

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Отчетная работа
по результатам выполнения индивидуальных заданий учебной практики
«Профильная учебная практика по биохимии»
на тему:
«Серологические методы исследования: применение, виды»

Выполнили:

студенты 3 курса 2 группы
Медико-биологического факультета
Направления подготовки Биология
Профиль Биохимия
Буянова Анастасия Сергеевна
Сулейманова Лейла Рамазановна
Хоменко Анастасия Николаевна

Проверил:

Доцент кафедры фундаментальной
медицины и биологии, к.м.н.
Морковин Евгений Игоревич

У.О.Р.

*Несущим ответственность
за оформление в архиве
20.04.2017*

Содержание

1. Введение
2. Применение серологических методов исследования
3. Виды серологических методов исследования
4. Вывод
5. Список литературы

----- #cip?

Введение

Серологические исследования — это методы изучения определенных антител или антигенов в сыворотке крови больных, основанные на реакциях иммунитета. С их помощью также выявляют антигены микробов или тканей с целью их идентификации.

Обнаружение в сыворотке крови больного антител к возбудителю инфекции или соответствующего антигена позволяет установить причину заболевания.

Серологические исследования применяют также для определения антигенов групп крови, тканевых антигенов и уровня гуморального звена иммунитета (II) — не идентифицировано

Применение.

Серологические реакции применяют в научных и диагностических целях в инфекционной и неинфекционной иммунологии: их используют, например, при переливании крови, для определения групп крови, установления видовой и индивидуальной специфичности белков. Серологические исследования применяют также в эпидемиологии и эпизоотологии для выявления источника инфекции, серотипа, путей её передачи, эффективности вакцинации и т. п. Реакция между антигенами и антителами лежит в основе серопрофилактики и серотерапии. Среди основных задач серологии — разработка методов получения специфических диагностических и лечебных сывороток, оценка их активности и выяснение механизма действия^[2]

Виды серологических методов исследования.

Серологические исследования включают в себя различные серологические реакции:

1. Реакция агглютинации.
2. Реакция преципитации.
3. Реакция нейтрализации.
4. Реакция с участием комплемента.
5. Реакция с использованием меченых антител или антигенов^[3].

Реакция агглютинации.

Реакция агглютинации ⊖ простая по постановке реакция, при которой происходит связывание антителами корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов или других клеток, нерастворимых частиц с адсорбированными на них антигенами, а также макромолекулярных агрегатов). Она протекает при наличии электролитов, например при добавлении изотонического раствора натрия хлорида^[4].

Различают:

— прямые реакции агглютинации, которые используют для выявления антител в сыворотке крови больного. Добавление взвеси убитых микробов к сыворотке больного вызывает образование хлопьевидного осадка (положительная реакция склеивания микробов антителами). Используется для определения брюшного тифа, паратифа и др.

— реакция пассивной, или непрямой гемагглютинации основана на использовании эритроцитов с адсорбированными на их поверхности антигенами, взаимодействие которых с соответствующими антителами сыворотки крови больных приводит к образованию фестончатого осадка.

Используется для определения беременности, выявления повышенной чувствительности больных к лекарственным препаратам и гормонам;

— реакция торможения гемагглютинации основана на способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать вирусы, которые в результате теряют свойство склеивать эритроциты. Используется для диагностики вирусных болезней;

— реакция коагглютинации ⊖ разновидность реакции агглютинации, в которой антигены возбудителя определяют с помощью стафилококков, предварительно обработанных иммунной диагностической сывороткой^[2,4].

Постановка реакции: в пробирках готовят разведения сыворотки 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1000 и выше. В каждую пробирку добавляют одно и то же количество микробной взвеси. Предварительный учет реакции производят спустя 2 часа после помещения пробирок в термостат при $t^{*}37^{\circ}\text{C}$.

окончательный — на следующий день после выдерживания пробирок при комнатной температуре. Положительный результат реакции отмечают обычно по наибольшему разведению сывороток, в котором наступила выраженная агглютинация. Диагностическое значение имеет положительная реакция с сывороткой больного в разведении от 1:200 и выше (при последующем нарастании титра)^[5].

Реакции преципитации

Реакции преципитации — реакции, в которых происходит осаждение комплекса антиген-антитело. Антиген в данном случае должен быть растворимым. Осадок комплекса антиген-антитело называется преципитатом. Реакцию ставят путем наслоения раствора антигена на иммунную сыворотку. При оптимальном соотношении антиген-антитело на границе этих растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена. Наибольшее распространение получила реакция преципитации в полужидком геле агара (двойная иммуно-иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и др.). Реакцию используют для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента.

Реакцию преципитации ставят в пробирках (реакция кольцепреципитации), в гелях, питательных средах и др. Широкое распространение получили разновидности реакций преципитации в полужидком геле агара или агарозы: двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и др.

Механизм

Проводится с прозрачными коллоидными растворимыми антигенами, экстрагированными из патологического материала, объектов внешней среды или чистых культур бактерий. В реакции используют прозрачные диагностические преципитирующие сыворотки с высокими титрами антител. За титр преципитирующей сыворотки принимают то наибольшее разведение антигена, которое при взаимодействии с иммунной сывороткой вызывает образование видимого преципитата — помутнение.

Реакция кольцепреципитации ставится в узких пробирках (диаметр 0,5 см), в которые вносят по 0,2–0,3 мл преципитирующей сыворотки. Затем пастеровской пипеткой медленно наслаивают 0,1–0,2 мл раствора антигена. Пробирки осторожно переводят в вертикальное положение. Учет реакции

производят через 1-2 мин. В случае положительной реакции на границе между сывороткой и исследуемым антигеном появляется преципитат в виде белого кольца. В контрольных пробирках преципитат не образуется.

Реакция нейтрализации.

Реакция нейтрализации основана на способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать повреждающее действие микроорганизмов или их токсинов на чувствительные клетки или ткани. При отсутствии повреждающего эффекта смеси антител и микробов или их токсинов на культуру клеток говорят о специфичности взаимодействия комплекса антиген-антитело^[11].

Реакцию нейтрализации проводят путем введения смеси антиген—антитело животным или в чувствительные тест - объекты (культуру клеток, эмбрионы). При отсутствии у животных и тест - объектов повреждающего действия микроорганизмов или их антигенов, токсинов говорят о нейтрализующем действии иммунной сыворотки и, следовательно, о специфичности взаимодействия комплекса антиген—антитело.

Для проведения реакции исследуемый материал, в котором предполагается наличие экзотоксина, смешивают с антитоксической сывороткой, выдерживают в термостате и вводят животным (морским свинкам, мышам). Контрольным животным вводят фильтрат исследуемого материала, не обработанный сывороткой. В том случае, если произойдет нейтрализация экзотоксина антитоксической сывороткой, животные опытной группы останутся живыми. Контрольные животные погибнут в результате действия экзотоксина^[16].

Реакция связывания комплемента.

Реакция связывания комплемента (РСК) заключается в том, что при соответствии друг другу антигены и антитела образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (C), т. е. происходит связывание комплемента комплексом антиген—антитело. Если же комплекс антиген—антитело не образуется, то комплемент остается свободным.

Механизм реакции.

РСК проводят в две фазы: 1-я фаза — инкубация смеси, содержащей три компонента антиген + антитело + комплемент; 2-я фаза (индикаторная) — выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана, и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним. В 1-й фазе реакции при образовании комплекса антиген—антитело происходит связывание им комплемента, и тогда во 2-й фазе гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет; реакция положительная. Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исследуемом образце нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз. Реакция отрицательная.

Применение.

Реакцию связывания комплемента можно применять для:

- 1) выявления специфических антител в неизвестной сыворотке на основании взаимодействия их с антигеном известной природы;
- 2) изучения свойств антигена в реакции с известной специфической сывороткой. Подготовка ингредиентов для постановки РСК.

1. Сыворотку крови, полученную для исследования, накануне постановки реакции прогревают в водяной бане при 56°C в течение 30 мин для инактивации ее собственного комплемента. Инактивированная сыворотка

может храниться при температуре $3-4^{\circ}\text{C}$ в течение $5-6$ дней. В день постановки-опыта сыворотку разводят изотоническим раствором хлорида натрия в соотношении 1:5 (0,1 мл исследуемой сыворотки + 0,4 мл изотонического раствора хлорида натрия).

2. Антигеном для постановки РСК могут быть культуры разнообразных микробов, бактериальные белки и экстракты, полученные из микробных культур, патологически измененных и нормальных органов и тканей. Особенности приготовления антигена определяются характером инфекционного процесса и особенностями его возбудителя.

3. Комплементом является смесь сывороток, полученная от $3-5$ здоровых морских свинок, или сухой комплемент в ампулах. Непосредственно перед употреблением сыворотку морской свинки разводят изотоническим раствором хлорида натрия в отношении 1 : 10, получая основной раствор.

4. Гемолитическую сыворотку перед постановкой опыта инактивируют прогреванием при температуре 56°C в течение 30 мин. Для постановки основного опыта РСК, а также для титрования комплемента и антигена применяют гемолитическую сыворотку в тройном титре. Например, если титр гемолитической сыворотки 1: 1800, в реакции применяют разведение сыворотки 1 : 600.

5. Эритроциты получают из дефибринированной крови барана. Кровь для удаления пленок фибрина фильтруют через трехслойный марлевый фильтр. Полученный фильтрат центрифугируют, сыворотку отсасывают и сливают, а эритроциты промывают $3-4$ -кратным центрифугированием с изотоническим раствором хлорида натрия. При последнем промывании эритроцитов надосадочный слой жидкости должен быть совершенно прозрачным. Из отмытых эритроцитов готовят 3% взвесь в изотоническом растворе хлорида натрия. Подготовив указанным выше способом ингредиенты, участвующие в РСК, приступают к титрованию гемолитической сыворотки, комплемента и антигена.

Реакция с использованием меченых антител или антигенов.

Реакция основана на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками, мечеными флюорохромами, способны светиться в ультрафиолетовых лучах люминисцентного микроскопа (реакция иммунофлюоресценции).

В иммуноферментном анализе вместо флюорохромов иммунную сыворотку можно метить ферментом (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой).

Реакцию оценивают по окрашиванию раствора в желто-коричневый (пероксидаза) или желто-зеленый (фосфатаза) цвет. Радиоиммунологический метод — количественное определение антител или антигенов, меченых радионуклидами, с применением аналогичных антигенов или антител.

Применение.

Методы используют для выявления антигенов микробов, определения гормонов, ферментов, лекарственных веществ и иммуноглобулинов.

Вывод

Серологические реакции имеют лишь относительную достоверность, так как могут быть неспецифическими или положительными у лиц, перенесших соответствующую инфекцию в прошлом (анамнестическая реакция), а также у получивших профилактические прививки (прививочная реакция). Для более объективной оценки результатов серологических исследований используют дифференцированное исследование антител различной физико-химической природы. Антитела одной и той же иммунологической специфичности могут принадлежать к различным классам иммуноглобулинов и вследствие этого качественно отличаться по функциональной активности. Именно физико-химический тип антител определяет характер и интенсивность вызываемых ими таких иммунологических реакций, как лизис, агглютинация, нейтрализация антигенных и токсических свойств, в которых заключается биологический смысл реакции антиген — антитело.

Список литературы.

1. <http://www.km.ru/zdorove/encyclopedia/serologicheskie-issledovaniya>
2. <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D1%E5%F0%E2%80%A2%E3%E8%F7>
3. Бактериологические и серологические методы исследования при инфекционных болезнях <http://lekmed.ru/info/arhivy/bakteriologicheskie-i-serologicheskie-metody-issledovaniya-pri-infekcionnyh-boleznyah.html>
4. <http://vmede.org/index.php?PHPSESSID=e2uhcd1as25cvsan0jfj5n8ee0&topic=638.0>
5. <http://www.medical-enc.ru/1/aggljutinacija.shtml>
6. <http://vmede.org/index.php?topic=643.0>
7. <http://biofile.ru/bio/5480.html>

не по курсу.