфологические признаки возбудителей (наличие ядер, жгутиков, внутриклеточных включений и т.д.), а также установить факт наличия или отсутствия микроорганизмов в присланных образцах.

Микробиологические методы

Микробиологические методы — «золотой стандарт» микробиологической диагностики, так как *результаты микробиологических исследований позволяют точно установить факт наличия возбудителя в исследуемом материале*. Идентификацию чистых культур (до вида микроорганизма) проводят с учётом морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, токсигенных и антигенных свойств микроорганизма. Большинство исследований включает определение чувствительности к антимикробным препаратам у выделенного возбудителя. Для эпидемиологической оценки роли микроорганизма проводят внутривидовую идентификацию определением фаговаров, биоваров, резистентваров и т.д.

Биологические методы

Биологические методы направлены на определение наличия токсинов возбудителя в исследуемом материале и на обнаружение возбудителя (особенно при незначительном исходном содержании в исследуемом образце). Методы включают заражение лабораторных животных исследуе-

мым материалом с последующим выделением чистой культуры патогена, либо установлением факта присутствия микробного токсина и его природы. Моделирование экспериментальных инфекций у чувствительных животных — важный инструмент изучения патогенеза заболевания и характера взаимодействий внутри системы микроорганизм - макроорганизм. Для проведения биологических проб используют только здоровых животных определённых массы тела и возраста. Инфекционный материал вводят внутрь, в дыхательные пути, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно и подкожно, в переднюю камеру глаза, через трепанационное отверстие черепа, субокципитально (в большую цистерну головного мозга). У животных прижизненно забирают кровь, экссудат из брюшины, после гибели — кровь, кусочки различных органов, экссудат из различных полостей.

Серологические методы

Серологические методы выявления специфических АТ и Аг возбудителя — важный инструмент в диагностике инфекционных заболеваний. Особую ценность они имеют в тех случаях, когда выделить возбудитель не представляется возможности. При этом необходимо выявить повышение титров АТ, в связи с чем исследуют парные образцы сыворотки, взятые в интервале 10-20 суток (иногда этот интервал может быть более длительным). АТ обычно появляются в крови на 1-2-ю неделю заболевания и циркулируют в организме относительно долго, что позволяет использовать их выявление для ретроспективных эпидемиологических исследований. Определение классов Ig чётко характеризует этапы инфекционного процесса, а также может служить косвенным прогностическим критерием. Особое значение имеют методы выявления микробных Аг. В значимых количествах они появляются уже на самых ранних сроках, что делает их идентификацию важным инструментом экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, а количественное их определение в динамике инфекционного процесса служит критерием эффективности проводимой антимикробной терапии.

Аллергологические методы

Аг многих возбудителей обладают сенсibiliзирующим действием, что используют для диагностики инфекционных заболеваний, а также при проведении эпидемиологических исследований. Наибольшее распространение нашли кожно-аллергические пробы, включающие внутрикожное введение Аг (аллергена) с развитием реакции ГЗТ. Кожные пробы нашли применение в диагностике таких заболеваний как скарлатина, мелиодиоз, бруцеллёз. Наиболее известна проба Манту. Используемая как для диагностики туберкулёза, так и для оценки невосприимчивости организма к возбудителю.

Серологические методы исследования

В основе всех серологических реакций лежит взаимодействие антигена с антителом. Серологические реакции используются в двух направлениях.

1. Обнаружение с диагностической целью антител в сыворотке крови обследуемого. В этом случае из двух компонентов реакции (антиген, антитело) неизвестным является сыворотка крови, так как постановка реакции проводится с заведомо известными антигенами. Положительный результат реакции свидетельствует о наличии в крови антител гомологичных применяемому антигену; отрицательный результат указывает на отсутствие таковых. Достоверные результаты получают при исследовании парных сывороток крови больного: одной, взятой в начале заболевания (3 – 7 –й день), и второй – через 10 – 12 дней. В этом случае удается динамику нарастания антител.
2. Установление родовой и видовой принадлежности микроба или вируса. В этом случае неизвестным компонентом реакции является антиген. Такое исследование требует постановки реакции с заведомо известными иммунными сыворотками.

Серологические исследования, выполняемые для обнаружения специфических антител и антигена возбудителя при инфекционных заболеваниях - более доступные методы лабораторной диагностики, чем бактериологическое выявление возбудителя. В ряде случаев серологические исследования являются единственным методом диагностики инфекционных заболеваний (Кикушкин А.А. 2006).

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОМИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Все иммуномикробиологические методы (ИМ) можно подразделить на 3 группы:

- I. ИМ, основанные на прямом взаимодействии антигена с антителом (реакции агглютинации, преципитации, гемагглютинации, иммобилизации и др.);
- II. ИМ, основанные на опосредованном взаимодействии антигена с антителом (реакции непрямой гемагглютинации, коагглютинации, латекс-агглютинации, угольной агломерации, бентонит-агглютинации, связывания комплемента и др.);
- III. ИМ с использованием меченых антител или антигенов (метод флюоресцирующих антител, иммуноферментный и радиоиммунный анализы, спиниммунологический и другие методы).

При протекании реакций в иммунологических методах характерно наличие следующих фаз:

- 1) **специфическая (невидимая) фаза** – связывание детерминантной группы (эпитопа) антигена с паратопом - активным центром иммуноглобулина;

2) **неспецифическая (видимая) фаза** – образующийся комплекс антиген+антитело утрачивает растворимость и выпадает в осадок в виде хлопьев. Однако это явление возможно лишь в электролитной среде, например в 0,85% растворе натрия хлорида.

В микробиологической практике нашли широкое применение реакции взаимодействия антигенов с иммунными сыворотками. Эти реакции получили название серологических, так как для их постановки используют сыворотку (serum), содержащую антитела.

Данные антитела появляются в сыворотке в ходе иммунного ответа макроорганизма на внедрение в него микроорганизмов, несущих определенные чужеродные антигенные комплексы.

Однако следует особо подчеркнуть тот факт, что для обнаружения проникновения и колонизации микробами макроорганизма используют не только сыворотки, полученные от больных, но также определяют наличие антигенов микроорганизмов, что дает возможность идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.

Существует много разновидностей этих реакций, но в настоящем пособии будут представлены лишь основные из них, поскольку некоторые реакции, несмотря на их высокую информативность, применяются сейчас уже гораздо реже, чем это было ранее, например – определение опсонического индекса (в диагностике бруцеллеза, сыпного тифа и др.), реакция Исаева-Пфейффера (в диагностике холеры) и др..

Связано это в первую очередь с появлением новых методов обнаружения антигенов, антител и их комплексов, что позволяет быстро и точно выполнять идентификационные мероприятия и ставить диагноз заболевания с использованием современного лабораторного оборудования.

I. ИМ, ОСНОВАННЫЕ НА ПРЯМОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ АНТИГЕНА С АНТИТЕЛОМ

A. Реакция агглютинации (РА)

Агглютинацией называется склеивание микробов или других клеток при воздействии на них специфических антител в присутствии электролита.

Реакция агглютинации бывает специфической и неспецифической.

Специфическая реакция агглютинации характеризуется высокой специфичностью взаимодействия между антителами сыворотки и антигенами различных клеток.

Именно данный тип реакции агглютинации представляет большой практический интерес для диагностики различных заболеваний и возбудителей.

Для постановки специфической РА необходимо наличие следующих компонентов:

1. исследуемой сыворотки крови, точнее наличие в ней антител (агглютининов);
2. взвесь микробов определенной концентрации (антигенный диагностикум), т.е. антигена (агглютиногена);
3. электролита (0,85% раствор NaCl)

Неспецифическая РА бывает спонтанная и кислотная.

Спонтанная агглютинация характерна для R-вариантов микробов. Они образуют гомогенной взвеси в 0,85% растворе NaCl, а осаждаются в виде клеточных агрегатов.

Кислотная агглютинация наступает в результате воздействия на взвесь микробов кислот, которые снимают одноименный заряд на поверхности микробных клеток, последние склеиваются и выпадают в виде хлопьев на дно пробирки.

Специфическая РА

РА применяют для диагностики многих инфекционных заболеваний. Как и в других реакциях иммунитета, неизвестный компонент определяют по заведомо известному. Она бывает двух типов (РА по типу Грубера и по типу Видаля) и ставится в целях:

1. определение вида или типа микроба (РА по типу Грубера);
2. обнаружение антител в сыворотке крови больного (РА по типу Видаля).

РА внешне проявляется различно в зависимости от вида антигена и величины клеток. У бактерий при прохождении реакции с O-антигенами агглютинация протекает медленно и необходим большой временной интервал для наступления хорошо видимого результата – 18–20 часов. Образуется осадок, состоящий из мелких зерен, которые при встряхивании не разбиваются. Наличие жгутиковых H-антигенов (сальмонеллы брюшного тифа, паратифов, токсикоинфекций) определяет довольно быстрое наступление реакции – через 2–4 часа. При этом образуются крупные рыхлые легко разбивающиеся хлопья.

РА по типу Грубера

В РА по типу Грубера используют агглютинирующие сыворотки, содержащие определенные антитела (агглютинины). Для приготовления агглютинирующих сывороток животных (кролики, лошади, морские свинки

и др.) подвергают гипериммунизации. Им вводят 5–7 раз подкожно, а затем внутривенно в возрастающих концентрациях взвесь убитых, а последние 3 инъекции – живых микробов. Интервалы между инъекциями колеблются от 2 до 5–7 дней. Через неделю после последнего введения микробных взвесей, т.е. после окончания иммунизации, делают пробное кровопускание и проводят РА для определения титра сыворотки.

Титр агглютинирующей сыворотки – это максимальное разведение сыворотки, которое дает устойчивую РА с соответствующим гомологичным микробом.

В случае если пробное кровопускание показало недостаточно высокий титр агглютинирующей сыворотки, то процесс иммунизации продолжают. При высоком титре агглютинирующей сыворотки проводят массивное кровопускание или полное обескровливание животного в зависимости от размеров животного, целей получения сыворотки, а также исходя из экономических соображений.

Полученные таким путем агглютинирующие сыворотки хотя и называются видовыми, но могут вызывать агглютинацию микробов, родственных в антигенном отношении.

РА по типу Грубера бывает двух разновидностей – **ориентировочная РА** и **развернутая РА** (для окончательной идентификации исследуемого микроба).

Таким образом, в РА с помощью заведомо известных антител агглютинирующих сывороток обнаруживают антигены возбудителей, то есть другими словами, идентифицируют возбудителей по их антигенной структуре.

Ориентировочная РА по типу Грубера (РА на стекле).

В некоторых случаях, когда болезнь может быть вызвана различными видами микробов, для облегчения работы (исключения постановка развернутой РА агглютинации с несколькими сыворотками) ставят предварительно ориентировочную РА. Так поступают при лабораторной диагностике брюшного тифа и паратифов. Возбудителями брюшного тифа являются брюшнотифозная, а паратифов — паратифозные А- и В-сальмонеллы.

Микроб, выделенный от больного с клиническим диагнозом - брюшной тиф, агглютинируют на стекле тремя сыворотками. На предметные стекла наносят брюшнотифозную, паратифозные А- и В- сыворотки, разведенные 1 : 10 или 1 : 25, и для контроля — изотонический раствор хлористого натрия. Во все четыре капли вводят взвесь исследуемого микроба, и покачивают стекла в течение 2—3 минут до появления агглютинации в какой-либо капле сыворотки при положительной реакции, т.е. соответствии исследуемой культуры диагностической сыворотке. В контроле в это время

регистрируется равномерная муть. Данную реакцию ставят перед постановкой развернутой РА для идентификации микроба.

Ориентировочную РА используют также для постановки предварительного диагноза, например при подозрении на заболевание холерой.

Развернутая РА по типу Грубера

Развернутую РА ставят с одной сывороткой, реагировавшей предварительно в ориентировочном опыте. Иногда микроб агглютинируется двумя сыворотками. В таком случае развернутую реакцию ставят с каждой из этих сывороток.

Для выполнения развернутой РА необходимо использовать такие агглютинирующие сыворотки, которые позволяли бы минимизировать ошибки в трактовке результатов реакции. В этом случае более достоверные результаты при определении вида или типа микробов дают монорецепторные или типоспецифические сыворотки, из которых максимально удалены групповые антигены. Получают данные сыворотки путем истощения групповых антител в реакции Кастеллани.

Реакция Кастеллани (метод предложен в 1902 г.)

Микробная клетка представляет собой сложный комплекс антигенов, где есть групповые, видовые и типовые антигены. Специфичность данных антигенов повышается в направлении – «группа → вид → тип». При иммунизации организм отвечает на вводимый антиген выработкой соответствующих антител. Поэтому сыворотки, содержащие групповые агглютинины (антитела), агглютинируют родственные между собой микробные виды, имеющие общий групповой антиген. Групповая агглютинация затрудняет определение вида выделенного микроба и серологическую диагностику заболевания. Устранить групповую агглютинацию можно, удалив из сыворотки антитела в отношении антигенов, являющихся общими для гомологичного микроба и для родственников с ним. Это достигается путем смешивания небольшого количества сыворотки с густой взвесью микробов, дающих групповую агглютинацию, что ведет к адсорбции на их поверхности соответствующих антител. В жидкости, полученной после центрифугирования, остаются антитела лишь в отношении гомологичного микроба.

Лучше всего рассмотреть это по схеме на Рис. 1.

Предположим, что нам требуется получить агглютинирующую сыворотку к микроорганизму 1. Эта сыворотка должна давать стабильную РА с данным микроорганизмом (и только с ним!), что позволит надежно идентифицировать его.

Данный микроб обладает условной антигенной структурой: групповые антигены – А, видовые – В, типовые – С. Этот микроорганизм имеет двух близких «родственников» 2 и 3, которые сходны по антигенной структуре групповых и видовых антигенов (А и В).

Совпадение по типовым специфическим антигенам полностью исключено, и для каждого из взятых в эксперимент микроорганизмов они строго индивидуальны – С, D, F соответственно.

Микроорганизм 1 используют для иммунизации животного (по нашей схеме – кролика) как было указано выше. «Кролик из клетки убежать не может» и вынужден отвечать на неприятное воздействие только выработкой антител к антигенам А, В, С. После достижения в сыворотке крови достаточного титра антител у кролика делают забор крови, получают сыворотку. Данную сыворотку уже можно назвать агглютинирующей, поскольку после добавления микроорганизмов 1, 2 или 3 произойдет РА.

Казалось бы, нужный результат не получен – сыворотка дает РА на близкородственные в антигенном отношении штаммы. Да, на первый взгляд – это так. Но если вернуться к сыворотке и более внимательно посмотреть, что же там произошло, то увидим, что прореагировали лишь групповые и видовые антитела сыворотки против групповых и видовых антигенов, которые есть у всех микробов 1, 2, 3. Образовавшийся агглютинат выпал в осадок, а наиболее специфичные антитела С (типоспецифические антитела против антигенов возбудителя 1) остались в надосадочной жидкости.

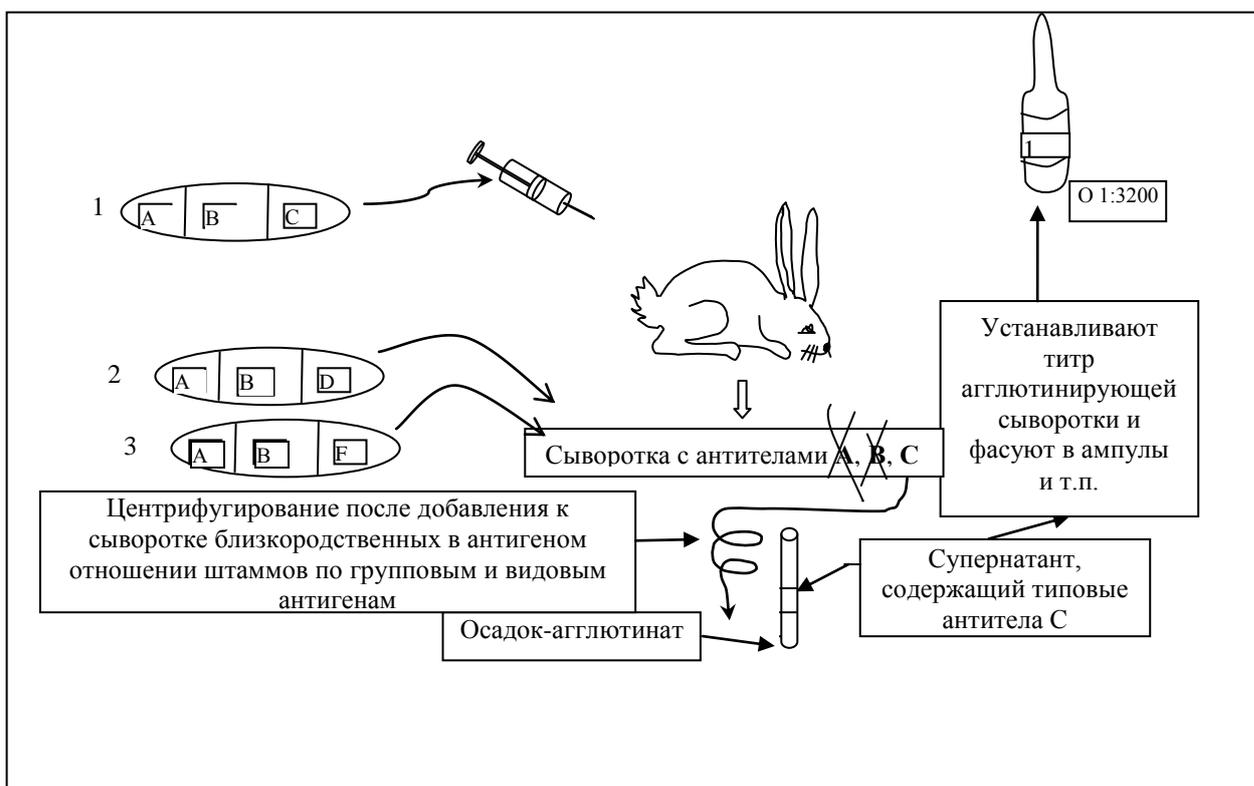


Рис.1. Выполнение реакции Каstellани

Затем для полученной агглютинирующей сыворотки определяют титр (определение см. выше), фасуют в ампулы (пузырьки) и обязательно делают маркировку на обложке этой емкости – какой возбудитель и в каком титре агглютинируется данной сывороткой.

Типовые (монорецепторные) сыворотки можно использовать для РА по типу Грубера как ориентировочного, так и в развернутого типа. Однако использование типовых сывороток для выполнения ориентировочной реакции на стекле хотя и допускается, но ограничено из-за нерентабельности этого процесса, несмотря на относительно высокую точность подобного рода исследования.

Конечно, с появлением лабораторных реакций типа ИФА и ПЦР необходимость проведения РА по типу Грубера несколько снизилась, но простота постановки, стоимость и специфичность данной реакции оставляет ее в ряду надежных методов идентификации (обнаружения) возбудителя по его антигенной структуре.

Практическое выполнение развернутой РА по типу Грубера

Для выполнения данной реакции нужно обязательно взять агглютинирующую сыворотку возбудителя с указанным титром. Если титр на ампуле не указан или сыворотка носит название комплексной, то это означает, что в данной ампуле находится смесь нескольких агглютинирующих сывороток. Эту сыворотку можно использовать только в ориентировочной РА.

Из основного разведения агглютинирующей сыворотки готовят ряд последовательных двукратных разведений сыворотки до титра, указанного на ампуле хранения (рис.2). Например, титр агглютинирующей сыворотки равен 1:3200. Основное (рабочее) разведение сыворотки – 1:50. Берут ряд пробирок – всего 8 штук, в том числе 2 контрольных. Во все из них приливают по 1 мл физиологического раствора. Затем в первую пробирку вносят 1 мл основного разведения агглютинирующей сыворотки, получаем в данной пробирке разведение сыворотки 1:100. После этого из первой пробирки вновь берут 1 мл сыворотки разведения 1:100 и переносят во вторую пробирку, получая разведение в ней 1:200. При последующих сходных манипуляциях получают следующие разведения сыворотки 1:400; 1:800; 1:1600 и, наконец, получено последнее разведение сыворотки 1:3200 – титр агглютинирующей сыворотки, который был указан на ампуле. Из последнего разведения сыворотки аналогичный объем, как и ранее, отбирают и сбрасывают в дезинфекционный раствор. С контрольным разведением сыворотки проделывают такую же манипуляцию.

Далее разводить сыворотку не имеет смысла – малая концентрация антител уже не дает стабильную РА при последующих разведениях. В нашем примере мы произвольно выбрали титр агглютинирующей сыворотки 1:3200, однако бывают сыворотки и с гораздо большим титром разведения,

например, 1:6400 и др. В данном случае разведение (растворку) сыворотки следует проводить до указанного титра и также сохранять контроли.

После приготовления разведений сыворотки в каждую пробирку вносят взвесь микробов (антиген), который готовят из суточной или 20-часовой исследуемой культуры со скошенного агара на физиологическом растворе. Взвесь вносят в каждую пробирку по 1–2 капли, кроме контрольной пробирки для сыворотки. Пробирки энергично встряхивают и помещают на 2 часа в термостат при температуре 37°C, затем производят предварительный учет. Окончательный учет выполняют через 18-20 часов. Интенсивность реакции выражается плюсами. Полная агглютинация обозначается четырьмя плюсами (++++) – жидкость совершенно прозрачна, а на дне отмечается осадок из хлопьев склеившихся микробов. Чем меньше микробов агглютинировалось, тем мутнее жидкость и тем меньше хлопьевидный осадок на дне. В зависимости от этого результаты реакции отмечают тремя (+++), двумя (++) или одним (+). Однако более важным моментом является то, в какой пробирке (при каком разведении сыворотки) наступает РА.

Реакция считается положительной, если агглютинация микробов наступает при разведении сыворотки от 2/3 титра сыворотки и до ее окончательного титра. В нашем случае это – разведения сыворотки 1:1600 и до 1:3200. В данном случае прореагировали типоспецифические антитела сыворотки, и это означает, что антигенная структура возбудителя им полностью соответствует. В данном случае остается только сделать заключение о правильности подбора в исследование агглютинирующей сыворотки и виде изучаемого микроба. Мы правильно его идентифицировали.

При наступлении реакции в разведениях от 2/3 титра и до 1/3 титра (в нашем случае 1:800 и 1:400) произошло связывание видовых антител сыворотки. В этом случае обнаружен микроб из того же вида, сходный по антигенной структуре, но здесь необходимо сменить сыворотку и провести реакцию заново. Наступление реакции до 1/3 титра (1:100 – 1:200) агглютинация прошла с групповыми антителами, которые остались в сыворотке после выполнения реакции Каstellани.

Как и в случае с агглютинацией видовыми антителами сыворотки, для правильной идентификации возбудителя по его антигенной структуре, вновь необходима замена агглютинирующей сыворотки.

При выполнении РА по типу Грубера нужно обращать внимание также на то, какие антитела несет данная агглютинирующая сыворотка. Обозначение на этикетке «О 1:3200» свидетельствует о том, что в сыворотке есть антитела к О-антигенам в указанном титре.

Исследователь должен помнить тот факт, что О - антигены могут маскироваться Н - или К- антигенами этой микробной культуры и для обнаружения О - антигенов требуется прогреть эту микробную культуру,

чтобы их высвободить. В другом случае, если реакция проводится на Н- или К- антигены – культура должна быть живой.

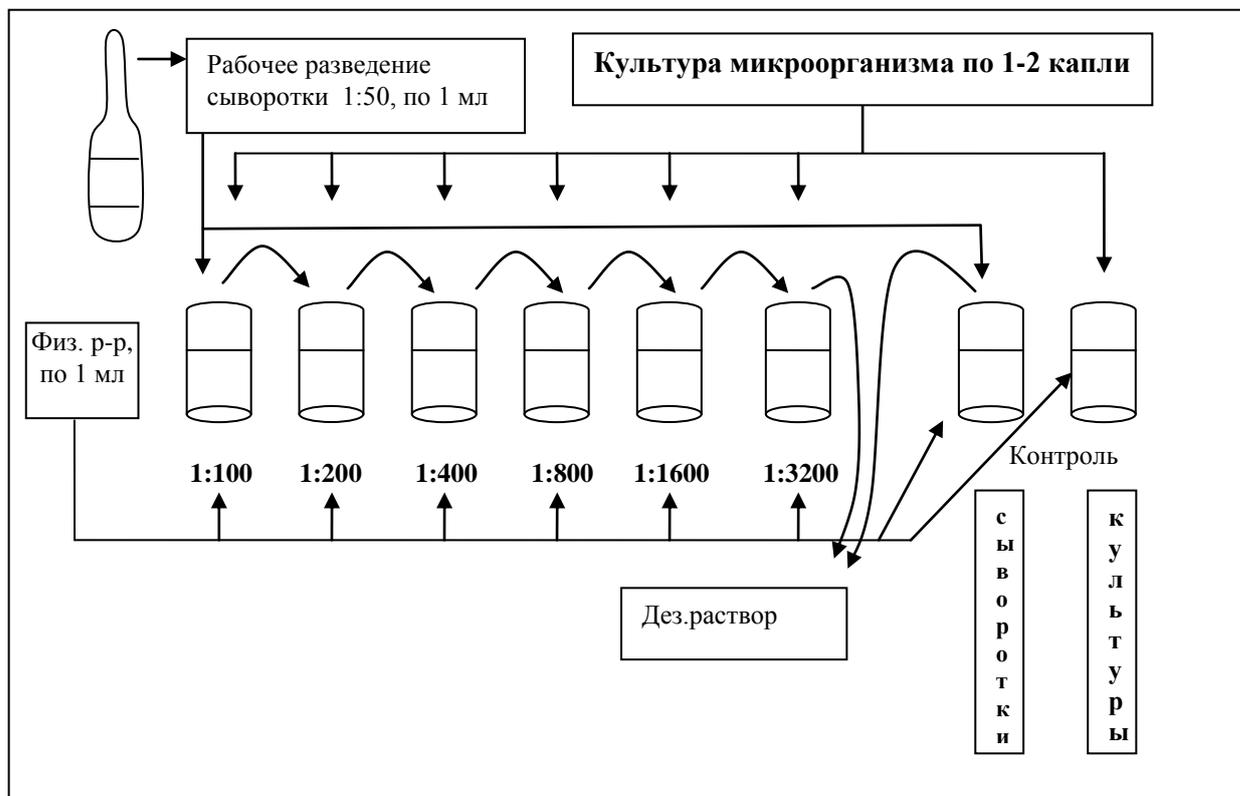


Рис.2. Выполнение развернутой РА по типу Грубера

Иногда одна и та же агглютинирующая сыворотка может содержать одновременно антитела к О-антигенам и Н- или К- антигенам. Следует учитывать эту особенность выполнения реакции. В этом случае необходимо готовить два или три ряда разведений сывороток (сколько антител в сыворотке, столько и рядов разведений). Титры к указанным антигенам будут соответственно разные. Одна и та же микробная культура будет использована и как убитая (для выполнения реакции на О- антиген), и как живая (на Н- и К- антигены). В остальном оценка результатов реакции полностью соответствует описанию, приведенному выше.

РА по типу Видаля

РА по типу Видаля основывается на обнаружении агглютининов (антител) в сыворотке крови больных и используется с целью подтверждения инфекционной болезни, вызванной тем или иным возбудителем: для диагностики брюшного тифа (реакция Видаля), сыпного тифа (реакция с риккетсиями Провачека), бруцеллеза (реакция Райта и Хеддельсона), туляремии и других заболеваний. Реакцию проводят на второй неделе

заболевания, когда в сыворотке накапливается достаточно высокий титр антител к возбудителю.

Для постановки реакции необходимо иметь:

1. исследуемую сыворотку крови,
2. 0,85% раствор NaCl (физиологический раствор),
3. антигенный диагностикум

Диагностикум – это взвесь в растворе заведомо известных убитых микробных тел, сохранивших свою антигенную структуру (в отдельных случаях микробы могут быть живыми). Убиты они могут быть самыми различными методами физического и химического воздействия (нагреванием, ультразвуком, спиртом, формалином), либо сочетанным действием этих факторов. Диагностикумы из убитых микробов имеют ряд преимуществ – они являются весьма устойчивыми препаратами, они не теряют своих свойств в течение 2 лет. Используемые диагностикумы представляют собой убитые культуры и, поэтому они безопасны для персонала, выполняющего лабораторные исследования с их использованием. Культуры микроорганизмов в диагностикуме представляют собой типичные штаммы, которые выращены и приготовлены для использования в стандартных условиях, и именно это позволяет добиться стабильности и стандартизации антигенных свойств используемых препаратов.

Техника постановки и учета РА с сывороткой больного (см. рис.3) не отличается от постановки развернутой РА для определения вида микробов (РА по типу Грубера).

Сначала готовят исходное разведение сыворотки больного (1:50). В 6 пробирок (две из них – контрольные) вносят по 1 мл физиологического раствора. В первую из опытных пробирок добавляют 1 мл исходного рабочего разведения сыворотки, получая при этом разведение 1:100. Затем из первой пробирки берут 1 мл и переносят во вторую, перемешивают и также поступают с третьей и четвертой пробирками. Из четвертой пробирки после приготовления разведения 1 мл сбрасывают в дезинфицирующий раствор. Контроль сыворотки готовят аналогично – 1 мл рабочего разведения сыворотки добавляют к 1 мл физиологического раствора и затем 1 мл полученного разведения (1:100) сбрасывают в дезинфицирующий раствор. В пробирке естественно остается 1 мл разведения сыворотки 1:100.

После приготовления разведений сыворотки от 1:100 до 1:800 в каждую из них и контрольную пробирку (контроль диагностикума) добавляют 1–2 капли диагностикума. Причины приготовления разведения сыворотки от 1:100 до 1:800 заключаются в том, что более низкие концентрации не используют из-за возможного наличия в сыворотке антител, способных в небольших разведениях вызывать РА.

Пробирки помещают на 2 часа в термостат, после чего их оттуда извлекают и оставляют на 18-20 часов при комнатной температуре.

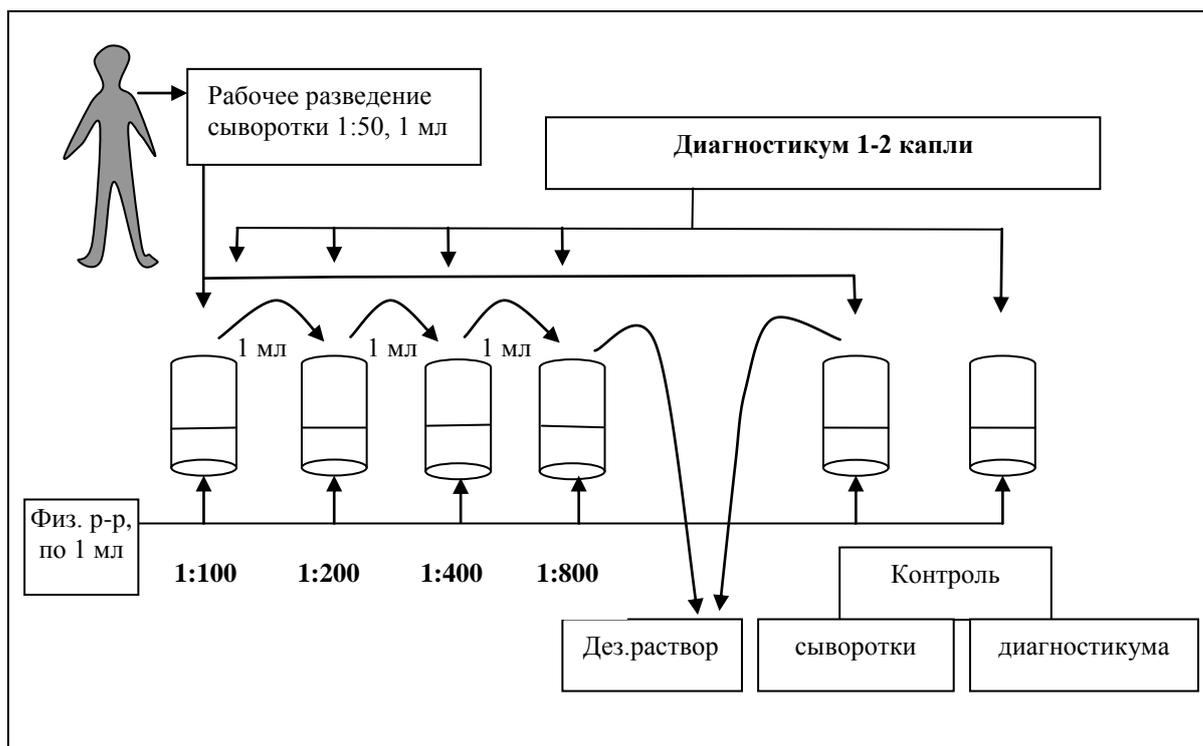


Рис.3. Выполнение РА по типу Видаля

Исключением является РА с бруцеллами и риккетсиями, в этих случаях пробирки выдерживают в термостате 20 часов. Диагностическое значение имеет положительная реакция в определенных разведениях (диагностический титр реакции).

Так, например, диагноз брюшного тифа подтверждает положительная реакция в разведении сыворотки 1:200–1:400, диагноз бруцеллеза – 1:200, при туляремии такое же значение имеет положительная реакция 1:100. Изучение этих реакций в динамике дает более достоверные результаты. Кровь у больного берут повторно и вновь ставят РА с соответствующим диагностикумом.

В процессе болезни, как правило, увеличивается количество антител, следовательно, повышается титр агглютининов. Если положительные результаты агглютинации были обусловлены присутствием специфических антител в результате перенесенного заболевания или вакцинации (анамнестическая или поствакцинальная реакция), титр антител не нарастает, а порой даже уменьшается.

Таким образом, поставленная в динамике реакция дает представление о протекании инфекционного процесса в ходе лечебных мероприятий.

В реакции агглютинации с сыворотками больных имеет значение выявление О-, Н- и Vi- антител. Обнаружение О- антител подтверждает заболевание брюшным тифом, тогда как Н-антитела выявляются у

перенесших заболевание или вакцинированных, Vi- антитела – у брюшнотифозных носителей.

Б. Реакция преципитации

В реакции участвуют мелкодисперсные антигены (преципитиногены), которые связываются с соответствующими антителами (преципитинами). Чаще всего эту реакцию применяют для выявления антигенов по известной иммунной преципитирующей сыворотке, содержащей антитела-преципитины. В этой реакции осаждаются частицы ультрамикроскопической величины коллоидного раствора белка, полисахаридов. Она является весьма специфической и чувствительной. Посредством реакции преципитации можно выявить антиген-белок в разведении 1:100 000 и даже 1:300 000, т. е. в столь малых количествах, в которых он не обнаруживается химическим путем. Это качественный метод исследования.

Реакция преципитации применяется в микробиологической практике для диагностики ряда инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы (эпидемический цереброспинальный менингит, сибирская язва, туляремия, чума, натуральная оспа, полиомиелит, аденовирусные заболевания и др.).

В судебной медицине реакция преципитации используется с целью определения видовой принадлежности белка крови. Из кровяных пятен делают вытяжку в 0,85% растворе поваренной соли, фильтруют, затем наслаивают на преципитирующие сыворотки, содержащие антитела к белкам крови разных видов животных и человека. Преципитация возникает в той пробирке, где антиген соответствует антителу.

С помощью реакции преципитации в санитарной практике выявляют фальсификацию мясных, рыбных, мучных изделий, т. е. устанавливают, из какого мяса, рыбы или муки изготовлены те или иные продукты.

Преципитирующие сыворотки изготавливаются в производственных институтах путем гипериммунизации животных. В качестве антигенов для иммунизации применяют микробные взвеси, фильтраты старых бульонных культур, аутолизаты и солевые экстракты микробов, а также полные антигены бактерий.

Иммунизация лабораторных животных проводится циклами в течение нескольких месяцев. В первые две недели антиген вводят ежедневно малыми дозами (0,5 мл), а затем с интервалами в 4–6 дней более массивными дозами 8–16 раз. Через 8–12 дней после последней инъекции антигена производят пробное кровопускание для определения титра сыворотки; если титр достаточно высок, делают массивное кровопускание.

Титр преципитирующей сыворотки в отличие от титра других диагностических сывороток определяется максимальным разведением антигена, который преципитируется данной сывороткой. Это объясняется тем, что антиген, участвующий в реакции преципитации, имеет

ультрамикроскопическую величину и в единице объема его содержится гораздо больше, чем антител в таком же объеме сыворотки. Сыворотки выпускают с титром не ниже 1:100 000.

Благодаря своей высокой чувствительности и скорости выполнения наиболее популярна в медицинской и ветеринарной практике **реакция Асколи** для обнаружения антигена возбудителя сибирской язвы.

В узкую преципитационную пробирку добавляют стандартную иммунную сыворотку и па нее осторожно настилают жидкость, содержащую определяемый антиген. Появление па границе двух жидкостей кольца (преципитата) свидетельствует о наличии антигена возбудителя сибирской язвы в исследуемой жидкости.

Преципитат возникает вследствие укрупнения коллоидных частиц антигена. Иногда эту реакцию называют кольцепреципитацией.

Важным условием образования нерастворимого комплекса антиген-антитело является полная прозрачность жидкостей, а также эквивалентное соотношение ингредиентов, т.к. образующийся комплекс растворяется в избытке антигена или антитела.

В связи с тем, что в реакции преципитации вообще, и кольцепреципитации в частности, нельзя установить количества разных антигенов, участвующих в формировании преципитата, были разработаны и нашли практическое применение различные модификации реакции преципитации в геле, которые позволяют изучать антигенную структуру исследуемых микроорганизмов.

Сущность этой реакции заключается в том, что одноименные антиген и антитело, помещенные на определенном расстоянии в агаровом геле, диффундируют и при встрече образуют преципитат в виде белых полос. Эта реакция широко используется в диагностике заболеваний, вызываемых вирусами, риккетсиями и бактериями, продуцирующими токсины.

Посредством реакции преципитации в геле (например, агаре) можно определить неизвестный антиген по известной специфической сыворотке, а также неизвестные антитела по известному антигену.

Реакция преципитации в агаре (по Оухтерлони)

Метод диффузной преципитации позволяет детально изучать состав сложных водорастворимых антигенных комплексов. Средой для растворения является слой застывшего агара, в котором пробиваются лунки. В одну лунку помещают жидкость, содержащую исследуемый антиген, в другую – стандартную иммунную сыворотку.

Компоненты, входящие в состав антигена, диффундируют навстречу соответствующему антителу с различной скоростью. Комплекс антиген – антитело расположен в различных участках геля, где образуются линии

преципитации. Каждая из линий соответствует только одному комплексу антиген – антитело.

Радиальная иммунодиффузия по Манчини

В основе реакции лежит реакция преципитации. При соотношении антигена и антитела, близком к оптимальному, образуется кольцо преципитации.

Чем выше концентрация внесенного в лунку антигена, тем больше диаметр кольца.

Чем выше концентрация антигена, тем на большее расстояние он продиффундирует до того, как сформируется кольцо, и тем шире будет диаметр этого кольца.

Если в реакции использовать 3 стандарта с известной концентрацией антигена, то можно получить калибровочную кривую.

Такой подход можно использовать для определения концентрации иммуноглобулинов, компонента комплемента С и т.д.

Реакция иммуноэлектрофореза

В основе реакции лежит реакция преципитации. Реакция наиболее популярна в последние годы при исследовании антигенной структуры микроорганизмов. Антигенный комплекс помещают в лунку, которая находится в центре геля, залитого на стеклянную пластинку. Затем через гель пропускают электрический ток – происходит электрофорез белков, различные антигены перемещаются на неодинаковые расстояния соответственно своей электрофоретической подвижности. После окончания электрофореза в канавку, расположенную по краю пластинки (параллельно направлению движения белков), вносят специфическую иммунную сыворотку. Затем пластинку помещают во влажную камеру. В местах образования комплекса антиген – антитело появляются дугообразные линии преципитации.

В. Реакция гемагглютинации (РГА)

Данная реакция является результатом действия фермента гемагглютинаина вируса на эритроциты. Понимание процессов, происходящих в этой реакции, необходимо для описания реакции торможения гемагглютинации и реакции непрямой гемагглютинации. Некоторые вирусы вызывают агглютинацию эритроцитов определенных видов животных. Установлено, что вирусы гриппа и эпидемического паротита агглютинируют эритроциты кур, морских свинок, вирус клещевого энцефалита – эритроциты овец, вирус полиомиелита – эритроциты барана.

Реакцию гемагглютинации ставят в пробирках, на специальных досках из плексигласа или на предметных стеклах. Материал, содержащий вирус,

разводят изотоническим раствором от 1:10 до 1:1280. К 0,5 мл каждого разведения добавляют равный объем 1—2% взвеси эритроцитов. Пробирки помещают в термостат на 30 минут, а стекла или доски оставляют при комнатной температуре на 45 минут. Учет реакции производят по характеру осадка.

Положительная реакция, обозначаемая четырьмя плюсами (++++), характеризуется интенсивной и быстрой агглютинацией эритроцитов, которые осаждаются на дне и стенках пробирки или в углублениях доски из плексигласа, осадок имеет звездчатую форму с фестончатыми краями. Три плюсами (+++) отмечается несколько менее интенсивная реакция с меньшим количеством агглютинированных эритроцитов на стенках, двумя плюсами (++) — с менее выраженным осадком и одним плюсом (+) — с незначительным агглютинатом только на дне пробирки. При отрицательном результате осевшие эритроциты образуют диск с ровными краями.

Г. Реакция нейтрализации (РН)

Реакция основана на способности специфических антител связывать различные возбудители или их метаболиты, лишая их возможности проявлять свои биологические свойства. Реакция нейтрализации существует в двух основных разновидностях – реакция нейтрализации вирусов (РНВ) и реакция нейтрализации токсинов (РНТ).

При выполнении РНВ используют сыворотку переболевших лиц, в которой циркулируют антитела, способные нейтрализовать инфекционность вирусов. Их наличие выявляют смешиванием культуры возбудителя с сывороткой и последующим введением лабораторному животному или заражением культуры клеток. На эффективность нейтрализации указывает выживание животного, или отсутствие цитопатического эффекта в клеточных культурах.

РНТ (реакция флоккуляции) по своему принципу во многом аналогична РНВ. Иммунная сыворотка, содержащая антитела (антитоксины) связывает токсин и блокирует его действие.

Феномен флоккуляции – помутнение в экспериментальной пробирке, содержащей смесь токсина и антитоксина.

Данный феномен является специфической реакцией и его используют в сывороточном производстве для определения степени активности или установления силы действия антитоксических сывороток.

Для определения антитоксического иммунитета у человека часто применяют кожные пробы (например, пробу Шика).

Для идентификации токсина и определения титра антитоксических антител их смесь вводят подопытным животным. При соответствии типа токсина и его антисыворотки гибели животных не происходит.

Можно сказать, что в определенной степени к реакции нейтрализации очень близка реакция иммобилизации, которая представлена ниже.

Д. Реакция иммобилизации (РИ)

Реакция основана на способности специфических антител, которые циркулируют в сыворотке больных, подавлять подвижность различных микроорганизмов, например, спирихет.

На практике нашли широкое применение реакции иммобилизации бледной трепонемы и холерного вибриона. Наиболее часто данная реакция выполняется в ходе диагностики сифилиса. Ее принцип реакции заключается в угнетении движения (иммобилизации) микроорганизмов специфическими антителами сыворотки крови в присутствии комплемента.

Трепонемы получают из яичка кролика, зараженного экспериментальным сифилисом. Яичко измельчают в специальной среде, где трепонемы сохраняют подвижность. При постановке реакции иммобилизации взвесь тканевых (подвижных) трепонем соединяют в пробирке с исследуемой сывороткой и добавляют свежий комплемент. В реакции предусмотрено два контроля. В одну контрольную пробирку вместо исследуемой сыворотки добавляют сыворотку здорового человека, в другую – вместо свежего комплемента добавляют неактивный, инактивированный нагреванием (56°C в течение получаса). Затем некоторое время инкубируют в термостате и из всех пробирок готовят препарат «раздавленная капля» и в темном поле определяют количество подвижных и неподвижных трепонем.

Процент специфически иммобилизованных спирихет определяют по формуле: $X = (T_x - T_0 / T_x) \cdot 100$, где T_x – число подвижных трепонем в контроле (с инактивированным комплементом), T_0 – число подвижных трепонем в опыте (с активным комплементом). Результат реакции считают положительным, если процент иммобилизации выше 50, слабopоложительным – от 31 до 50, сомнительным – от 21 до 30 и отрицательным – ниже 20.

II. ИМ ОСНОВАННЫЕ НА ОПОСРЕДОВАННОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ АНТИГЕНА С АНТИТЕЛОМ

А. Реакция титрования комплемента (РТК)

Данная реакция ставится с несколькими целями:

1. подготовка компонентов для последующего выполнения реакции связывания комплемента;
2. собственно диагностическая.

Компоненты данной реакции:

1. физиологический раствор;
2. 5% взвесь эритроцитов барана в физиологическом растворе;
3. комплемент сыворотки морской свинки;
4. гемолитическая сыворотка.

Реакция протекает при обязательном условии строгого количественного соотношения всех ингредиентов, поэтому постановке реакции предшествует тщательная их подготовка.

Взвесь эритроцитов готовят накануне проведения реакции. Кровь у барана берут из яремной вены. Кровь отбирают в стерильный стеклянный флакон со стеклянными бусами и активным встряхиванием дефибринируют в течение 10-15 минут. Эритроциты отмывают в изотоническом растворе несколько раз, прибегая к центрифугированию. Последняя порция промывной жидкости должна быть полностью бесцветной.

Комплемент содержится в любой свежей сыворотке. Обычно для выполнения РТК, реакции связывания комплемента (РСК) используют сыворотку морской свинки. Естественно, что у каждого животного содержание комплемента зависит от физиологического состояния животного. Поэтому сыворотки, взятые от 3–4 свинок, смешивают вместе.

Гемолитическую сыворотку получают путем иммунизации кроликов 3-4 кратным введением им 2–5 мл 50% взвеси бараньих эритроцитов. После достижения достаточного титра антител кролика к вводимым бараньим эритроцитам делают массивное кровопускание и отделяют форменные элементы крови, получая сыворотку.

Затем инактивируют собственный комплемент данной сыворотки прогреванием ее в течение получаса при температуре 56°C. В связи с тем, что антитела являются более устойчивыми к данной температуре, то они сохраняются полностью. Белки повреждаются при более высокой температуре – более 80°C. Титр гемолитической сыворотки должен быть не ниже 1:1200. Для реакции гемолитическую сыворотку берут в тройном титре, т.е. в тройном количестве.

При добавлении эритроцитов барана к гемолитической сыворотке получают так называемую гемолитическую систему – взвесь эритроцитов барана, сенсibilизированных антителами кролика.

Находясь в физиологическом растворе, эти сенсibilизированные антителами кролика эритроциты барана не лизируются, а медленно оседают на дно емкости, где выполняется реакция. Лизис данных эритроцитов наступает лишь в присутствии комплемента.

Собственно, если говорить правильно данная реакция сопровождается не гемолизом эритроцитов (в реакции все используемые компоненты изотоничны!), а гемоглобинолизом – нарушением связи между оболочками эритроцитов и гемоглобином. Последний легко проникает из эритроцитов в окружающую среду, подкрашивая ее в красный цвет.

Истинный же гемолиз наступает в результате воздействия на эритроциты гипотонического раствора, под влиянием которого оболочки вначале растягиваются, а затем разрываются, что ведет к выходу свободного гемоглобина из эритроцитов.

Принципиальный ход выполнения реакции представлен на рисунке 4.

Берется ряд пробирок – 8 штук, и в каждую из них вносится физиологический раствор. Затем в пробирки вносится в возрастающей концентрации комплемент – от 0,05 до 0,4 мл.

Гемолитическая система добавляется в каждую пробирку одинаково по 1 мл. Таким образом, получается, что в пробирках присутствуют все компоненты. Изменяющимся компонентом является комплемент – его количество постоянно возрастает.

В начальных пробирках недостаток комплемента не вызывает полного гемолиза сенсibilизированных эритроцитов, и поэтому наблюдается осадок оставшихся эритроцитов.

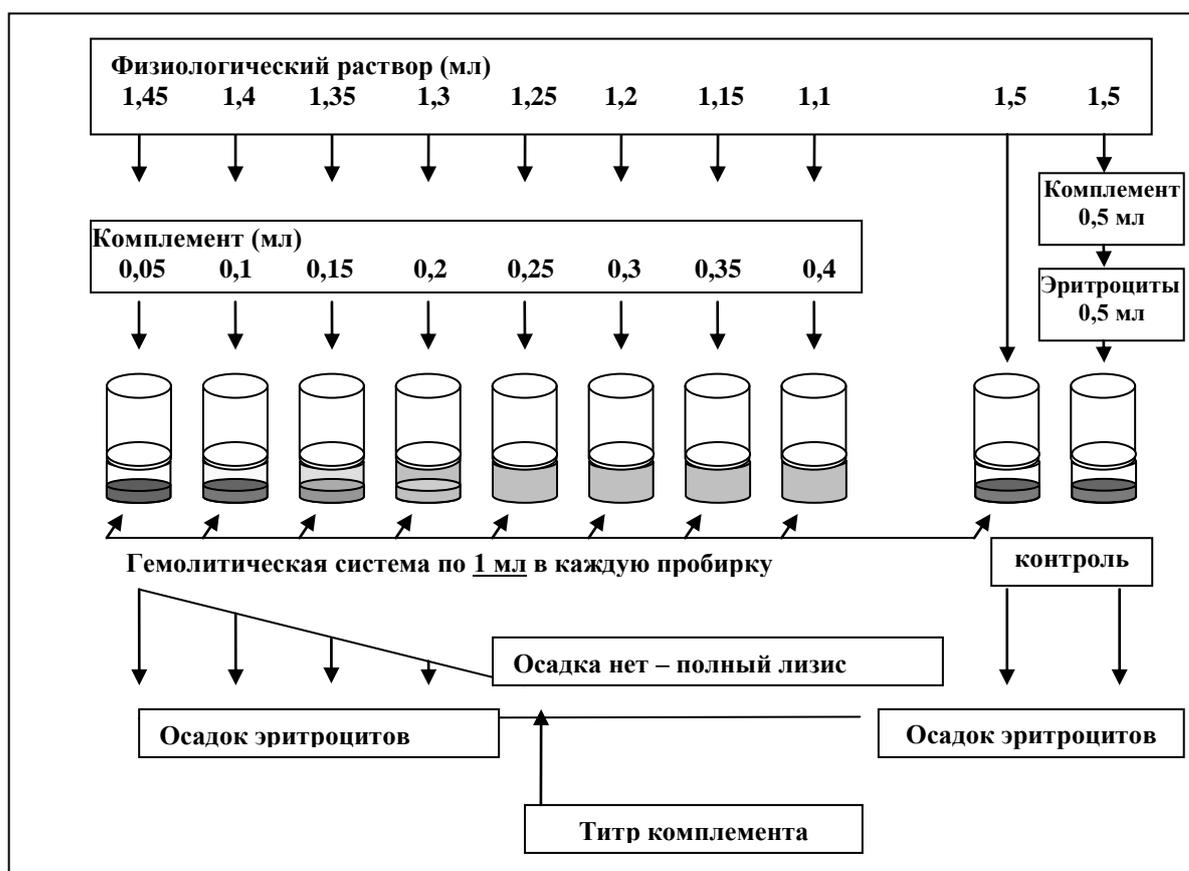


Рис.4. Принципиальная схема постановки РТК

Этот осадок уменьшается с возрастанием концентрации комплемента в пробирках – от 0,05 до 0,2 мл. В пробирке, где концентрация комплемента достигла значения 0,25 мл, происходит лизис всех эритроцитов и осадок их отсутствует. Именно данная концентрация комплемента и является титром комплемента.

Титр комплемента – это минимальная его концентрация (либо, другими словами, – его максимальное разведение), которая в течение 30 минут при температуре 37°С вызывает первый полный лизис эритроцитов барана, сенсibilизированных антителами кролика (т.е. гемолитической системы).

Особенно важно отметить, что регистрация первого полного лизиса имеет решающее значение, поскольку при дальнейшем возрастании концентрации комплемента лизис гемолитической системы будет наблюдаться всегда во всех последующих пробирках.

Как видно по рисунку 4, титр комплемента равен 0,25 мл. В реакции связывания комплемента впоследствии используют рабочую дозу комплемента, которая выше титра комплемента на 25%, т.е. 0,3 мл.

РТК выполняется с двумя контролями. Первый контроль: физиологический раствор + комплемент + сенсibilизированные эритроциты (без комплемента). Второй контроль: физиологический раствор + комплемент + эритроциты, не сенсibilизированные гемолитической сывороткой. В этих двух пробирках контроля гемолиза не наступает и наблюдается осадок эритроцитов.

Как уже было отмечено ранее, РТК ставится с диагностическими целями. Комплемент является неспецифическим фактором защиты макроорганизма, и его количество подвержено существенным колебаниям.

В ходе некоторых заболеваний концентрация комплемента в сыворотке крови больного может снижаться и при нормализации состояния стремится к нормальным величинам, что может быть использовано для оценки состояния организма.

Б. Реакция связывания комплемента (РСК)

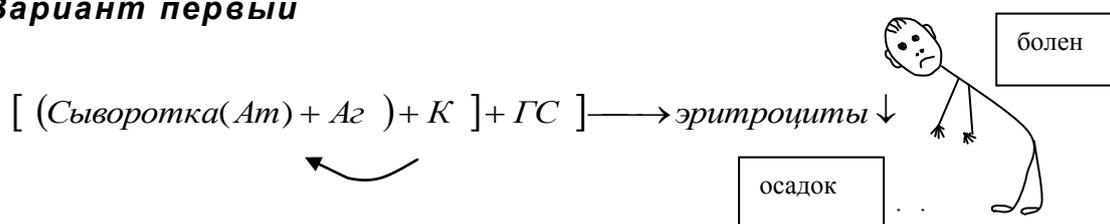
Для того чтобы быстро понять суть прохождения данной реакции и правильно трактовать ее результаты в дальнейшем, представим эту реакцию в виде двух формул, описывающих два разных состояния макроорганизма:

1) организм в процессе взаимодействия с инфекционным агентом (инфекционную болезнь)

2) организм, свободный от инфекции

Все это отражено на Рис.5.

Вариант первый



Вариант второй

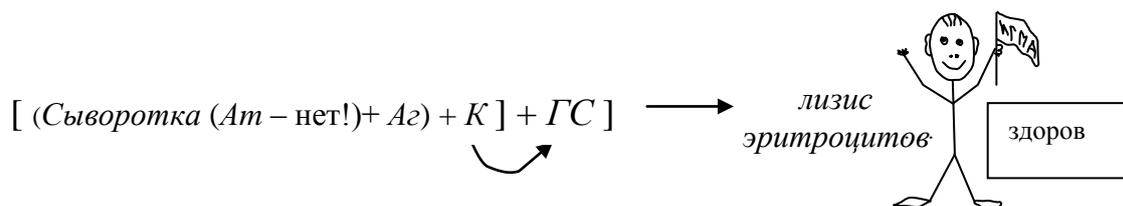


Рис.5. Принципиальная схема выполнения РСК

Вариант первый – **человек заведомо болен**. При попадании в макроорганизм чужеродного агента, обладающего индивидуальными для него антигенами (Аг), происходит постепенное накопление в сыворотке крови специфических антител (Ат). Однако эти антитела являются одновалентными, и при их взаимодействии с антигенами хотя и происходит образование комплекса антиген-антитело, данные комплексы остаются невидимыми. Для обнаружения этих комплексов используют комплемент (К) и гемолитическую систему (ГС). Вначале идет реакция между одновалентными антителами сыворотки и антигенами диагностикума, который добавляется к сыворотке, но поскольку антитела сыворотки одновалентны, то никакой видимой реакции не наступает. После этого добавляют комплемент (в рабочей дозе) и ставят в термостат на инкубацию при температуре 37°С на 2 часа.

Комплемент полностью расходуется на деструкцию образовавшегося комплекса антиген-антитело. И вновь этот процесс не дает никакой видимой реакции.

Затем добавляют гемолитическую систему и вновь инкубируют при аналогичных условиях. В данном случае эритроциты, входящие в гемолитическую систему, остаются интактными и впоследствии выпадают в осадок. **Человек болен:** в сыворотке его крови присутствуют одновалентные антитела – иммунный ответ на внедрение возбудителя.

Вариант второй – **человек заведомо здоров**. В сыворотке крови данного человека отсутствуют одновалентные антитела к конкретному возбудителю.

Добавляют комплемент и ставят на инкубацию как указано выше по варианту 1. Затем добавляют гемолитическую сыворотку и повторяют инкубацию при тех же условиях. Комплемент полностью уходит на лизис sensibilizированных эритроцитов гемолитической системы. В результате будет происходить лизис эритроцитов и появление «лаковой крови». Другими словами, комплемент вызывает лизис гемолитической системы (эритроциты барана, sensibilizированные антителами кролика).

Человек в данном случае – здоров!

Реакция Вассермана (РВ - RW)

Это разновидность реакции РСК с несколькими антигенами, предложенная фон Вассерманом и соавторами в 1906 году. Это РСК, в которой в качестве антигена был использован экстракт печени новорожденных с врожденным сифилисом. После работ Pangborn (19410, выделившего и очистившего кардиолипид, что в последующем позволило стандартизовать кардиолипид-лецитин-холестериновый антигенный комплекс, в РСК стали применять коммерческие препараты кардиолипидового антигена.

В реакции используют сыворотки крови пациентов, прогретые при 56°C для инактивации комплемента. Механизм реакции заключается в связывании реагиновых антител тестируемой сыворотки с кардиолипидным антигеном. Образовавшийся иммунный комплекс способен связывать дозированно добавленный в систему комплемент морской свинки. В качестве индикатора в реакцию вводится гемолитическая система (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка).

В случае связывания комплемента образовавшимся иммунным комплексом гемолиза не наблюдается (реакция положительная), а при наличии свободного комплемента в реакционной смеси вследствие отсутствия в исследуемой сыворотке реагинов наблюдается гемолиз эритроцитов (реакция отрицательная).

Для обозначения степени позитивности реакции Вассермана пользуются системой четырех плюсов: полная задержка гемолиза — 4+ (резко положительная реакция); значительная задержка гемолиза — 3+ (положительная реакция); частичная задержка гемолиза — 2+ (слабоположительная реакция); незначительная задержка гемолиза — 1+; сомнительная реакция — ±. Отрицательный результат реакции характеризуется полным гемолизом.

Реакция Вассермана (РВ) с кардиолипидным антигеном может быть поставлена в качественном и количественном (с различными разведениями сыворотки) вариантах. Количественную постановку используют для контроля за эффективностью терапии (снижение титра реагиновых антител — серонегативация). Кроме сыворотки крови, в РВ могут быть использованы образцы цереброспинальной жидкости. Для увеличения чувствительности РВ можно ставить на холоде.

РВ с кардиолипидным антигеном имеет недостаточно высокую чувствительность и специфичность:

- положительная приблизительно в 70% случаев при первичном сифилисе через 1—4 нед после появления шанкра;
- отрицательная почти у 30% пациентов с поздним (третичным) сифилисом;
- высокий процент ложноположительных реакций.

Постановка РСК сложна, требует подготовки сывороток (прогревание) и тщательной и трудоемкой подготовки исходных реагентов (титрование комплемента и гемолитической сыворотки, отмывка эритроцитов барана, разведение кардиолипидного антигена). Из-за сложности стандартизации реагентов, используемых в РВ, сама реакция трудно поддается стандартизации, характеризуется значительными трудозатратами. В связи с этим в большинстве зарубежных стран эту реакцию не используют в практике, заменив ее другими стандартными нетрепонемными тестами.

Несмотря на это, в России, как и в ряде других стран СНГ, РВ входит в стандартный комплекс реакций на сифилис и до сих пор используется в практике здравоохранения.

В. Реакция непрямо́й гемагглютинации (РНГА)

РНГА является своеобразной модификацией РА. Сущность реакции состоит в том, что молекулы антигена адсорбируются на поверхности эритроцитов. Такие «нагруженные» антигенами эритроциты приобретают способность агглютинироваться иммунной сывороткой, специфичной для данного антигена. Эритроциты склеиваются и выпадают в осадок, образуя на дне пробирки гемагглютинат. В последнее время РНГА получила широкое распространение благодаря высокой чувствительности, экспрессивности и простоте постановки.

В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных двукратных разведений сыворотки на физиологическом растворе. В предпоследнюю лунку вносят 0,5 мл заведомо положительной сыворотки и в последнюю – 0,5 мл физиологического раствора (контроли).

Затем во все лунки добавляют по 0,1 мл разведенного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и помещают в термостат на 2 часа. В положительном случае эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем «перевернутый зонтик», в отрицательном – оседают в виде «пуговки» или «колечка».

На эритроцитах можно адсорбировать не только антигены, но и антитела. В данном случае РНГА можно применять для индикации патогенных микробов во внешней среде. Для этого IgG сыворотки фиксируют на поверхности бараньих эритроцитов. Разрешающая способность экспресс-индикации антигенов составляет несколько тысяч микробных тел в 1 мл.

Г. Реакция тормо́жения гемагглютинации (РТГА)

Если на вирус воздействуют специфической сывороткой, то агглютинация эритроцитов не наступает. Это явление называется реакцией торможения гемагглютинации, протекающей в результате взаимодействия антигена и антитела.

Техника постановки реакции заключается в следующем. Сыворотку разводят от 1:10 до 1:2560. К каждому разведению сыворотки в объеме 0,25 мл добавляют равное количество жидкости, содержащей вирус в 4-кратном титре (если вирус, разведенный 1:640, агглютинирует равное количество жидкости, содержащей вирус в 4-кратном титре, делают разведение 1:160) и выдерживают в термостате 30 минут. После извлечения из термостата добавляют по 0,5 мл 1–2% взвеси эритроцитов. Контролем является пробирка, где сыворотка заменена физиологическим раствором.

Реакции гемагглютинации и торможения гемагглютинации широко применяют для диагностики вирусных болезней.

Д. Реакция коагглютинации (РКА)

Белок А некоторых штаммов золотистого стафилококка способен неспецифически адсорбировать на своей поверхности Fc-фрагменты иммуноглобулина G (за исключением IgG). Получившаяся молекула способна агглютинировать гомологичные антигены.

Помимо белка А, находящегося на поверхности клеток золотистого стафилококка, в реакциях антиген – антитело могут быть использованы другие носители, например, инертные – латекс, активированный уголь, бентонит, каолин и другие.

Е. Реакция латекс-агглютинации (РЛА)

Реакция основана на взаимодействии антигенов, присутствующих в образце, с частицами полистирольного латекса, нагруженными специфическими моноклональными антителами, что ведет к образованию видимых агрегатов.

Латексные частицы являются как бы искусственными эритроцитами, но они более устойчивы к внешним воздействиям. Каплю суспензии такого латекса прибавляют к капле исследуемой сыворотки и тщательно перемешивают.

При положительной реакции образуются мелкие, но хорошо видимые невооруженным глазом агглютинаты.

Ж. Реакция угольной агломерации (РУА)

Реакция выполняется аналогично реакции латекс-агглютинации, но вместо частиц полистирольного латекса используют мелкодисперсный уголь с адсорбированными на нем специфическими моноклональными антителами.

З. Реакция Кумбса

Эта реакция позволяет обнаруживать неполные антитела, блокирующие или тормозящие агглютинацию антителами.

Неполные антитела появляются при риккетсиозах по отношению к риккетсиям, при бактериальных инфекционных болезнях – к бактериям. Эти антитела соединяются с эритроцитами, бактериями или риккетсиями и препятствуют агглютинации последних.

Отсутствие выраженной агглютинации объясняется одновалентностью антител, которые не могут соединиться с двумя клетками. Добавление античеловеческой антиглобулиновой преципитирующей сыворотки ведет к появлению хорошо видимой агглютинации.

Антиглобулины представляют собой двухвалентные антитела, которые соединяются с двумя молекулами неполных антител, что и определяет агглютинацию эритроцитов, клеток бактерий или риккетсий.

Различают прямую и обратную реакцию Кумбса. В прямой реакции устанавливают наличие в крови больных антител, связанных с эритроцитами, а в непрямой – несвязанных антител в сыворотке больного.

Во втором варианте реакции (обратной реакции Кумбса) исследуемой сывороткой обрабатывают нормальные эритроциты, бактерии или риккетсии, а затем проводят реакцию аналогично прямой реакции Кумбса.

На рисунке 6 представлено выполнение поэтапно прямой и обратной реакций (этапы – 1-2 прямая реакция; этапы - 1-2-3 – обратная реакция).

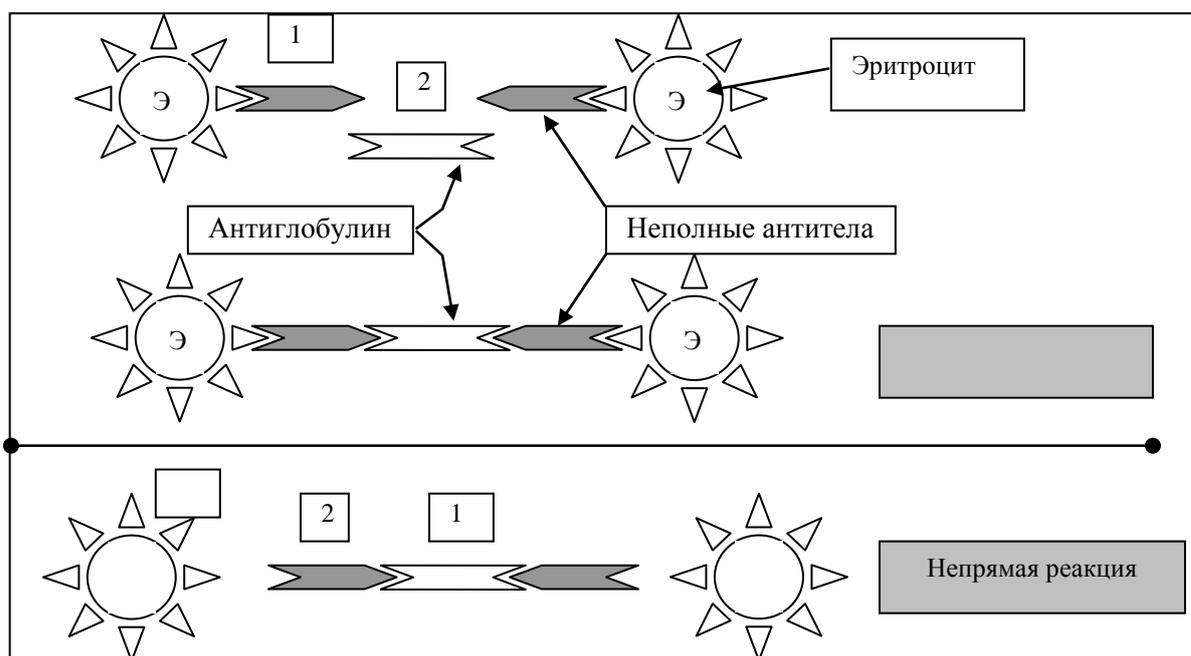


Рис.6. Поэтапное выполнение реакции Кумбса (прямой и обратной).

И. Феномен Исаева-Пфейффера

Данная реакция относится к реакциям с использованием комплемента, специфических антител к определенным антигенам – к реакциям лизиса. За исключением холерного вибриона и трепонем, большинство микробов проявляет устойчивость к литическому действию антител.

Поэтому реакция лизиса не нашла широкого применения в лабораторной практике. Реакция лизиса «феномен Исаева-Пфейффера» используется для диагностики холеры и из-за парадоксального результата – (гибель контроля) – она и получила свое название. Обычно во всех экспериментах и реакциях контрольное животное остается интактным к воздействию фактору и именно оно остается в живых.

Реакцию проводят на двух морских свинках по схеме выполнения,

представленной на рисунке 7.

После внутрибрюшинного введения всех компонентов через каждые 20 минут у животных берут перитонеальную жидкость. Для этого в нижней части живота делают прокол кожи или надрезают ее скальпелем.

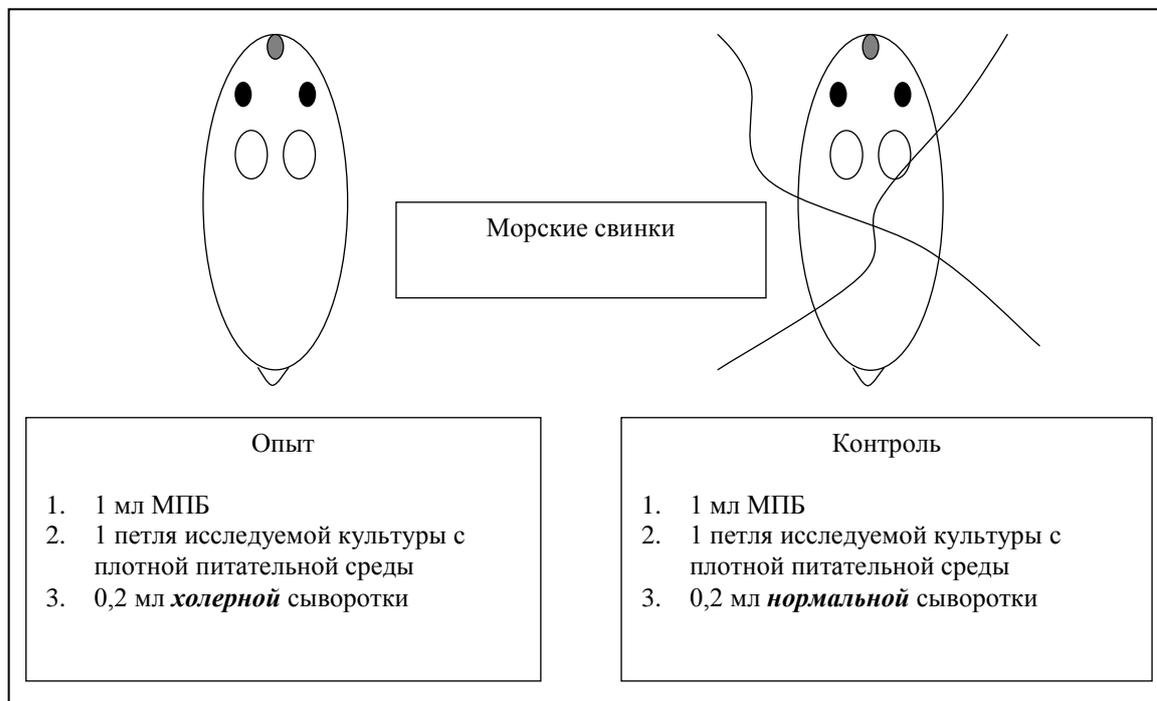


Рис. 7. Схема проведения реакции Исаева-Пфелфера

Из этой жидкости делают препараты-мазки или препараты «висячая капля». Если изучаемый вибрион является холерным, то в препаратах сначала у вибрионов прекращается движение, затем появляются овальные клетки, потом шары и, наконец, наступает полное растворение клеток.

У контрольной свинки вибрионы не изменяются, они сохраняют подвижность, а количество их может даже увеличиться.

В дальнейшем контрольное животное погибает, а опытное остается живым. **Феномен!**

Всегда у нас контрольное животное остается живым, а здесь — наоборот!

К. Реакция Райта

Реакцию Райта ставят с целью диагностики бруцеллеза. Реакцию ставят в начале 2-й недели, т.е. в период накопления антител. В качестве диагностикума используют взвесь, окрашенную генцианфиолтовым или метиленовым и содеожашую в 1 мл 1 млрд. бруцелл, убитых формалином или фенолом.

Техника постановки этой реакции аналогична реакции агглютинации

для диагностики туляремии, за исключением того, что сыворотку и антиген разводят 0,85% раствором NaCl, содержащим 0,5% раствор фенола. Пробирки помещают в термостат на 18 – 20 часов, а затем оставляют при комнатной температуре на 2 часа. Результат агглютинации обозначается плюсами. Реакция оценивается положительной при титре 1:200 (не менее ++) и сомнительной – при титре 1:50. Реакция Райта может быть положительной у привитых и у больных туляремией. Поэтому ее ставят повторно, учитывая нарастание титра.

Л. Опсонофагоцитарная проба

Опсонины — группа термостабильных и термолабильных факторов сыворотки крови, обуславливающих прикрепление частиц к поверхности фагоцитов и повышающих скорость и эффективность фагоцитарной реакции.

Опсонины (от греч. orpson – пища) – это антитела нормальных и иммунных сывороток, изменяющие микроорганизмы и подготавливающие их к более быстрому и интенсивному фагоцитированию.

В нормальной сыворотке содержится небольшое количество опсононов, которые проявляют свое действие в присутствии комплемента. В иммунной сыворотке опсононов больше и их активность в меньшей степени зависит от комплемента.

Под воздействием опсононов происходит изменение поверхности микробных тел, в частности их электрического потенциала, и благодаря этому они в дальнейшем легко подвергаются фагоцитозу.

Наиболее важным термолабильным опсононом является C₃v-фрагмент комплемента, образующийся при активации системы комплемента по классическому и альтернативному путям. C₃v и др. термолабильные опсонины (α -1 и β -глобулины) присутствуют в свежей сыворотке интактных и иммунных людей и животных, действие их мало специфично.

C₃v утрачивает активность под влиянием прогревания при 56° 30 мин, а также при хранении, обработке ядом кобры, инкубации с иммунными комплексами, некоторыми бактериями и частицами.

В первую фазу опсонизации молекулы C₃v оседают на поверхности чужеродных частиц, во вторую частица прикрепляется к фагоцитарным клеткам и захватывается ими.

Прилипание частиц происходит в присутствии двухвалентных катионов на C₃v-рецепторах мембраны полинуклеаров и мононуклеаров. Рецепторы к C₃v-фрагменту комплемента разрушаются протеолитическими ферментами, не ингибируются антимакрофагальными антителами.

Термостабильная опсоническая активность сыворотки крови связана главным образом с антителами, относящимися к IgG₁ и IgG₃, но, вероятно, в ней принимают участие IgM, а также агрегаты IgA₁ и IgA₂.

В первую фазу этого варианта опсонизации антитела с помощью активных центров прикрепляются к детерминантным группам антигенов частиц.

Во вторую фазу опсонизированные антитела частицы посредством Fc-конца антител присоединяются к Fc-рецепторам макрофагов. Fc-рецепторы резистентны к протеолитическим ферментам, одинаково активно взаимодействуют с антителами в присутствии и в отсутствие двухвалентных катионов при 37 и 4°C.

Скорость и прочность аттракции частиц к макрофагам зависит от концентрации и авидности антител. Инкубация фагоцитарных клеток с антисыворотками к ним и к Fc-фрагментам IgG блокирует Fc-рецепторы фагоцитов.

На Fc-рецепторах фагоцитарных клеток адсорбируются не только одиночные частицы, но и их микроагглютинаты.

Опсоническая активность антител в присутствии C_{3b} компонента резко увеличивает силу сцепления частиц с фагоцитами, и, следовательно, ведет к более быстрому и эффективному их захвату.

Другой путь опсонизации состоит в прикреплении частиц к поверхности макрофагов, на которых содержатся цитофильные антитела, близкие по ряду признаков к свободным опсоническим антителам.

Образовавшийся на поверхности макрофага (у нейтрофилов цитофильных антител нет) иммунный комплекс, кроме того, активирует комплемент по классическому пути, что еще более усиливает прилипание.

Обеспечение прилипания частиц к поверхности фагоцитов важная, но не единственная функция опсопинов. Все больше накапливается фактов, свидетельствующих об активном участии опсопинов в процессах захвата и переваривания частиц.

Опсоно-фагоцитарную пробу используют при диагностике бруцеллеза, сыпного тифа и других болезней.

Выявление повышения содержания опсопинов в сыворотке дает возможность судить об эффективности вакцинации или применения терапевтических препаратов.

В диагностике инфекционных болезней выполняют определение опсонического индекса (ОИ), опсоно-фагоцитарного индекса (ОФИ) и титра опсопинов (ТО).

ОИ характеризует степень активности опсопинов. Он представляет собой отношение фагоцитарного показателя иммунной сыворотки к фагоцитарному показателю нормальной сыворотки (см. ниже).

$$\text{Опсонический индекс (ОИ)} = \frac{\text{Фагоцитарный показатель иммунной сыворотки}}{\text{Фагоцитарный показатель нормальной сыворотки}} > 1$$

Фагоцитарный показатель – среднее количество микроорганизмов, поглощенных одним фагоцитом, при подсчете группы из 100 фагоцитов.

Для определения ОИ исследуемый и контрольный образцы крови инкубируют 15 мин в смеси со стандартным количеством тест частиц (обычно грамотрицательных бактерий).

Из каждой пробы готовят мазки, фиксируют их жидким фиксатором, окрашивают метиленовой синькой или по Романовскому-Гимза.

Подсчитывают число фагоцитарных частиц в 100 фагоцитах, находят фагоцитарные числа обеих проб и устанавливают ОИ.

ОФИ в отличие от ОИ отражает состояние и изменение опсонических свойств, вызванные антителами и комплементом, и фагоцитарной активности лейкоцитов больного к специфическому возбудителю.

Методика постановки и учета ОФИ при разных заболеваниях различна (визуальная, культуральная, изотопная).

При визуальном варианте в пробирку с 0,25 мл 2% раствора цитрата натрия добавляют 0,5 мл крови больного и 0,25 мл гретой суточной агаровой культуры возбудителя заболевания плотностью 1 млрд/мл (по кишечному стандарту). Смесь инкубируют 30 мин при 37°, а затем поступают так, как при определении ОИ.

Титр опсоинов (ТО) количественно характеризует силу опсонической активности по отношению к специфическому возбудителю. В отличие от ОФИ здесь исключается влияние изменений со стороны фагоцитов, т.к. в опыт берут лейкоциты или макрофаги здорового человека.

Суждение о ценности всех вышеуказанных тестов противоречиво, что в основном вызвано трудоемкостью и несовершенством методик и слабым соответствием их современным представлениям об опсоинах и протекании процесса опсонизации.

III. ИМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНЫХ АНТИТЕЛ ИЛИ АНТИГЕНОВ

А. Метод флуоресцирующих антител (МФА)

Данный метод является экспрессным и высокочувствительным. Существуют две его разновидности. При прямом методе к исследуемой взвеси микробов, фиксированной на стекле, добавляют сыворотку, меченную флуорохромом (для этой цели используют обычно изотиоцианат флуоресцеина – *сокращ.* ФИТЦ). Образующийся комплекс антиген–антитело при освещении ультрафиолетовыми (сине-фиолетовыми) лучами дает ярко-зеленое свечение.

При непрямом МФА используют обычные диагностические сыворотки против какого-либо вида микробов. Добавление этой сыворотки к испытуемой взвеси микробов вызывает образование комплекса антиген–антитело. Этот комплекс выявляется с помощью универсальной флуоресцирующей сыворотки, содержащей антитела γ -глобулиновой фракции крови того вида животного, от которого была получена диагностическая сыворотка.

Для образования комплекса антиген - антитело препарат помещают во влажную камеру при 37°C, затем тщательно промывают дистиллированной или водопроводной водой от несвязавшихся антител. Светящийся комплекс выявляют при люминесцентной микроскопии.

Люминесцентная микроскопия позволяет не только удостовериться наличие микроорганизма и оцепить его морфологию, но и выяснить, в каких клеточных структурах микроорганизм локализован, что чрезвычайно важно для клинической диагностики.

Непрямой МФА можно использовать и для выявления антител в сыворотке крови. Для этого на стекло наносят взвесь эталонного микроорганизма, после фиксации его на стекле и промывания наносят капли сыворотки крови в определенных разведениях. После промывки наслаивают люминесцирующую сыворотку против глобулиновой фракции сывороточных белков крови человека.

В последние годы в качестве флуоресцентной метки используют положительно заряженные ионы редкоземельных металлов – лантанидов (европий, самарий, тербий и др.), которые обладают гораздо более длительной флуоресценцией и большим стоксовским сдвигом. Все это позволяет снизить количество ложноположительных результатов.

Б. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод независимо друг от друга разработали в начале 70-х годов прошлого века шведские исследователи *Энгвалл* и *Перлманн*, голландские *ван Вемен* и *Шуур* и американские ученые под руководством *Рубинштейна*. В настоящее время ИФА является наиболее широко распространенным

иммунологическим методом. Принцип ИФА аналогичен непрямому варианту МФА (см. выше), но имеет ряд отличий:

- 1) антитела или антигены фиксируются не на стеклах, а на внутренней поверхности синтетических планшетов для иммунологических реакций;
- 2) в качестве метки используется не флюорохром, а фермент (пероксидаза, щелочная фосфатаза, уреаза и др.);
- 3) реакция учитывается не под микроскопом, а визуально, после добавления в лунку субстрата для данного фермента.

Для объективной оценки результатов ИФА используют специальные фотометры с вертикальным ходом лучей.

В настоящее время созданы многочисленные модификации базовой методики ИФА, и наибольшее распространение получил анализ, который выполняется на твердой фазе (поверхности). Существуют различные варианты твердофазного ИФА – прямой и конкурентный.

Прямой твердофазный ИФА (Рис.8).

В связи с тем, что данный метод получил широкое распространение для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний, рассмотрим детально оба варианта.

Этапы выполнения обоих вариантов сходны:

Этап 1: сыворотку инкубируют с антигеном, фиксированном на твердом субстрате (чаще всего это пластиковая иммунологическая микропланшетка).

Этап 2: после инкубации антитела, не связавшиеся с антигеном, закрепленном на поверхности твердой фазы, удаляют многократным промыванием.

Этап 3: вносят меченную ферментом антисыворотку к антителам, связавшимся с антигеном.

Этап 4: оценка результатов: определяют количество фермент-маркера, который связан с антителами.

Конкурентный твердофазный ИФА (Рис.9 и 10)

Существует в двух вариантах: с Ат-позитивной сывороткой (т.е. в ней есть специфические антитела к антигену, фиксированному на поверхности твердой фазы микропланшетки) (см. рис.9) и с Ат-негативной сывороткой (в ней нет специфических антител к исследуемому антигену) (см. рис. 10).

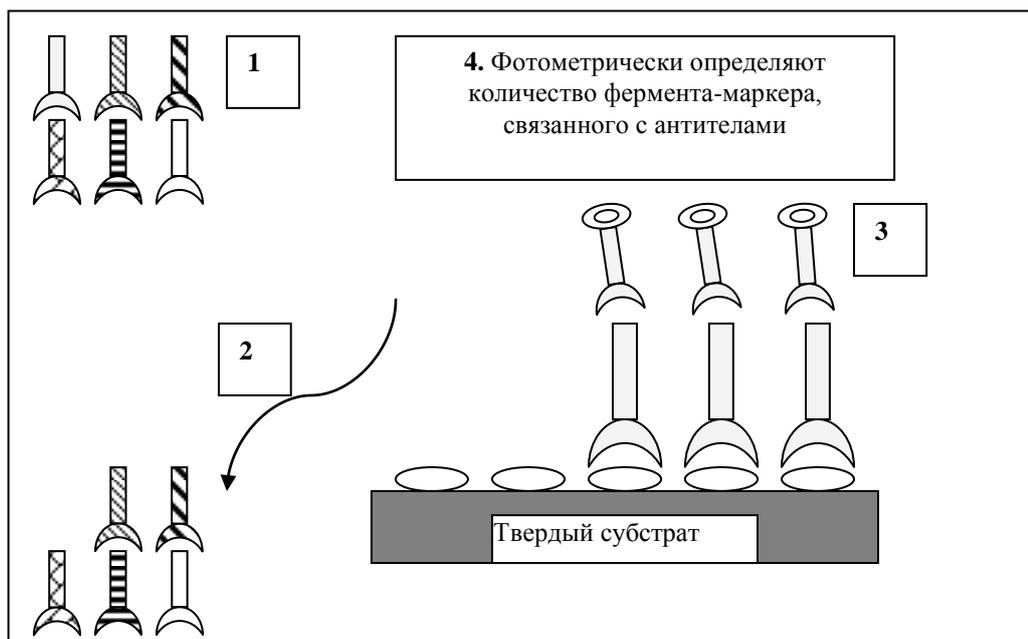


Рис. 8. Схема выполнения прямого твердофазного ИФА

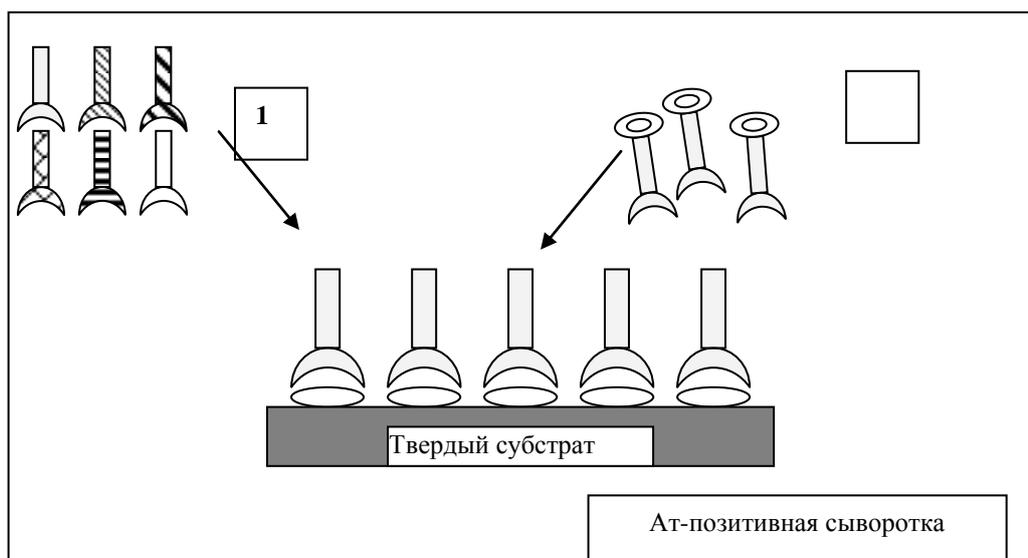


Рис.9. Конкурентный твердофазный ИФА (вариант Ат-позитивная сыворотка)

1. Специфичные Ат в исследуемой сыворотке связывают Аг, фиксированный на твердом субстрате.
2. Специфичные Ат, меченные ферментом, не взаимодействуют со связанным Аг – содержание маркера низкое.

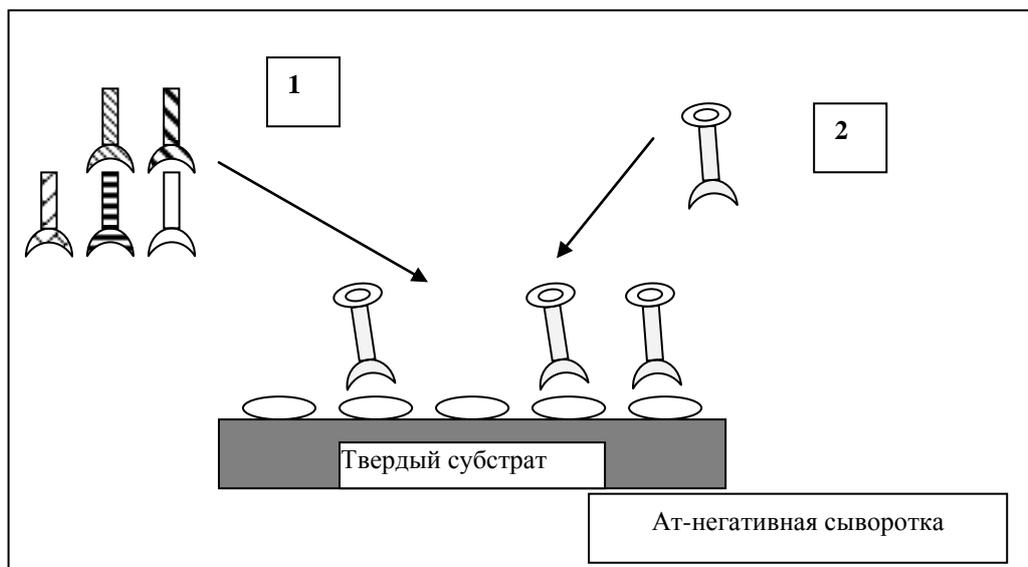


Рис.10. Конкурентный твердофазный ИФА
(вариант Ат-негативная сыворотка)

1. Неспецифичные Ат в исследуемой сыворотке не связывают Аг, фиксированные на твердом субстрате.
2. Специфичные Ат, меченные ферментом, взаимодействуют со связанным Аг – содержание маркера высокое.

По сравнению с классическими методами выявления антигенов метод ИФА позволяет непосредственно регистрировать их взаимодействие с антителами, а не анализировать вторичные его проявления – агглютинацию, преципитацию или гемолиз. Метод отличается высокой чувствительностью – от 70% до 90% и более для различных возбудителей.

В. Радиоиммунный анализ

Принцип анализа аналогичен ИФА, но в качестве метки используют не фермент, а радиоактивный изотоп.

Для определения антигенов и антител разработаны многочисленные варианты иммунологического анализа, которые предусматривают использование меченных различным образом реактивов.

Радиоактивное мечение изотопом ^{131}J , а в последнее время все чаще ^{125}J – многократно проверенный и надежный метод. Однако реактивы, используемые в радиоиммунном анализе, нестабильны в результате радиоактивного распада и опасны для здоровья лабораторного персонала.

Имунорадиометрическое определение антигена отличается от радиоиммунологического тем, что используются изотопы меченого реагента.

Для определения антигена твердую поверхность, например пластиковую, нагружают антителами и добавляют исследуемый раствор.

После отмывания количество антигена, связанного с пластиком, можно определить, добавляя избыток радиоактивно меченных антител.

Специфичность метода повышается при использовании твердофазных меченых антител, направленных к разным участкам антигена.

Антигены в сложной смеси могут быть идентифицированы методом иммуноблоттинга.

Метод иммуноблоттинга

Иммуноблоттинг (иммуноблот) - высокоспецифичный и высокочувствительный референтный метод, подтверждающий диагноз для пациентов с положительными или неопределенными результатами анализов, полученных в т.ч. при помощи РПГА или ИФА.

Метод переноса пятен ДНК первоначально разработал Сазен (Southern) - фамилия означает ЮЖНЫЙ; метод получил название сазенблоттинг (южный перенос).

Метод переноса фрагментов ДНК называют нозенблоттинг (северный перенос), а метод переноса фрагментов белка - вестернблоттинг (западный перенос).

Иммуноблоттинг (иногда называемый вестернблоттинг от английского Western - западный) - это метод исследования белковых антигенов. Белки микроорганизмов, связанные так или иначе с клеточной стенкой, после разделения их сложной смеси методом электрофореза в полиакриламидном или агарозном геле можно перенести из геля на микропористую нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану инкубируют в растворе антител и связанные антитела выявляют с помощью радиоизотопного или ферментного методов с помощью меченых антител.

Если белки антисыворотки разделить изоэлектрофокусированием, а затем перенести их на мембрану (блоттинг – от англ. *blotting* - получение реплики (отпечатка) контактным способом, перенос (вещств) промоканием, нанесение пятен), то с помощью меченого антигена можно установить и так называемый спектротип антисыворотки, т.е. определить изотип антител, взаимодействующих с данным антигеном.

Поэтапная схема выполнения иммуноблоттинга

Антигены возбудителя разделяют с помощью **электрофореза** в полиакриламидном геле, затем переносят их (блоттинг - от англ. blot, пятно) из геля на активированную бумагу (1) или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью **ИФА**. Фирмы выпускают такие полоски с "блотами" антигенов*. На эти полоски наносят сыворотку больного (2). Затем, после инкубации, отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченую ферментом (3).

Образовавшийся на полоске комплекс [антиген + антитело больного + антитело против Ig человека] выявляют добавлением хромогенного субстрата (4), изменяющего окраску под действием фермента (Рис. 13).

Этот метод выявления антител к отдельным антигенам возбудителя основан на постановке ИФА на нитроцеллюлозных мембранах, на которые в виде отдельных полос нанесены специфические белки, разделенные геле-электрофорезом.

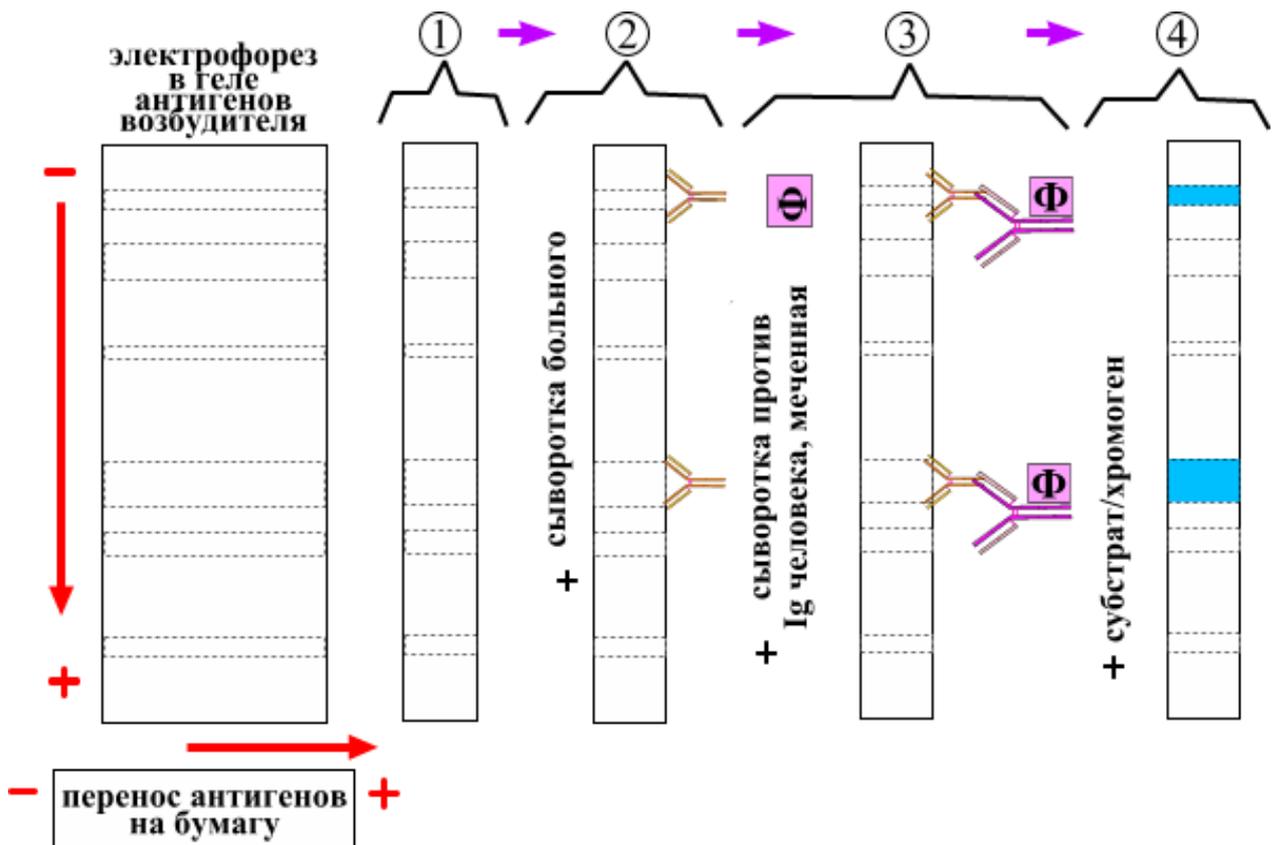


Рис 13. Поэтапная схема иммуноблоттинга.

Если имеются антитела против определенных антигенов - появляется темная линия в соответствующем локусе стрипа.

Уникальность иммуноблота заключается в его высокой информативности и достоверности получаемых результатов.

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ГЕНОИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

Данные методы используются для выявления РНК и ДНК возбудителей как вирусных, так и бактериальных инфекций. Наиболее распространены методы гибридизации ДНК и РНК.

Принцип метода обусловлен способностью ДНК (и РНК) специфически соединяться (гибридизироваться) с комплементарными фрагментами искусственно созданных нитей ДНК (и РНК), меченных изотопами или ферментами (пероксидазой или щелочной фосфатазой). В дальнейшем образцы исследуют методом ИФА (см. выше).

Бурное развитие молекулярной биологии привело к тому, что были разработаны различные методы гибридизации фрагментов ДНК (и РНК), например, лигазная цепная реакция, Q- β -система, реакция NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) и др.

Реакция NASBA как минимум в 100 раз чувствительнее ПЦР. Она может быть использована не только для диагностики инфекционных агентов, но и для контроля эффективности применяемой антибактериальной терапии.

Однако в настоящее время наибольшее распространение и практическое применение нашла полимеразная цепная реакция.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР широко применяется в практической работе: это - диагностика инфекционных заболеваний со сложной серологической картиной, в том числе вызванных агентами, трудно поддающимися культивированию; мониторинг эффективности терапии; генотипирование микроорганизмов, оценка их вирулентности и изменчивости в эпидемиологических исследованиях; определение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам; исследование генетических заболеваний; генетическая дактилоскопия и другие направления. Это далеко не полный перечень направлений диагностической медицины, где с успехом применяется ПЦР.

Теоретические основы метода ПЦР и рекомендации по его постановке

ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификацию) специфического участка ДНК осуществляемую ферментом ДНК-полимеразой.

Принцип метода ПЦР был сформулирован Гобинд Корана в 1971. Кэри Мюллис (К.Mullis, фирма «Cetus», США) в 1983г впервые провел его и запатентовал (Патент США #4,683,202). В 1993 году К. Мюллису была присуждена Нобелевская премия).



Рис. 11. Вручение Кэри Мюллису Нобелевской премии по химии 1993 г.

В настоящее время ПЦР стала всеобъемлющим методом. Одной из важнейших областей применения ПЦР является идентификация патогенных организмов, являющихся возбудителями заболеваний людей, животных или растений.

ПЦР – это эффективный способ получения большого количества специфических нуклеотидных последовательностей *in vitro*.

В основе метода лежит многократное копирование (репликация) с помощью фермента ДНК-полимеразы заведомо выбранного исследователем из известной нуклеотидной последовательности определенного фрагмента ДНК, который является маркерным, т.е. уникальным для данного вида возбудителя.

С внедрением этого метода отпала необходимость выделять и чистить ДНК-мишень, и даже очень небольшой по объему необработанный материал может быть подвергнут детекции.

Механизм репликации таков, что достраивание нитей может начаться не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках – коротких двунитевых участках. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют затравки (праймеры),

представляющие собой специально химически синтезированные *in vitro* олигонуклеотиды.

Праймеры комплементарны последовательностям на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что синтез ДНК, осуществляемый ДНК-полимеразой, протекает только между ними.

В результате происходит экспоненциальное увеличение количества копий специфического фрагмента по формуле 2^n , где n – число циклов амплификации (увеличения).

Поскольку праймеры входят в состав амплифицируемого фрагмента, его размер определяется количеством олигонуклеотидных пар амплифицируемой последовательности и праймера. Обычно размер фрагмента составляет несколько сотен нуклеотидных пар. Амплификация последовательности в более чем миллион раз достигается в результате трехэтапного циклического процесса.

Основными компонентами ПЦР являются:

- 1) два синтетических олигонуклеотидных праймера (20 нуклеотидов каждый), комплементарные районам, находящимся на противоположных нитях и фланкирующим искомую мишенную последовательность ДНК;
- 2) искомая последовательность ДНК в образце любой природы, в частности клинической пробе;
- 3) термостабильная ДНК-полимераза, которая может выдержать нагревание до 95°C и выше;
- 4) четыре дезоксирибонуклеотида, необходимых для синтеза ДНК, комплементарной искомому фрагменту.

Открытие термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы термофильных бактерий *Thermis aquaticus*), оптимум работы которой находится в области $70\text{--}72^{\circ}\text{C}$, позволило проводить процесс репликации ДНК в *in vitro* в циклическом режиме.

При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов получить достаточное количество ДНК-копий для их идентификации.

Метод ПЦР используют и для определения специфических участков генома РНК-содержащих вирусов. Здесь сначала получают ДНК-копию с РНК-матрицы, используя реакцию обратной транскрипции (RT), осуществляемую ферментом ревертазой (обратной транскриптазой), а затем проводят стандартные процедуры ПЦР.

Каждый цикл амплификации состоит из 3-х этапов, протекающих в различных температурных режимах (см. рис.11):

1 этап: тепловая денатурация ДНК (расплетение двойной спирали). Протекает при 93–95°C в течение 30-40 секунд. Кроме исходной ДНК в реакционной пробирке содержится избыточное количество двух нуклеотидных праймеров,

2 этап: присоединение праймеров (отжиг). Присоединение праймеров (синтетических олигонуклеотидов, размером 15–30 нуклеотидных пар) происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50–65°C. Время отжига 20-60 секунд.

3 этап: достраивание цепей ДНК (синтез). Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Процесс синтеза производится ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Тақ-полимеразой) и проходит при температуре 70–72°C. Время протекания синтеза 20–40 секунд.

Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей (см. Рис.12).

Таким образом, происходит накопление ампликонов в растворе по формуле 2^n , где n – число циклов амплификации. Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК, то за 30–40 циклов в растворе накапливается около 10^8 молекул ампликона.

Процесс амплификации проводится в амплификаторе, который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур, согласно числу циклов амплификации.

Амплифицированный специфический фрагмент ДНК выявляют обычно методом электрофореза в 1,5–2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Бромистый этидий (очень сильный мутаген!) образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290–330 нм.

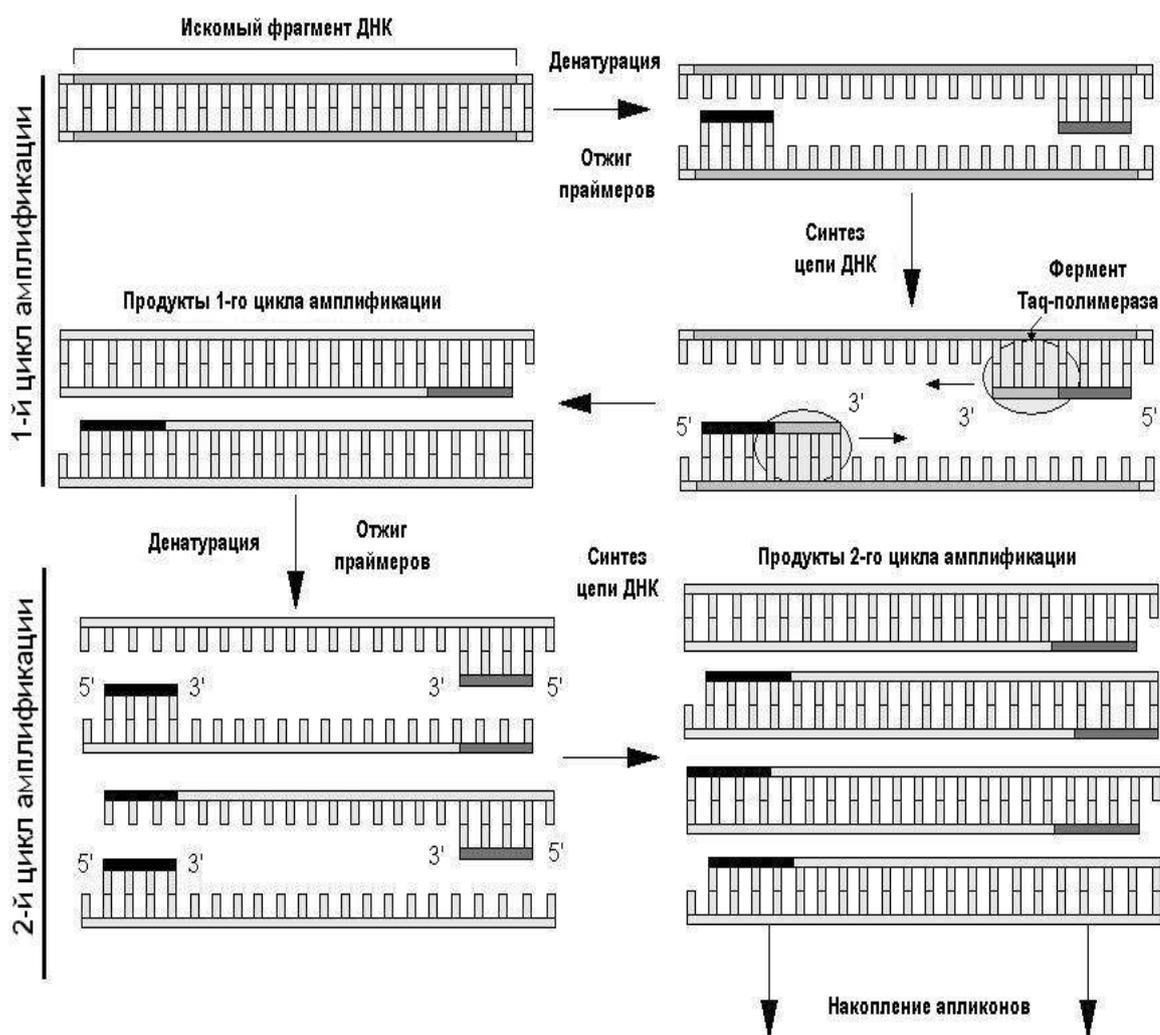


Рис. 12. Поэтапная схема проведения ПЦР (по рисунку компании «Вектор-Бест»)

Ещё одним из вариантов детекции (обнаружения) продуктов амплификации является метод гибридизационного ИФА.

Детекция ампликонов проводится на планшете для ИФА с предварительно иммобилизованной специфической ДНК-последовательностью.

Полученный на стадии ПЦР ДНК-ампликон, синтезированный с использованием биотинилированных праймеров, гибридизуется со специфической ДНК в лунках планшета.

В результате биотинилированный ампликон ДНК из проб связывается с планшетом. Биотин связывается со стрептавидин-пероксидазным конъюгатом.

В каждой лунке измеряется ферментативная активность пероксидазы, которая пропорциональна количеству ДНК в пробе. Для определения активности пероксидазы используются субстраты по методике ИФА.

В настоящее время в практическое здравоохранение внедряется новая технология ПЦР метода – ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR).

Ее принципиальной особенностью является мониторинг и количественный анализ накопления продуктов ПЦР непосредственно в ходе амплификации; автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

ПЦР в реальном времени не требует стадии электрофореза. Мониторинг и регистрация результатов происходит при закрытых пробирках путем считывания флуоресцентного сигнала прямо в амплификаторе.

Это позволяет снизить требования, предъявляемые к обустройству ПЦР-лабораторий и практически исключить ложноположительные результаты, полученные за счет контаминации ампликонами.

ПЦР-метод в клинической лабораторной диагностике является не заменой традиционных морфологических, биохимических или иммунологических методик, но их существенным и необходимым дополнением.

Рекомендации по проведению ПЦР - анализа.

Исследуемым материалом для ПЦР могут служить соскобы эпителиальных клеток, кровь, сыворотка, плевральная и спинномозговая жидкости, моча, мокрота, слизь, биоптаты и другие биологические образцы.

Поскольку есть вероятность разрушения ДНК или РНК в клиническом материале, срок хранения материала желательно свести к минимуму. Хранение любого клинического материала возможно не более 2 суток при температуре +4°C.

При отсутствии возможности доставить образцы в ПЦР - лабораторию в течение 2 суток, материал следует заморозить и хранить при -20°C. Замороженные образцы хранятся в течение года. Допускается только однократное кратковременное замораживание-оттаивание материала.

Раствор выделенной ДНК (РНК) можно хранить в течение недели при температуре +2°C и 1 год при температуре -20°C.

При проведении выделения ДНК/РНК, а также амплификации, необходимо соблюдать регламент, описанный в инструкции к соответствующему набору.

Результат исследования оценивают по наличию в анализируемой пробе фрагмента ДНК, бенд которого располагается на том же уровне, что и бенд контрольного препарата ДНК.

Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу большей или меньшей интенсивности.

В дорожке, соответствующей отрицательному контрольному образцу не должно быть специфической положительной полосы, но должна присутствовать полоса внутреннего контроля.

ПЦР, хотя и является высокочувствительной и специфичной реакцией, также может давать иногда ошибочные результаты.

Результаты анализа не учитываются, если:

- ***В дорожке любого отрицательного контроля выявляется специфическая полоса.*** Это может быть обусловлено контаминацией реактивов и проб положительной ДНК или продуктами амплификации положительной ДНК в процессе работы. Для проверки реактивов необходимо поставить не менее трех отрицательных контролей на этапе выделения ДНК и столько же на этапе постановки ПЦР для выявления источника контаминации. Если результат повторяется, необходимо сменить реактивы.

- ***В дорожке положительного контроля не выявляется специфическая полоса.*** Это может быть обусловлено неправильной работой амплификатора или порчей отдельных компонентов реакционной смеси.

Требования по организации работ в ПЦР-лабораториях сформулированы в «**Методических рекомендациях по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции**» (1995, Госэпиднадзор).

В настоящее время все больше лабораторных реакций в микробиологии используются для оценки иммунного статуса человека. Оценка иммунного статуса базируется на реакциях, которые были уже рассмотрены ранее.

Дальнейшее развитие этих лабораторных реакций позволяет достичь прорыва в представлениях об особенностях протекания тех или иных заболеваний человека, поскольку в основе большинства заболеваний человека пусковым этиологическим фактором является инфекционный агент.

Лигазная цепная реакция (ЛЦР)

В основе метода лежит способность специфического фрагмента ДНК-зависимой ДНК-лигазы восстанавливать фосфодиэфирные связи в одноцепочечных разрывах двуцепочечных молекул ДНК в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} в условиях *in vitro*.

При постановке ЛЦР, включающей последовательные циклы лигирования, используются две пары олигонуклеотидных зондов, комплементарных друг другу и исходно выбранному фрагменту ДНК-матрицы. На первом этапе происходит гибридизация двух пар олигонуклеотидных зондов с ДНК-матрице при температуре $+65^{\circ}C$ в присутствии термостабильной ДНК-лигазы, а также всех необходимых

кофакторов и ионов. Гибридизированные зонды разделены друг от друга одноцепочечным разрывом. При этом 3'-конец предшествующего нуклеотида должен содержать свободную 3'-ОН-группу, а в 5'-положении 5'-конца олигонуклеотида, следующего за ним, должна находиться фосфатная группа. Затем происходит лигирование (сшивание) олигонуклеотидов в месте их соединения с образованием более длинного продукта, связанного с ДНК-матрицей. После лигирования продукт реакции, представляет собой 1 цепочку ДНК-мишени. Затем реакцию подвергают денатурации (нагревание до 94°C). Происходит отделение лигированного продукта от матрицы, при последующем охлаждении процессы гибридизации и лигирования повторяются.

В ходе последовательных циклов лигирования уже со второго лигазного цикла реакции в реакционной смеси начинает накапливаться продукт, который представляет собой лигированный дунитевой фрагмент ДНК, полностью идентичный по структуре используемым праймерам.

В настоящее время ЛПЦ имеет только ретроспективное научное значение. Чувствительность и специфичность сопоставимы с ПЦР.

NASBA тест

NASBA-тест (от англ. Nucleic acid sequence based amplification)– это современная методика диагностирования и наблюдения за терапией разнообразных заболеваний, которые передаются половым путем (сокр. ЗППП), и некоторых других вирусных заболеваний.

Основу методики составляет амплификация молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК) возбудителей заболеваний, при участии ферментов обратной транскриптазы, РНК-полимеразы и РНК-азы, в отличие от ПЦР-диагностики (Полимеразной Цепной Реакции), при осуществлении которой обнаруживается ДНК. NASBA-тест был разработан Дж. Комптоном в 1991 году.

Особенности и преимущества

При помощи NASBA-теста можно обнаружить лишь живые клетки, в которых синтезируется рибонуклеиновая кислота в процессе их жизнедеятельности. В противоположность РНК, молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) довольно стабильна и не разрушается после гибели микроорганизмов, поэтому анализ (ПЦР-диагностика) может иметь положительный результат в связи с существованием мертвых клеток агента и даже их разрушенных элементов. А РНК разнится от ДНК тем, что она очень нестабильна, после гибели возбудителя довольно быстро разрушается, в связи с чем, ее определение становится невозможным. Это имеет особенную актуальность после проведения терапии или при существовании сомнений. К примеру, если ПЦР-диагностика совершается не ранее, чем через три-четыре недели после

окончания лечения, то NASBA-тест берется через пять-семь дней. Хотя молекулы РНК могут быть также амплифицированы с помощью ПЦР-диагностики с использованием обратной транскриптазы (в целях синтеза комплементарной цепи ДНК в качестве матрицы), основным преимуществом NASBA-теста является то, что он осуществляется в изотермических условиях - обычно при постоянной температуре 41 °С.

NASBA-тест имеет отличительную особенность – очень высокую чувствительность. Всего на одной цепочке дезоксирибонуклеиновой кислоты синтезируется большое количество РНК-молекул, которые в последующем принимают участие в биосинтезе белков в клетках. В связи с этим, число молекул РНК многократно превышает количество ДНК, что существенно облегчает их обнаружение. Это позволяет диагностировать болезнь на самых начальных стадиях, а также в случае вялотекущих хронических реакций, когда не существует выраженных клинических симптомов. Обнаружение в режиме реального времени продуктов амплификации (NASBA-Real-time) с помощью флуоресцентных зондов еще больше увеличивает специфичность методики и объективный характер результатов диагностики.

Принцип метода NASBA основан на изотермической транскрипционной амплификации молекул РНК на матрице образующихся в процессе реакции промежуточных молекул ДНК. Реакция поддерживается каталитической активностью трех ферментов - AMV-RT (обратной транскриптазы вируса миобластомы птиц), РНКазы-Н и Т7-РНК полимеразы, с участием четырех типов нуклеотидов, двух синтетических олигонуклеотидных праймеров, каждый из которых комплементарен специфическому для выявляемого микроорганизма участку 16S рибосомальной РНК. Один из праймеров содержит промоторную область, необходимую для инициации транскрипции ферментом Т7-РНК полимеразой. При температуре 41°С в буферном растворе происходит гибридизация одного из праймеров с участком одноцепочечной молекулы рибосомальной 16S РНК и синтез с помощью AMV-RT цепи кДНК. После образования РНК-ДНК гибрида РНКазы-Н удаляет цепь РНК, а к оставшейся ДНК цепи гибридизуется второй специфический праймер, после чего AMV-RT достраивает вторую цепь ДНК с образованием активного промотора для Т7-РНК полимеразы. Далее с помощью Т7-РНК полимеразы происходит синтез молекул РНК транскриптов, каждая из которых включается в новый раунд амплификации с образованием новой генерации РНК транскриптов. В итоге, в растворе накапливается до 10¹⁰ молекул РНК-продуктов транскрипционной амплификации. При гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов НАСБА реакция, как и в случае с ПЦР, проводится в присутствии флуоресцентно-меченных специфических олигонуклеотидных ДНК-зондов. В случае реакции НАСБА это – «молекулярные маячки» («molecular beacons»), имеющие последовательность, которая комплементарна специфическому РНК-транскрипту и две короткие

фланкирующие последовательности, комплементарные друг другу. С накоплением специфических РНК-транскриптов флуоресцентные зонды гибридизуются с ними с появлением флуоресцентного сигнала. Как и в случае с ПЦР, регистрация флуоресцентного сигнала проводится либо по конечной точке, либо в режиме реального времени в соответствующих приборах.

Метод MALDI TOF

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, матрично-ассоциированная лазерная десорбция/ионизация) – ионизация вещества с помощью матрицы и лазерного излучения.

До конца 80'х годов считалось, что макромолекулы невозможно без разрушения ионизировать и перевести в газовую фазу, то есть подготовить к масс-спектрометрическому анализу. Разработка метода MALDI решила эту проблему.

Работы Коичи Танака (Рис. 14) легли в основу современных методик быстрой идентификации белков, ДНК, других биологических макромолекул, дали возможность развития глобальных биотехнологических программ (протеомика, метаболомика, гликомика и др.).

MALDI TOF не требует предварительного разделения анализируемых веществ. Отсутствие фрагментации белков в процессе ионизации, а также формирование преимущественно однозарядных ионов сделало возможным анализ сложных смесей, таких как тотальные клеточные экстракты.



Рис. 14. Коичи Танака лауреат Нобелевской премии в области химии за разработку метода мягкой ионизации MALDI в 2002 году.

В процессе развития MALDI TOF масс-спектрометрии пришло понимание того, что эту технологию можно применять для типирования микроорганизмов.

Многочисленные исследования показывают, что бактерии и грибки обеспечивают специфичные и воспроизводимые масс-спектры.

Для практической реализации этой технологии и внедрения ее в клиническую практику была разработана экспертная система SARAMIS™, конечным результатом работы которой является экспрессная и надежная идентификация микроорганизмов.

SARAMIS™ – (Spectral ARchive And Microbial Identification System) экспертная система на основе базы масс-спектрограмм интактных микроорганизмов (В 2007 году на SARAMIS™ был получен Европейский патент № EP1253622).

Предназначена для типирования микроорганизмов на основании их масс-спектров.

В настоящее время накоплена информация в базе данных, позволяющая идентифицировать более 5600 видов микроорганизмов из 260 родов, включая вирусы, бактерии и грибы.

Анализ начинается с того, что на подложке масс-спектрометра смешивают биоматериал из колонии бактерий и специальную химическую матрицу чаще – это 2',5'-дигидроксибензойная кислота.

После этого образец помещают в прибор и подвергают воздействию наносекундных лазерных импульсов.

При этом молекулы матрицы и аналита (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд (Рис. 15).

Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам.

Программное обеспечение прибора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектры анализируются экспертной системой SARAMIS™, и на основании сведений о массах характеристических белков происходит идентификация микроорганизмов.

Для идентификации используются белки, присутствующие в клетке в неизменной концентрации независимо от внешних обстоятельств (температуры и времени инкубации, типа питательной среды).

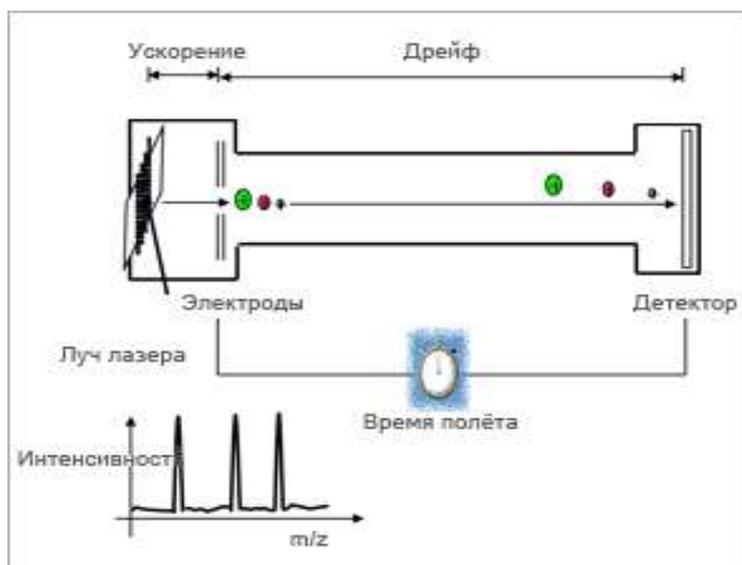
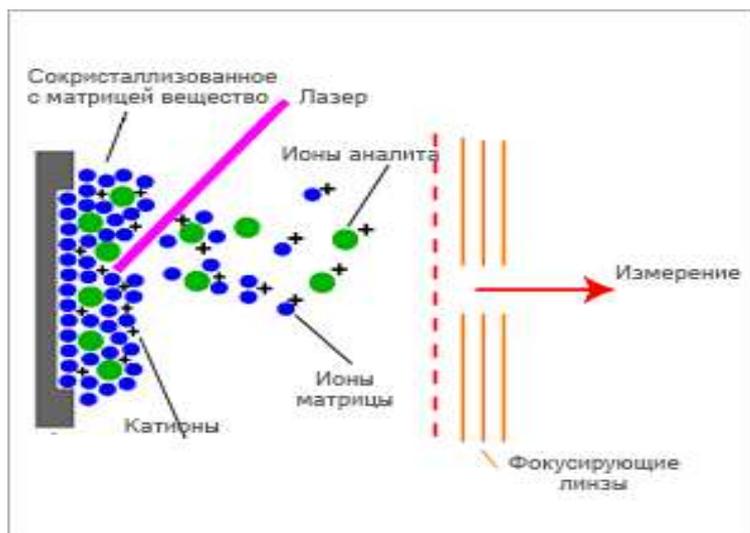


Рис. 15 принцип работы MALDI TOF.

Достоинства микробиологического анализатора

Достоверное определение 96 микроорганизмов и вирусов в одной пробе за 35 минут (в будущем будет расширено до 170).

Пробоподготовка не превышает 2-х часов и одинакова для любых типов биологических образцов.

Общие временные затраты на идентификацию 200 образцов с учетом пробоподготовки составляют около часа.

При этом себестоимость одной идентификации составляет около 3-5 рублей, что в 100-50 раз дешевле аналогичного анализа на автоматическом бактериологическом анализаторе и в 10 раз дешевле конкурентных масс-спектрометрических систем по идентификации.

Знакомство с методами (лабораторными реакциями) оценки иммунного статуса организма человека (ВОЗ, 1993).

А. Определение специфических антител к микробным антигенам, аутоантигенам, аллоантигенам, аллергенам.

Б. Иммунохимические исследования: количественная и качественная оценка иммуноглобулинов, их фрагментов, иммунных комплексов в плазме и биологических жидкостях, определение цитокинов и растворимых рецепторов для цитокинов в плазме и биологических жидкостях, продуктов эффекторных клеток и воспалительных реакций, компонентов комплемента, белков острой фазы, других белков.

В. Клеточные исследования. Определение субпопуляций лимфоцитов и фенотипических маркеров, характеризующих изменение функционального состояния клеток, клональности лимфоидных клеток, функциональной активности лимфоцитов *in vitro*, пролиферативного ответа, продукции иммуноглобулинов, определение цитотоксичности лимфоцитов и других эффекторных клеток, оценка функциональной активности макрофагов, нейтрофилов, тучных клеток, базофилов, эозинофилов.

Г. Иммуногистологические исследования.

Д. Иммуногенетические исследования: HLA-типирование с помощью серологической и молекулярно-биологической технологии, фенотипическое и генотипическое определение аллотипов сывороточных белков, пренатальная диагностика и наследование генетически детерминированных дефектов иммунной системы.

В реальной практике для оценки иммунного статуса выполняется первичный скрининг иммунной системы и постановка тестов для уточнения характера иммунных нарушений.

Набор методов для первичного скрининга иммунной системы (тесты 1-го уровня) обычно включает определение популяций и субпопуляций лимфоцитов по кластерам дифференцировки (CD₃ Т-лимфоциты, CD₄ Т-хелперы, CD₈ - цитотоксические Т-киллеры/супрессоры, CD₁₆ - естественные киллеры, CD₁₉ В-клетки и т.д.) методами цитофотометрии или иммунофлюоресцентного анализа, определение содержания иммуноглобулинов классов А, М, G с помощью метода радиальной иммунодиффузии по Манчини или нефелометрическими методами, уровня циркулирующих иммунных комплексов спектрофотометрическим методом, показателей фагоцитоза.

Эти исследования позволяют выявить нарушения в основных звеньях иммунитета (гуморальном, клеточном, фагоцитарном). С учетом анализа результатов тестов 1 уровня определяют дальнейшую тактику иммунологического исследования.

Уточняющие методы (тесты 2-го уровня), требующие специальной аппаратуры, реактивов и обученного персонала, позволяют оценить функции клеток иммунной системы, вспомогательных клеток, продукцию цитокинов и т.д.

Методы исследования главных компонентов иммунной системы принято делить также на *скрининговые и развернутые*.

При оценке В - системы иммунитета к скрининговым тестам относятся : определение количества CD₁₉⁺ и CD₂₀⁺ клеток, IgG, IgM и IgA, а также IgG_{1,2,3,4}, к развернутым- бласттрансформацию на митоген лаконоса и *S.aureus*, поверхностных маркеров В - лимфоцитов.

При оценке Т - системы иммунитета к скрининговым методам можно отнести кожные тесты на бактериальные антигены, определение поверхностных маркеров Т - лимфоцитов CD₃, CD₄, CD₈, бласттрансформацию на фитогемагглютинин, к развернутым - изучение продукции цитокинов, активационных маркеров, Т - клеточных рецепторов.

При оценке фагоцитоза к скрининговым тестам относят определение количества нейтрофилов, изучение их морфологии и образования активных форм кислорода, к развернутым - определение киллинга микробов, лизосомальных ферментов, цитокинов.

Существующие методы оценки иммунного статуса постоянно совершенствуются, однако есть ряд общих правил, которых необходимо придерживаться при оценке *иммунограмм*:

- комплексный анализ, а не оценка одного показателя;
- анализ в комплексе с клиническими и анамнестическими данными;
- оценка резких сдвигов показателей (не менее 20% от нормы);
- анализ в динамике;
- анализ не только (и не столько) абсолютных данных, а соотношений показателей (особо - индекс Th/Ts);
- учет возможных индивидуальных особенностей (возраст, сопутствующие заболевания) и колебаний показателей (физиологических и патологических - прием пищи, физические нагрузки, время суток, действие стрессоров и т.д.);
- учет региональных норм;
- учет материально - технической базы лаборатории.

На вооружении современной лаборатории - проточные цитометры и другое оборудование, которое позволяет наиболее точно и подробно определить иммунный статус (лазерная проточная цитофлюориметрия).

Методы исследования лимфоцитов можно разделить на *изучение поверхностных маркеров и функциональные тесты*.

Изучение поверхностных СД антигенов основывается на:

- методах розеткообразования;

- методах иммунофлюоресценции;
- иммуноферментном анализе.

Для определения *количества Т - клеток* чаще используют метод розеткообразования с эритроцитами барана. Метод основан на родстве рецептора CD₂ с белками мембраны эритроцитов барана.

При смешивании лимфоцитов с эритроцитами барана образуются фигуры в виде розеток. Количество розеткообразующих клеток (Е - РОК) соответствует количеству Т- лимфоцитов (CD₂+ клеток).

Для определения *количества В - клеток* используют ЕАС - розетки. Лимфоциты смешивают с эритроцитами быка, обработанными комплементом и антителами к эритроцитам.

Важнейшее значение имеет вычисление индекса CD₄/CD₈ (хелперно - супрессорного отношения). Необходимо учитывать, что нет единого метода для оценки Т - хелперов и Т - супрессоров.

CD₈+ несут Т - супрессоры и Т - киллеры, часть НК - клеток.

CD₄+ несут Т - хелперы и Т - индукторы, моноциты, эффекторы - Т-клетки ГЗТ.

Поэтому оценку Ts и Th осуществляют также в теофиллиновом тесте. Т - супрессоры в присутствии теофиллина теряют способность к Е - розеткообразованию (теофиллин - чувствительные Т - лимфоциты), Т - хелперы теофиллин - резистентны. Оценивают также субпопуляции Т - лимфоцитов с рецепторами для Fc фрагмента: IgM (Т - мю) и IgG (Т - гамма). Т - гамма это преимущественно хелперы, Т мю - супрессоры.

К функциональным тестам относят методы оценки пролиферативной активности лимфоцитов на Т - и В - митогены (РБТЛ - реакция бластной трансформации лимфоцитов), продукции антител, синтеза мононуклеарами *цитокинов (особо!)*.

Для объективизации и стандартизации данных иммунологических исследований используется специальная аппаратура (иммуноферментные анализаторы, спектрофотометры и фотоэлектроколориметры, счетчики радиоактивности, лазерные нефелометры и проточные цитофлюориметры, хемилуминометры).

Преимущества иммунологических методов заключаются в том, что эти методы весьма чувствительны и специфичны.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЫ

Заражение лабораторных животных имеет большую историю и значимость, особенно при контрольном применении иммунных сывороток. Нередко у животных развивается характерная клиническая картина для данного заболевания.

Основная цель подобных манипуляций — ускорение бактериологических исследований и прогнозирование развития инфекционного процесса у человека при контакте с данным возбудителем инфекционной природы.

А. Животные. Для диагностики различных инфекций используют различных животных, т.н. они проявляют видовую восприимчивость к различным этиологическим агентам.

- 1. Мыши** чувствительны к пневмококкам, нейссериям, пастереллам, клостридиям, листериям, возбудителям сибирской язвы, туляремии, чумы, ботулизма, столбняка, коклюша и мелиоидоза.
- 2. Крысы** чувствительны к возбудителям туберкулёза (бычьего типа), мелиоидоза и др.
- 3. Морские свинки** чувствительны к возбудителям туберкулёза (человеческого типа), дифтерии, сапа, чумы, бруцеллёза, туляремии, холеры, газовой гангрены, ботулизма, псевдотуберкулёза и др.
- 4. Кролики** чувствительны к стафилококкам, стрептококкам, нейссериям, *Mycobacterium bovis*, возбудителям газовой гангрены, сибирской язвы, ботулизма, столбняка и др.
- 5. Кошки.** Их заражают стафилококками, дизентерийными амёбами, возбудителями сапа, коклюша и др.
- 6. Обезьяны.** Их заражают шигеллами, листериями, сальмонеллами, возбудителями мелиоидоза, коклюша и др.
- 7. Птицы.** Кур и голубей используют для диагностики туберкулёза (птичьего типа), пастереллёза, риносклеромы и др.

Б. Техника проведения. Для проведения биологических проб следует использовать только здоровых стандартизованных животных с определённой массой тела и одного возраста.

Инфекционный материал вводят внутрь, в дыхательные пути, внутрибрюшинно, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно и подкожно, в переднюю камеру глаза, через трепанационное отверстие черепа, субокципитально (в большую цистерну головного мозга).

У животных прижизненно забирают кровь, экссудат из брюшины, после гибели — кровь, кусочки различных органов, спинномозговая жидкость, экссудат из различных полостей.

1. При диагностике инфекций, обусловленных действием токсина (например, ботулизма или сибирской язвы), материал, предположительно содержащий возбудитель и токсин, помещают в физиологический раствор, а затем фильтруют через бумажные фильтры, натёртые тальком (последний хорошо адсорбирует токсин). Смывами с фильтров заражают чувствительных животных.
2. При диагностике инфекций, обусловленных различными патогенными свойствами самого возбудителя, подопытных животных заражают микробной взвесью.

Несмотря на сложности при постановке биопроб на животных, связанных с этической проблемой, выполнение экспериментов такого рода крайне необходимо для определения токсического воздействия отдельных биологических агентов, оценки качества полученных антитоксических сывороток и ускорения диагностики инфекционных заболеваний бактериальной природы.

Прогностическое значение проведения биопроб на животных также важно для оценки возможного воздействия как самих инфекционных агентов, так и их дериватов на человеческий организм.

В связи с этим, можно констатировать факт, что полного отказа от лабораторных реакций, связанных с постановкой биопроб на животных, в обозримом будущем скорее всего не будет.

Бактериофаги

Выделение бактериофага

Для выделения бактериофага из объектов окружающей среды (фекалии, вода и др.) готовят фильтрат исходного материала. Например, 3 – 5 г фекалий тщательно размешивают в 50 мл мясотептонного бульона (МПБ) и полученную взвесь инкубируют в термостате при 37⁰С 18 – 20 ч. После этого взвесь освобождают от грубых нерастворимых путем фильтрования или центрифугированием. Освобождение фага от микроорганизмов достигается фильтрованием осветленной взвеси через бактериальные фильтры, они задерживают все бактерии, а фаги проходят через поры фильтров.

В полученном фильтрате обнаружение бактериофага производят путем посева этого фильтрата с соответствующей культурой бактерий в жидкую питательную среду. Для этого берут пробирки с МПБ вносят 4 – 6 часовую культуру бактерий, гомологичную выделяемому фагу, питательную среду помещают в термостат и спустя 2 – 3 ч добавляют исследуемый фильтрат. Через 12 – 18 ч инкубирования учитывают результат.

Определение специфичности бактериофага

Метод Отто. Расплавленный 3% мясотептонный агар (МПА) разливают в стерильные чашки Петри, охлажденные чашки подсушивают в термостате в течение 15 мин. Чашки засевают методом газона бактериальной культурой. Далее на поверхность питательной среды наносят каплю известного фага, чашку наклоняют и дают капле стечь. Чашки инкубируют 18 ч и учитывают результат. Если фаг гомологичен и биологически активен, то по пути стекания капли роста бактерий не будет, среда остается прозрачной.

Метод Фюрта. В 15 – 30 мл МПБ вносят 0,5 мл фекалий (воды) и помещают в термостат при температуре 37⁰С на 20 ч. На следующий день этот МПБ фильтруют и заливают 1,5% МПА, охлажденным до 45 – 50⁰С. Фильтрат тщательно перемешивают с агаром, выливают в стерильную чашку Петри; когда агар застынет, среду подсушивают. Дно чашки делят на сектора (8 – 10) и на каждый сектор сеют штрихом одну бульонную культуру. Через 18 – 24 ч инкубирования учитывают результат. Если в исследуемом фильтрате содержится бактериофаг, то гомологичный микроорганизм не будет расти на питательной среде. На тех же секторах питательной среды, куда нанесли микробную культуру, гетерологичную бактериофагу, будет нормальный рост бактерий.

В модификации Фишера дно чашки с агаром по Фюрту на 30 квадратов. В центр каждого квадрата вносят петлей испытуемые бульонные культуры. Чашки помещают в термостат на 18 – 20 ч и учитывают результат.

Методы титрования бактериофага

Титром бактериофага называют то его максимальное разведение, при котором данный бактериофаг способен лизировать гомологичную микробную культуру.

Метод серийных разведений (Аппельмана). Испытуемый фильтрат или известный бактериофаг разводят в 10 раз МПБ. Для этого берут 10 пробирок с 4,5 мл МПБ в каждой. В первую пробирку вносят 0,5 мл исследуемого фага, содержимое пробирки тщательно перемешивают. Из этой пробирки 0,5 мл переносят в следующую и т.д. Таким путем делают десятикратное разведение фага (10^{-1} – 10^{-8}). В каждую пробирку приготовленного ряда вносят по одной капле соответствующей бульонной культуры. Для контроля берут две пробирки с МПБ, в одну из которых вносят 0,5 мл исследуемого фага (контроль на отсутствие бактерий в исследуемом фаге), а в другую – одну каплю микробной культуры (контроль культуры).

Все пробирки помещают в термостат на 18 ч. Титр фага определяют по наибольшему разведению препарата, в котором обнаруживается литическая активность.

Метод агаровых слоев (Грациа). Расплавленный 0,7% МПА разливают в стерильные чашки Петри, охлажденные чашки подсушивают в термостате в течение 15 мин. Берут 0,7% МПА в пробирках по 2,5 мл в каждой, расплавляют его на водяной бане и охлаждают до 45 – 50⁰С. В стерильную пробирку вносят 0,1 мл 1 – миллиардной взвеси эталонной суточной культуры и добавляют 1 мл соответствующего разведения исследованного фага, тщательно смешивают, добавляют 2,5 мл расплавленный 0,7% МПА, еще раз тщательно перемешивают и содержимое пробирки выливают в чашку с МПА (вторым слоем). Смесь равномерно распределяют по поверхности агара и оставляют чашку до полного охлаждения (40 – 50 мин). Через 18 – 24 ч инкубирования учитывают результат. На фоне равномерного роста микробов отмечаются пятна, где рост отсутствует, что обусловлено лизисом микробной культуры в результате действия фага. При большом количестве фага наступает лизис бактерий по всей поверхности агара. Если же фагов невелико, то участков лизиса будет мало, их можно сосчитать и, допускается, что каждый участок

образуется в результате действия одного фага, рассчитать количество активных фагов в 1 мл препарата.

Допустим, что на агаре в чашке имелось 30 пятен лизиса при исследовании фильтрата в разведении 10^{-7} . Следовательно, титр фага равен $3 \cdot 10^{-8}$, т.е. в 1 мл фага содержится $3 \cdot 10^8$ активных фагов.

Метод Грация служит важнейшей частью методики постановки реакции нарастания титра фага.

Тестовые задания (Блок самоконтроля)

1. Серологические реакции подразумевают использование
 - а. нормальных сывороток
 - б. иммунных сывороток
 - в. особо чистых реактивов
 - г. реактивов с большим сроком годности
 - д. цельной крови
2. Титр агглютинирующей сыворотки – это...
 - а. максимальное разведение сыворотки
 - б. минимальное разведение сыворотки
 - в. максимальное разведение антигена
 - г. минимальное разведение антигена
 - д. оптимальное соотношение сыворотки и антигена
3. Титр преципитирующей сыворотки – это...
 - а. максимальное разведение сыворотки
 - б. минимальное разведение сыворотки
 - в. максимальное разведение антигена
 - г. минимальное разведение антигена
 - д. оптимальное соотношение сыворотки и антигена
4. Реакция агглютинации по типу Грубера ставится с целью:
 - а. определения титра антител
 - б. определения титра антигенов
 - в. идентификации неизвестного антигена (возбудителя) с помощью заведомо известных антител (сывороток)
 - г. идентификации неизвестных антител (сывороток) с помощью заведомо известных антигенов (возбудителя)
 - д. экспресс-диагностики возбудителя инфекционного заболевания
5. Реакция агглютинации по типу Видаля ставится с целью:
 - а. определения титра антител
 - б. определения титра антигенов
 - в. идентификации неизвестного антигена (возбудителя) с помощью заведомо известных антител (сывороток)
 - г. идентификации неизвестных антител (сывороток) с помощью заведомо известных антигенов (возбудителя)
 - д. экспресс-диагностики возбудителя инфекционного заболевания

6. Реакция Асколи в медицинской и ветеринарной практике используется для обнаружения антигенов следующего возбудителя:

- а. сибирская язва
- б. чума
- в. брюшной тиф
- г. сыпной тиф
- д. СПИДа

7. Назовите виды иммуномикробиологических методов исследования, основанные на прямом взаимодействии антигена с антителом:

- а. реакция агглютинации
- б. реакция преципитации
- в. реакция гемагглютинации
- г. реакция иммобилизации
- д. все указанные варианты реакций

8. Диагностикум – это взвесь в физиологическом растворе заведомо известных микробных тел, сохранивших свою...

- а. морфологию
- б. иммуногенность
- в. вирулентность
- г. антигенность
- д. специфичность

9. В реакции преципитации участвуют...

- а. крупнодисперсные (корпускулярные) антигены
- б. гибридомы
- в. анатоксины
- г. мелкодисперсные (молекулярные) антигены
- д. эритроциты

10. Реакция флоккуляции – это...

- а. взаимодействие антител с агглютининами
- б. взаимодействие антигенов с аллергенами
- в. помутнение в экспериментальной пробирке, содержащей смесь токсина (анатоксина) и антитоксина
- г. помутнение в экспериментальной пробирке, содержащей смесь токсина (анатоксина) и антигена
- д. экспресс-реакция идентификации микробного возбудителя

11. Какие разновидности реакции по типу Грубера существуют?
- а. определяющая, развернутая
 - б. ориентировочная, утверждающая
 - в. контрольная, опытная,
 - г. ориентировочная, развернутая
 - д. ориентировочная, диагностическая
12. Каким способом изготавливается преципитирующая сыворотка?
- а. синтетическим путем
 - б. с помощью гипериммунизации животных
 - в. с помощью генной инженерии
 - г. химическим путем
 - д. комбинированным путем
13. Что называют феноменом флоккуляции?
- а. помутнение в пробирке, содержащей смесь токсина (анатоксина) и антитоксина (антитоксической сыворотки)
 - б. оседание эритроцитов
 - в. лизис эритроцитов
 - г. «кольцо преципитации»
 - д. радиальную преципитацию
14. Реакция Кумбса применяется с целью ...
- а. установления отцовства
 - б. выявления антигенов в крови
 - в. обнаружения неполных антител
 - г. выявления специфических антител
 - д. обнаружения токсинов в крови
15. Основные свойства комплемента
- а. белковая природа
 - б. представлен ферментами
 - в. присутствует только в активной (иммунной) сыворотке
 - г. разрушается при нагревании
 - д. неоднороден по антигенному строению
16. Реакция Кастеллани ставится с целью ...
- а. идентификации (обнаружения) антигенов с помощью известных антител
 - б. идентификации (обнаружения) антител с помощью известных антигенов
 - в. «истощения» групповых антител
 - г. обнаружения преципитинов

- д. обнаружения агглютининов
17. При постановке реакции агглютинации необходимо иметь:
- а. неспецифические факторы защиты
 - б. комплемент
 - в. диагностикум
 - г. антиген в коллоидном состоянии
 - д. лабораторное животное
18. Гемолитическая сыворотка ...
- а. получается при иммунизации лабораторного животного эритроцитами животного другого вида
 - б. вызывает гемолиз эритроцитов
 - в. используется для лечения инфекционных заболеваний
 - г. используется для профилактики инфекционных заболеваний
 - д. применяется в реакции Кумбса
19. Реакция Кумбса
- а. обнаруживает двухвалентные антитела
 - б. позволяет обнаруживать неполные антитела, блокирующие или тормозящие агглютинацию антителами
 - в. обнаруживает эритроциты
 - г. позволяет установить титр комплемента
 - д. позволяет обнаружить аллергены в крови
20. Реакция Кумбса
- а. разновидность реакции по типу Грубера
 - б. разновидность реакции по типу Видаля
 - в. устанавливает наличие преципитинов
 - г. существует в двух разновидностях (прямая и обратная)
 - д. проводится на лабораторном животном (*in vivo*)
21. Реакция гемолиза
- а. происходит с лизисом эритроцитов
 - б. является индикаторной
 - в. имеет диагностическое значение
 - г. выполняется с нормальной сывороткой
 - д. требует обязательного наличия комплемента
22. Определите реакцию, при проведении которой используются лабораторные животные...
- а. по типу Грубера
 - б. по типу Видаля
 - в. Оухтерлони
 - г. РСК

- д. Исаева-Пфейфера
23. При взаимодействии одновалентных антител с антигенами обязательно будет видимый осадок - ...
- а. да
 - б. нет
 - в. только при наличии античеловеческой сыворотки
 - г. только при наличии эритроцитов
 - д. только при наличии античеловеческой сыворотки и эритроцитов
24. Укажите реакции геноиндикации инфекционного агента...
- а. РСК
 - б. РТГА
 - в. ПЦР
 - г. лигазная цепная реакция
 - д. РНГА
25. Лабораторные реакции с выполнением биопроб на животных ...
- а. незаконны
 - б. выполняются в настоящее время
 - в. не выполняются в настоящее время
 - г. ускоряют бактериологические исследования
 - д. ускоряют микологические исследования
26. Метод иммуноблоттинга позволяет определить...
- а. наличие белков микроорганизмов, неспецифически связанных с клеточной стенкой
 - б. изотип антител, взаимодействующих с данным антигеном
 - в. вид микроорганизма
 - г. патогенность микроорганизма
 - д. вирулентность микроорганизма
27. В основе метода ПЦР лежит ...
- а. многократное копирование (репликация) с помощью фермента ДНК-полимеразы маркерного фрагмента ДНК
 - б. очистка ДНК мишени
 - в. взаимодействие специфических антител с антигенами
 - г. обнаружение гемолитической системы
 - д. обнаружение перекисных соединений
28. Что такое опсоины?
- а. антигены нормальных и иммунных сывороток
 - б. антитела нормальных и иммунных сывороток
 - в. специальные маркеры фагоцитоза

- г. активированные фагоциты
 - д. фагоциты, уходящие в апоптоз
29. Фагоцитарный показатель – это ...
- а. среднее количество микроорганизмов, поглощенных одним фагоцитом, при подсчете группы из 100 фагоцитов
 - б. число активных фагоцитов
 - в. число неактивных фагоцитов
 - г. число фагоцитов, способных к незавершенному фагоцитозу
 - д. число фагоцитов, способных к завершенному фагоцитозу
30. Укажите цифровое значение показателя опсонического индекса в норме...
- а. меньше 1
 - б. $2 \cdot 10^5$ КОЕ/мл
 - в. больше 1
 - г. это безразмерная величина
 - д. 5
31. Укажите наиболее чувствительный метод диагностики возбудителей инфекционных инфекций
- а. ИФА
 - б. ПЦР
 - в. NASBA
 - г. иммуноблоттинг
 - д. метод флюоресцирующих антител
32. ПЦР-диагностика возбудителей инфекционных инфекций характеризуется следующим:
- а. безошибочностью
 - б. высокой чувствительностью
 - в. частыми возможными ошибками
 - г. длительностью выполнения
 - д. нечастыми возможными ошибками
33. Стандартизованные животные – ...
- а. специально подобранные животные по весу, полу, возрасту и другим признакам
 - б. специально откормленные животные
 - в. реагирующие однотипно на воздействие
 - г. не содержат микрофлоры
 - д. гнотобионты

34. Набор методов для первичного скрининга иммунной системы
- а. тесты 1-го уровня
 - б. тесты 2-го уровня
 - в. тесты 3-го уровня
 - г. ИФА
 - д. ПЦР
35. Метод MALDI TOF используется с целью:
- а. определения титра антител
 - б. определения титра антигенов
 - в. идентификации неизвестного антигена (возбудителя) с помощью заведомо известных антител (сывороток)
 - г. идентификации неизвестных антител (сывороток) с помощью заведомо известных антигенов (возбудителя)
 - д. идентификация микроорганизмов
36. В промышленности фаги получают
- а. на питательных средах
 - б. на чувствительных бактериальных клетках
 - в. на животных
 - г. на культуре ткани
 - д. на вирусных культурах
37. Методы титрования бактериофага
- а. Фюрта
 - б. Грациа
 - в. Отто
 - г. Аппельмана
 - д. Фишера

Правильные ответы на контрольные вопросы:

Номер вопроса	Правильный ответ(ы)		Номер вопроса	Правильный ответ(ы)
1.	б		18.	а
2.	а		19.	б
3.	в		20.	г
4.	в		21.	б, д
5.	а, г		22.	д
6.	а		23.	б, д
7.	д		24.	в, г
8.	г		25.	б, г
9.	г		26.	а, б
10.	в		27.	а
11.	г		28.	б
12.	б		29.	а
13.	а		30.	в, д
14.	в		31.	в
15.	а, г		32.	б, д
16.	в		33.	а, в
17.	в		34.	а
			35.	д
			36.	б
			37.	б, г

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные выше реакции являются в настоящее время наиболее употребляемыми в практике диагностики инфекционных заболеваний. Мы не претендуем на полное изложение всех реакций, которые могут быть использованы для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний и состояния организма человека в процессе его взаимодействия с данным возбудителем.

Создание новых и точных методов геноиндикации инфекционных возбудителей способствует быстрому развитию диагностической базы, своевременной постановке диагноза заболевания, сокращению времени лечения. Все это побуждает к разработке новых способов диагностики.

Можно предположить, что вскоре появятся комплексные диагностические зонды на основе нанотехнологий, которые позволят проводить диагностику с использованием минимума исследуемого материала и реактивов. Это еще в большей степени удешевит лабораторные исследования, а также повысит их точность и специфичность.

Скорее всего, в недалеком будущем появятся такие реакции и зонды, которые дадут возможность быстро определять микроорганизм (или ассоциацию микроорганизмов), причем сделать это без этапов выделения чистой культуры – виновника развития инфекционного процесса.

Это в свою очередь позволит быстрее приступить к правильному лечению инфекционных заболеваний, сократить время нахождения пациента в клинике и улучшить диагностические мероприятия. При этом одновременно уменьшатся экономические затраты, повысится качество и надежность проводимой диагностики.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ИМ	-	Иммуномикробиологические методы
ИФА	-	Иммуноферментный анализ
МФА	-	Метод флюоресцирующих антител
ОИ	-	Опсонический индекс
ОФИ	-	Опсоно-фагоцитарный индекс
ПЦР	-	Полимеразная цепная реакция
РА	-	Реакция агглютинации
РГА	-	Реакция гемагглютинации
РИ	-	Реакция иммобилизации
РКА	-	Реакция коагглютинации
РЛА	-	Реакция латекс-агглютинации
РН	-	Реакция нейтрализации
РНГА	-	Реакция непрямой гемагглютинации
РТГА	-	Реакция торможения гемагглютинации
РСК	-	Реакция связывания комплемента
РУА	-	Реакция угольной агломерации
ТО	-	Титр опсоинов
RW	-	Реакция Вассермана

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бактерийные и вирусные препараты. / Под ред. Карпова С.П. – Томск, 1971. – 308 с.
2. Красильников А.П. Микробиологический словарь-справочник. – Мн.:Беларусь, 1986.-351 с.
3. Медицинская микробиология: Ч. 1. / Под ред. Королюка А.М. и Сбойчакова В.Б.. – С - Пб., 1999. – 272с.
4. Медицинская микробиология. / Гл. ред Покровский В.И., Поздеев О.К.. – М., 1998. – 1200 с.
5. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Микробиология. – М., 1980. – 512 с.
6. Пяткин К.Д., Маркова Н.С., Трофимова Н.Д. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. – М., 1969. – 296 с.
7. Рудаков Н.В. Краткий курс лекций по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. В 2 частях: Учебное пособие. - Омск, 2006.- 239 с.
8. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. / Под ред. Борисова Л.Б. – М., 1984. – 256 с.
9. Руководство к практическим занятиям по общей микробиологии. / Под ред. Проф. Романова В.А. – Ярославль, Изд-во «Ремдер», 2003. - 119 с.
10. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / Под ред. Лабинской А.С., Блинковой Л.П., Ещиной А.С. – М.: ОАО «Издательство Медицина», 2005. – 600 с. (учеб. лит. для слушателей системы последиplomного образования.).
11. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике. / Под ред. Карпищенко А.И. Третье издание Том 1, Том 2. Москва, Издательская группа «ГОЭТАР-Медиа», 2013. – 787 с.
12. Gobom J. et al., Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics, *Anal Chem* 2001, 73(3), 434-8.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Реакция агглютинации (РА)	7
РА по типу Грубера	8
Ориентировочная РА по типу Грубера (РА на стекле).	9
Развернутая РА по типу Грубера	10
Реакция Кастеллани	10
Практическое выполнение развернутой РА по типу Грубера	12
РА по типу Видаля	14
Реакция преципитации	17
Реакция Асколи	18
Реакция преципитации в агаре (по Оухтерлони)	18
Радиальная иммунодиффузия по Манчини	19
Реакция иммуноэлектрофореза	19
Реакция гемагглютинации (РГА)	19
Реакция нейтрализации (РН)	20
Реакция иммобилизации (РИ)	21
Иммуномикробиологические методы, основанные на опосредованном взаимодействии антигена с антителом	21
Реакция титрования комплемента (РТК)	21
Реакция связывания комплемента (РСК)	24
Реакция Вассермана (RW)	25
Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)	27
Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)	27
Реакция коагглютинации (РКА)	28
Реакция латекс-агглютинации (РЛА)	28
Реакция угольной агломерации (РУА)	28
Реакция Кумбса	28
Феномен Исаева-Пфейффера	29

Реакция Райта	30
Опсонофагоцитарная проба	31
Иммуномикробиологические методы с использованием меченных антител или антигенов	34
Метод флюоресцирующих антител (МФА)	34
Иммуноферментный анализ (ИФА)	34
Прямой твердофазный ИФА	35
Конкурентный твердофазный ИФА	35
Радиоиммунный анализ	37
Метод иммуноблоттинга	38
Характеристика методов геноиндикации возбудителей	40
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	40
Лигазная цепная реакция (ЛЦР)	46
NASBA тест	47
Метод MALDI TOF	49
Знакомство с методами (лабораторными реакциями) оценки иммунного статуса организма человека (ВОЗ, 1993).	52
Биологические пробы	55
Бактериофаги	55
Выделение бактериофага	57
Определение специфичности бактериофага	57
Методы титрования бактериофага	58
Тестовые задания (Блок самоконтроля)	60
Правильные ответы на контрольные вопросы	67
Заключение	68
Список использованных сокращений	69
Список литературы	70
Оглавление	71

Учебное издание

Кузнецов О. Ю., Кириленко М. А.

Микробиологические лабораторные реакции

**Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Ивановская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России)
153012, Ивановская область, г. Иваново, Шереметевский
проспект, 8.**

