Product data have been exported from - ВЛ-Медиа
Export date: Fri Oct 31 2:30:49 2025 / +0000 GMT

Серологический метод

Product Categories: Обзор
Product Page:
http://ivdvlmedia.ru/shop/mikrobiologicheskaya-diagnostika/bakteriologiya/serologicheskiy-metod/obzor-serologicheskiy-metod/serologicheskij-metod/

Product Description

Серологический метод
Основу серологического исследования составляет иммунологическая реакция — специфическое взаимодействие антитела (АТ) с антигеном (АГ). Эту реакцию называют серологической, так как для ее постановки используют сыворотку {serum),содержащую антитела.
Серологические реакции применяются в двух направлениях: для идентификации неизвестной антигенной структуры, т.е. для определения неизвестных АГ бактерий, вирусов, токсинов и т.п. с помощью известных АТ, содержащихся в иммунных диагностических сыворотках;
для серологической диагностики, т.е. для определения неизвестных АТ (в исследуемой сыворотке крови) с помощью известного АГ, - диагностикума, приготовленного, как правило, из эталонных штаммов микробов.
Таким образом, в серологических реакциях один из двух основных компонентов (АГ или АТ) всегда должен быть известным.
К основным видам серологических реакций относятся реакции агглютинации, преципитации, лизиса, нейтрализации, реакции с использованием метки, а также их различные модификации.
Реакция агглютинации РА
Агглютинацией называется склеивание микроорганизмов, эритроцитов или других клеток при действии на них специфических АТ в присутствии электролита. Ориентировочная и развернутая РА широко применяются для диагностики многих инфекционных заболеваний.
Для проведения РА необходимы три компонента: 1) АГ (аг- глютиноген); 2) АТ (агглютинин); 3) ИХН.
Ориентировочная реакция агглютинации. Ориентировочную РА проводят на предметных стеклах. Для этого на обезжиренное стекло наносят пастеровской пипеткой несколько капель сыворотки в небольших (1 :10— 1:20) разведениях и каплю ИХН для контроля. Для идентификации в каждую каплю сыворотки, а также в каплю контроля вносят петлю суточной культуры испытуемого микроорганизма, взятой с поверхности плотной питательной среды. Для выявления АТ в исследуемой сыворотке крови в нее, как и в каплю ИХН, пастеровской пипеткой вводят по 1 капле взвеси известных микроорганизмов (диагностикума). Внесенную культуру тщательно перемешивают до получения суспензии.
Реакция происходит при комнатной температуре. Результаты реакции учитывают невооруженным глазом через 2 — 5 мин, иногда для этого используют лупу (5х). Если предметные стекла поместить во влажную закрытую камеру, чтобы исключить испарение капель, то результаты реакции можно учитывать и позже.
При положительной реакции в капле с сывороткой отмечают появление хлопьев (крупных или мелких), хорошо видимых на темном фоне при покачивании предметного стекла. При отрицательной — жидкость остается равномерно мутной, как и в контроле.
В тех случаях, когда количество микроорганизмов невелико и учесть результаты реакции трудно, каплю сыворотки с внесенной в нее культурой высушивают, препарат фиксируют, окрашивают фуксином Пфейффсра и микроскопируют. При положительной реакции все поле зрения свободно от микроорганизмов, только в отдельных участках наблюдается их скопление. При отрицательной реакции микроорганизмы равномерно распределены по всему полю зрения. Эта реакция получила название микроагглютинации. Развернутая реакция агглютинации. Развернутую РА ставят для серологической диагностики инфекционных заболеваний — брюшного тифа и паратифов (реакция Видаля), сыпного тифа (реакция Вейгля), бруцеллеза (реакции Райта), туляремии и других — с целью определения количества (титра) АТ-агглютининов в сыворотке больных.
Интенсивность реакции выражают полуколичественно (плюсами). При полной агглютинации (++++) жидкость совершенно прозрачная, а на дне пробирки — осадок из хлопьев склеившихся микроорганизмов. Чем меньше микроорганизмов

агглютинировалось, тем мутнее жидкость и тем меньше хлопьевидный осадок на, дне (+++, -Н-, +). При отрицательной реакции (-) хлопьев нет, взвесь остается равномерно мутной и по виду неотличима от содержимого пробирки с контролем АГ (может отмечаться небольшой плотный осадок из несклеившихся клеток).

Внешние проявления РА зависят от вида АГ и величины клеток. У бактерии взаимодействие соматических АГ (О-АГ) со специфическими АТ происходит медленно и через 18 —20 ч образуется мелкозернистый осадок. При встряхивании мелкие зерна аг- глютината-не разбиваются. Подобная агглютинация наблюдается у возбудителей туляремии, бруцеллеза и др. Наличие жгутикового Я-АГ (сальмонеллы брюшного тифа, паратифов) обусловливает быстрое появление агглютинации. Через 2—4 ч образуются легко разбивающиеся крупные рыхлые хлопья.

Агглютинацию живых лептоспир изучают в препарате раздавленной капли при боковом освещении. На темном фоне видны склеившиеся лептоспиры в виде светящихся «паучков».

При отсутствии адсорбированных диагностических сывороток или тест-систем на основе моноклональных антител развернутую РА ставят с диагностической неадсорбированной сывороткой для определения вида, серогруппы и серовара неизвестных микроорганизмов (идентификация по антигенной структуре). Такую реакцию проводят по схеме, которая не отличается от схемы развернутой РА для серодиагностики инфекций.

Реакции непрямой (пассивной) агглютинации. В некоторых случаях АГ, используемые для реакции агглютинации, настолько высоко дисперсны, что комплекс агглютиноген-агглютинин не виден невооруженным глазом. Для того чтобы эта реакция была хорошо видна, предложены методы адсорбции таких АГ на более крупных частицах-носителях с последующей их агглютинацией специфическими АТ. В качестве адсорбентов применяют эритроциты, различного вида бактерии, частицы латекса, угля, талька, коалина и т.д. Эта реакция получила название реакции непрямой, или пассивной, агглютинации. Положительный результат реакции проявляется видимой агглютинацией частиц носителя.

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации. Наиболее высокой адсорбционной способностью обладают эритроциты. Реакция с использованием эритроцитов называется непрямой, или пассивной, гемагглютинацией (РНГА, или РПГА). Для постановки РНГА могут быть использованы эритроциты барана, лошади, кролика, курицы, мыши, человека и другие, которые заготавливают впрок, обрабатывая формалином или глютаральдегидом. Адсорбционная емкость эритроцитов увеличивается при обработке их растворами танина или хлорида хрома.

Антигенами в РНГА могут служить полисахаридные АГ микроорганизмов, экстракты бактериальных вакцин, АГ вирусов и рик- кетсий, а также другие вещества.

Эритроциты, сенсибилизированные АГ, называются эритроцитарными диагностикумами. Для приготовления эритроцитарного диагностикума чаще всего используют эритроциты барана, обладающие высокой адсорбирующей активностью.

В качестве контроля используют формалинизированные эритроциты, сенсибилизированные другим АГ, или формалинизированные несенсибилизированные эритроциты.

Результаты реакции учитывают по наличию гемагглютинации — рыхлого осадка из склеившихся эритроцитов на дне и боковых поверхностях лунок («зонтик»). В контролях гемагглютинации быть не должно (отмечается появление плотного осадка эритроцитов в виде пуговки или колечка).

Реакция торможения пассивной (непрямой) гемагглютинации (РТПГА). Реакцию проводят для обнаружения АГ возбудителей в исследуемом материале, добавляя к нему диагностическую иммунную сыворотку. При наличии гомологичного АГ происходит связывание АТ, поэтому после добавления сенсибилизированных АГ эритроцитов их агглютинации не происходит. Это расценивают как положительный результат.

Реакция обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА). Применяется для индикации бактериальных и вирусных АГ в исследуемом материале, а также для экспресс-диагностики ряда инфекций.

В отличие от РИГА при данной реакции эритроциты сенсибилизируют не АГ, а антителами. Частицы антительного (иммуно-глобулинового) эритроцитарного диагностикума склеиваются при добавлении АГ. Внешне такая агглютинация не отличается от РНГА.

Реакция торможения обратной непрямой гемагглютинации (РТОНГА). Данная реакция позволяет определить наличие АТ в сыворотках людей и животных. В ней принимают участие исследуемая сыворотка, АГ и антительный эритроцитарный диагностикум.

Реакцию сопровождают контролями сенсибилизированных эритроцитов на спонтанную агглютинацию в присутствии: а) стабилизирующего раствора; б) нормального АГ (из материала без возбудителей); в) исследуемой сыворотки.

Преимущество реакции заключается в ее универсальности и возможности использования для выявления различных АГ.

Результаты РНГА, РОНГА и РТОНГА учитывают также полуколичественно — по степени агглютинации эритроцитов:

(++++) — полная агглютинация; (+++) — менее полная агглютинация; (++) — частичная агглютинация; (+) — следы агглютинации; (-) — отсутствие агглютинации.

Реакция считается положительной, если агглютинация полная (++++) или почти полная (+++), диагностикум не дает спонтанной агглютинации в присутствии каждого компонента реакции и контроль специфичности АГ или АТ положительный.

Реакция преципитации

Реакцией преципитации (РП) называется осаждение из раствора АГ (преципитиногена) при воздействии на него иммунной сыворотки (преципитина) в растворе электролита. Осадок представляет собой макромолекулярный иммунный комплекс (преципитат).

Для РП используются коллоидные растворы АГ. В качестве АГ применяют экстракты из микроорганизмов, органов и тканей, продукты распада клеток микроорганизмов — лизаты, фильтраты и т.д. Устойчивость преципитиногенов к высокой температуре используют при получении АГ из возбудителей сибирской язвы, чумы и др. (метод кипячения).

Преципитирующие сыворотки изготавливают централизованно путем гипериммунизации животных (кроликов, коз, ослов и др.) взвесью бактерий, фильтратами бульонных культур, аутолизатами, солевыми экстрактами микроорганизмов, сывороточными белками и т.д.

Титр преципитирующей сыворотки в отличие от титра других диагностических сывороток определяется максимальным разведением АГ, который дает преципитацию с этой сывороткой. Это объясняется ультрамикроскопической величиной АГ, участвующего в РП (в единице объема частиц АГ содержится гораздо больше, чем АТ, в таком же объеме сыворотки). Преципитиругощие сыворотки выпускают с титром не ниже 1:100000.

Реакция кольцепреципитации. В узкую пробирку (диаметр 0,5 см) наливают 0,3—0,5 мл неразведенной преципитирующей сыворотки. Пастеровской пипеткой медленно наслаивают по стенке (пробирку держат в наклонном положении) АГ в таком же объеме. Затем пробирку осторожно, чтобы не смешать жидкости, ставят вертикально. При правильном наслоении АГ на сыворотку четко видна граница между двумя слоями жидкости. РП должна обязательно сопровождаться контролями сыворотки и АГ. Результаты реакции учитывают в зависимости от вида АГ и АТ через 5—10 мин, 1 — 2 ч или через 20—24 ч. В случае положительной реакции в опытной пробирке на границе между сывороткой и исследуемым экстрактом появляется преципитат в виде кольца белого цвета.

В судебной медицине РП используется для определения видовой принадлежности, белка (кровяных пятен, спермы и т.д.).

С помощью РП можно выявить не только видовую, но и групповую специфичность белка. С ее помощью, например, была определена степень родства различных видов животных и растений.

Применение РП для санитарно-гигиенического контроля пищевых продуктов позволяет выявить фальсификацию мясных, рыбных, мучных изделий, примеси в молоке и т.д.

Недостатками РП является нестойкость преципитата (кольца), который исчезает даже при легком встряхивании, а также невозможность установить количество разных АГ, участвующих в формировании преципитата.

Этих недостатков лишена реакция преципитации в геле.

Реакция преципитации в геле (РПГ). РПГ основана на взаимодействии гомологичных АТ и АГ в агаровом геле с образованием видимых полос преципитации. АТ и АГ в результате встречной диффузии в гель образуют макромолекулярные иммунные комплексы, регистрируемые визуально в виде белых (опалесцирующих) полос.

При наличии в растворе нескольких А Г, диффундирующих независимо друг от друга, количество полос соответствует количеству АГ. Серологически родственные АГ образуют полосы преципитации, сливающиеся друг с другом, полосы же разнородных АГ перекрещиваются. Это позволяет определить общность антигенной структуры различных исследуемых объектов.

Компонентами РПГ являются агаровый гель, АГ и АТ. Для контроля РПГ применяется тест-система, состоящая из известных гомологичных АТ и АГ.

Антиген, используемый в РПГ, должен быть концентрированным, а сыворотки (больных людей или иммунизированных животных) — с высоким титром АТ.

В качестве геля используют прокипяченный и остуженный 0,8 — 1%-й раствор специального агара или агарозы на ИХН, слой которого толщиной 1 — 2 мм наносят на чистые стекла. Реакция среды — нейтральная или слабощелочная. В застывшем агаре штампом вырезают лунки, удаляя из них. агар пастеровской пипеткой. В одни лунки вносят сыворотку, в другие — антигены и оставляют гель во влажной камере на несколько дней. Учитывая результаты реакции, сравнивают локализацию и характер линий преципитации возле опытных лунок и контрольной тест-системы. Для определения количества АГ или АТ изучают их 2-кратные разведения.

РПГ широко используется в диагностике заболеваний, вызываемых вирусами, риккетсиями и бактериями, продуцирующими экзотоксины. Большое практическое значение она имеет при определении токсигенности коринебактерий дифтерии.

Реакция иммуноэлектрофореза (РИЭФ). Эта реакция позволяет произвести анализ и идентификацию отдельных А Г в многокомпонентной системе. РИЭФ основана на электрофоретическом разделении антигенов в геле с последующей их преципитацией АТ иммунной сыворотки. Для проведения реакции иммуноэлектрофореза используют пластины из стекла, на которые нанесен слой агара. Вначале АГ, помещенные в центре такой пластины, разделяются в электрическом поле. Затем в канавку агара, вырезанную параллельно линии разделения антигенов, добавляют иммунную сыворотку. Диффундируя навстречу друг другу, АГ и АТ в месте встречи образуют дуги преципитации.

Реакция встречного иммуноэлектрофореза (РВИЭФ). Эта реакция основана на встречной диффузии в электрическом поле антигенов и антител и появлении внутри прозрачного геля видимого преципитата. В агаровом или агарозном геле делают лунки диаметром 2 — 3 мм, причем расстояние между лунками для сыворотки и АГ должно составлять 5 — 6 мм. Лунки располагают попарно (одна — для АГ, вторая — для сыворотки) или по три (одна — для АГ, вторая — для испытуемой сыворотки, третья — для контрольной сыворотки). Лунки для сыворотки располагают ближе к аноду, а для АГ — к катоду. Реакцию проводят с несколькими разведениями АГ, продолжительность электрофореза — 90 мин. Результаты реакции учитывают сразу же после окончания электрофореза, отмечая количество и локализацию линий преципитации при сравнении их с контрольной тест-системой.

Реакция лизиса

Реакцией лизиса называется серологический тест, основанный на растворении цельноклеточного АГ, соединенного с АТ, в присутствии комплемента. В зависимости от АГ, участвующих в реакции лизиса, ее называют реакцией спирохетолиза, вибрионоли- за, бактериолиза, гемолиза и т.д. АТ, участвующие в реакции, соответственно называют спирохетолизинами, вибрионолизинами, гемолизинами и т. д. Комплемент проявляет литическое действие только в присутствии иммунного комплекса «клетка + лизин». Большинство микроорганизмов, за исключением холерного вибриона и трепонем, малочувствительны к литическому действию комплемента. Поэтому реакция лизиса не нашла широкого применения в лабораторной практике.

Реакцию гемолиза используют в качестве индикаторной системы в реакции связывания комплемента.

Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК) относится к сложным серологическим реакциям.

Для ее проведения необходимы 5 ингредиентов, а именно: АГ, АТ и комплемент (первая система), эритроциты барана и гемолитическая сыворотка (вторая система). Специфическое взаимодействие АГ и АТ сопровождается адсорбцией (связыванием) комплемента. Поскольку процесс связывания комплемента не проявляется визуально, Ж. Борде и О. Жангу предложили использовать в качестве индикатора гемолитическую систему (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка), которая показывает, фиксирован ли комплемент комплексом АГ-АТ. Если АГ и АТ соответствуют друг другу, т. е. образовался иммунный комплекс, то комплемент связывается этим комплексом и гемолиза не происходит. Если АТ не соответствует АГ, то комплекс не образуется и комплемент, оставаясь свободным, соединяется со второй системой и вызывает гемолиз.

РСК, как и другие серологические реакции, можно использовать для выявления специфических АТ по известному АГ, а также для определения АГ по известным АТ.

Проведение РСК требует особой подготовки. Посуду (пробирки, пипетки, флаконы) тщательно моют и не используют в других целях. Все ингредиенты реакции подготавливают и титруют до проведения основного опыта.

Сыворотку (больного или диагностическую) накануне проведения реакции прогревают в водяной бане при 56 °С 30 мин для инактивации ее собственного комплемента.

Некоторые сыворотки, особенно от иммунизированных животных, обладают антикомплементарными свойствами, т.е. способностью связывать комплемент в отсутствии гомологичного АГ. Антикомплементарность сывороток устраняют путем обработки их углекислым газом, прогреванием, замораживанием и другими методами. Для предотвращения анти-комплементарности сывороток их хранят в лиофилизированном виде или замороженном состоянии при низких температурах.

Антигеном для РСК могут быть культуры различных убитых микроорганизмов, их лизаты, компоненты бактерий, патологически измененных и нормальных органов, тканевых липидов, вирусы и вирусосодержащие материалы.

РСК, несмотря на ее сложность, обладает относительно высокой чувствительностью и специфичностью, поэтому ее применяют для диагностики многих инфекционных заболеваний. С помощью РСК обнаруживают

комплементсвязывающие АТ в сыворотке крови больных сифилисом (реакция Вассермана), сапом, хронической гонореей, риккетсиозами, вирусными заболеваниями и др.

При инфекционных заболеваниях АТ, связывающие комплемент, появляются в первые дни заболевания, однако титр их невысок. Обычно АТ накапливаются в высоких титрах на 7— 14-й день заболевания. Поэтому наиболее достоверными являются данные, полученные при исследовании парных сывороток, взятых в начале заболевания и в период реконвалесценции.

Серологические реакции с использованием метки

В настоящее время широко применяются серологические реакции, в которых участвуют меченые тем или иным способом АТ или АГ. Серологические реакции с использованием метки позволяют быстро получить результаты, как правило, отличаются высокой чувствительностью и находят широкое применение для экспресс-диагностики вирусных и бактериальных инфекций.

Наиболее распространенными являются следующие виды меток:

флюорохромы и металлы лантаноидной группы, способные флюоресцировать при облучении ультрафиолетом, например флю- оресцеинизотиоцианат (ФИТЦ); такие метки используются в иммунофлюоресцентных реакциях;

ферритин — белок, содержащий до 23 % железа, хорошо контрастирующий и поэтому применяющийся в качестве метки при иммуноэлектронной микроскопии;

ферменты, которые при взаимодействии с субстратом обусловливают его распад с образованием окрашенных (хромогенных) продуктов; используются для иммуноферментного анализа;

радиоактивные метки, применяемые в высокочувствительных реакциях радиоиммуноанализа.

Указанные серологические реакции имеют неодинаковую чувствительность и диагностическую ценность. Применение некоторых из них (например, радиоиммунологических) связано с использованием сложной регистрирующей аппаратуры, а также существенной биологической и экологической опасностью.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ). РИФ основана на использовании флюоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ) или других флюорохромов, химически связанных (конъюгированных) с АТ. При этом меченые АТ (в составе иммунофлюоресцирующих антисывороток) сохраняют иммунологическую специфичность и вступают во взаимодействие со строго определенными корпускулярными АГ. Комплексы АГ с мечеными АТ можно легко определять по интенсивному желто-зеленому свечению при изучении препарата в люминесцентном микроскопе.

РИФ (реакция Кунса) может быть поставлена в нескольких вариантах.

Прямая РИФ предполагает применение иммунофлюоресцирующих АТ против искомого АГ.

Непрямая РИФ предполагает обработку препарата вначале немеченой специфической антисывороткой.

Для исключения ложноположительных результатов реакцию сопровождают рядом контролей, среди которых особое значение имеет контроль с гетерологичным АГ (например, с бактериальной культурой, не соответствующей в антигенном отношении используемой антисыворотке). При изучении инфицированных культур клеток обязательно используют контроль с нормальной, неинфицированной культурой (для исключения аутофлюоресценции и неспецифического связывания меченых АТ с поверхностью клеток). Для подавления аутофлюоресценции препаратов можно использовать бычий альбумин, меченный родамином.

Достоинством непрямой и антикомплементарной РИФ является использование лишь одной светящейся сыворотки (антивидовой или, соответственно, антикомплементарной) при изучении различных АГ, что значительно упрощает и удешевляет реакцию.

РИФ используют для изучения различных АГ: культур бактерий, грибов, простейших; препаратов из материала от больных; инфицированных культур клеток, срезов тканей и др. Исследуемый материал помещают на стекло и фиксируют (чаще всего в ацетоне, 10 мин при комнатной температуре), после чего высушивают в течение 20 мин при 37 °С. Дальнейшая обработка препаратов зависит от применяемого варианта РИФ.

Реакция иммунофлюоресценции, сохраняя специфичность иммунологических реакций, отличается простотой и быстротой проведения. Непрямой вариант РИФ можно использовать не только для изучения АГ, но и для определения количества АТ в иммунной сыворотке. Вместе с тем, РИФ нельзя отнести к числу высокочувствительных реакций. Кроме того, не исключается возможность неспецифической адсорбции меченых АТ на препарате с появлением ложноположительных результатов. Применение лантаноидной метки (металлы лантаноидной группы) существенно повышает чувствительность метода.

Иммуноферритиновая реакция. Данная реакция ставится с применением АТ, конъюгированных с ферритином. После обработки мечеными АТ изучаемых объектов (вирусов, бактерий, срезов инфицированных клеток) они становятся

электронноплотными и могут быть выявлены при электронной микроскопии. Чаще всего эта реакция применяется в вирусологии.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Метод основан на использовании в качестве метки АТ ферментов, способных разлагать субстрат и приводить к образованию окрашенных продуктов (хромогена). Конъюгированные с ферментом АТ сохраняют способность соединяться с гомологичным АГ. Интенсивность окраски хромогена соответствует количеству образовавшихся комплексов АГ-АТ + фермент.

В качестве ферментов чаще всего используют пероксидазу, щелочную фосфатазу. Субстратом для перэксидазы является перекись водорода, а хромогеном служат 5-аминосалициловая кислота, орто-фенилендиамин, ТМБ и другие вещества.

В настоящее время в микробиологии чаще всего используется твердофазная модификация ИФА. Ее суть заключается в том, что вначале на каком-либо твердом материале сорбируют АГ (или АТ) и лишь после этого добавляют остальные ингредиенты серологической реакции. Определение неизвестных антител включает в себя следующие этапы: 1) связывание известного антигена с пластиком лунки планшета; 2) внесение испытуемой сыворотки; 3) внесение конъюгата (меченой ферментом антиглобулиновой сыворотки); 4) внесение хромогенного субстрата. Определение неизвестных антигенов состоит из таких этапов: 1) связывание антител, специфичных для искомого антигена, с пластиком лунки планшета; 2) внесение антигенсодержащего материала;

внесение 2-х антител той же специфичности; 4) внесение конъюгата (меченой ферментом антиглобулиновой сыворотки); 5) внесение хромогенного субстрата. В качестве твердофазного носителя АТ или АГ обычно используют пластиковые планшеты, шарики, пленки или пробирки, изготовленные из различных синтетических инертных материалов — полистирола, метакрила и др. Будучи адсорбированными на поверхности таких материалов, АТ или АГ даже в высушенном состоянии длительное время сохраняют свою иммунологическую специфичность и способность вступать в серологические реакции.

Существует много методических вариантов иммуноферментного выявления АГ; в большинстве случаев АГ улавливается АТ, присоединенными к твердой фазе. В результате инкубации с клиническим материалом исследуемый АГ присоединяется к АТ и, следовательно, — к твердой фазе. Затем «привязанный» АГ выявляют с помощью меченных ферментом АТ против этого АГ — прямой вариант ИФА. При непрямом варианте используются меченные ферментом антивидовые (антиглобулиновые) сыворотки. Количество присоединенного к твердой фазе фермента соответствует количеству АГ. Активность фермента выявляют и оценивают количественно по интенсивности окрашивания хромогена, модифицированного продуктами расщепления субстрата. Результаты реакции учитывают визуально или с помощью специального фотоэлектроколориметра. Применяются также автоматические анализаторы (ридеры).

Для проведения ИФА необходимы полистироловые планшеты, имеющие лунки с плоским дном и автоматические пипетки. Для количественного учета используют спектрофотометр — регистратор экстинции при длине волны 492 нм.

ИФА характеризуется весьма высокой чувствительностью и быстротой получения результатов. Для повышения чувствительности твердофазной модификации ИФА необходимо применение высокоспецифичных АТ, например высоко-аффинных моноклональных АТ.

Иммуноблотинг. В основе этого метода лежит твердофазный вариант ИФА для обнаружения неизвестных АТ. Обычно в качестве известного АГ для ИФА используют целые микробные клетки, вирусные частицы, фрагменты микробных клеток и т.п., которые фактически состоят из нескольких АГ, что обусловливает относительно невысокую специфичность этого метода. При постановке иммуноблотинга вначале препарат известного АГ фракционируют — разделяют методом электрофореза в агарозном геле на фракции (отдельные АГ). После этого гель накладывают на нитроцеллюлозную бумагу (фильтр), плотно прижимают к ней и создают электрическое поле, в результате чего происходит перенос фракций на бумагу (блоттинг). При этом сохраняется взаиморасположение фракций и их расстояние от старта (электрофоретическая картина фракционирования). Далее обработку фильтра ведут так же, как при постановке ИФА. При учете результатов имеет значение появление окрашивания фильтра в виде 1 или нескольких полос на тех местах, где располагались особые (специфические) фракции АГ. Иногда в качестве метки для антиглобулиновой сыворотки применяют не фермент, а радиоактивный изотоп. В этом случае для учета результатов иммуноблотинга применяют такие же средства, как при радиоиммунологическом анализе. Ввиду применения фракционированных АГ иммуноблотинг имеет более высокую специфичность, по сравнению с обычными ИФА или РИА.

Радиоиммунологический анализ (РИА). АГ или АТ для РИА метят радиоактивным изотопом, чаще всего 1251. Реакции РИА очень чувствительны, позволяют обнаружить 1 — 2 нг и менее исследуемого вещества. Для их проведения необходима специальная радиометрическая аппаратура.

Известны различные модификации РИА, из которых чаще всего применяется твердофазная. Как и при проведении

твердофазной ИФА для постановки этой реакции АТ (АГ) сорбируют на твердофазном носителе: поверхности лунок планшетов, бус, пленок из полистирола или других полимерных синтетических материалов. Адсорбированные (иммобилизированные) АГ и АТ длительное время сохраняют способность вступать в серологические реакции.
Применяют три метода твердофазного РИА: конкурентный, обратный и непрямой.
При конкурентном методе РИА на поверхности полистироловых лунок сорбируют известные АТ. Затем в лунки вносят исследуемый антигенсодержащий материал и спустя определенное время, достаточное для специфического взаимодействия АГ с иммобилизированными АТ, добавляют меченный радиоактивным изотопом очищенный АГ той же специфичности.
Если в исследуемом материале присутствует АГ, соответствующий иммобилизованным АТ, часть активных центров последних блокируется. В таком случае внесенный в лунки меченый АГ будет в меньшей степени (по сравнению с контролем) соединяться с иммобилизованными АТ, о чем можно судить по радиоактивности жидкой части реагирующей смеси.
При проведении РИА обратным методом на поверхности лунок сорбируют очищенный немеченый АГ, гомологичный исследуемому АГ. В отдельной пробирке соединяют антигенсодержащий материал с мечеными АТ, специфичными в отношении АГ, иммобилизованного на поверхности лунок. Если в исследуемом материале содержится АГ, способный взаимодействовать с мечеными АТ, активные центры последних полностью или частично блокируются. В таком случае при внесении этой смеси в лунки с сорбированным АГ меченые АТ в меньшем количестве будут фиксироваться на их поверхности, о чем можно судить по степени радиоактивности содержимого лунок в сравнении с контролем.
Наиболее удобным является проведение твердофазного РИА непрямым методом с использованием антивидовых меченых АТ (метод двойных АТ). Непрямой метод РИА может быть использован как для выявления неизвестных АГ, так и АТ (серодиагностика). В обоих случаях применяют антивидовую меченую сыворотку, содержащую АТ против соответствующих гамма-глобулинов. Для проведения серологической диагностики с помощью непрямого метода РИА на поверхности лунок сорбируют АГ, а затем добавляют разведенную сыворотку больного. При наличии в ней соответствующих АТ на поверхности лунок формируется комплекс АГ-АТ. При последующем внесении в лунки меченной изотопом антивидовой сыворотки АТ, содержащиеся в ней, адсорбируются на образовавшемся комплексе АГ-АТ (роль АГ в данном случае выполняют человеческие АТ — гамма-глобулины). Чем больше в сыворотке больного АТ, тем больше будет связанной с поверхностью лунок радиоактивной метки. Определение радиоактивности в жидкой фазе содержимого лунок позволяет судить о количестве АТ в сыворотке больного.
1.4.6. Реакция нейтрализации токсина
В основе этой реакции лежит способность специфической антитоксической сыворотки нейтрализовать экзотоксин. 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.