

**Кафедра Общественного здоровья и здравоохранения**

**Научный кружок по дисциплине Общая микробиология, иммунология и вирусология.**

**Тема: Иммунологические методы исследование в лаборатории**

**План СНК по предмету микробиологии за 2022-2023г**

<b>№</b>	<b>Тема</b>	<b>Дата проведения кружка</b>	<b>Ответственный:</b>
1	Реакции, основанные на феномене агглютинации.	07.03.2023 3-4-пара	Жанадилова Г. Ж., Абдумалик кызы Н., Калысбек кызы С.
2	Реакции, основанные на феномене преципитации.	14.03.2023 3-4-пара	Жанадилова Г. Ж., Абдумалик кызы Н., Калысбек кызы С.
3	Реакции с участием комплемента.	21.03.2023 3-4-пара	Жанадилова Г. Ж., Абдумалик кызы Н., Калысбек кызы С.
4	Реакция нейтрализации.	28.03.2023 3-4-пара	Жанадилова Г. Ж., Абдумалик кызы Н., Калысбек кызы С.
5	Реакции с использованием химических и физических меток (ИФА)	04.04.2023 3-4-пара	Жанадилова Г. Ж., Абдумалик кызы Н., Калысбек кызы С.

Зав. каф. К.м.н.доцент :

Турусбекова А.К.

# ОТЧЕТ РАБОТЫ СТУДЕНЧЕСКОГО НАУЧНОГО КРУЖКА КАФЕДРЫ ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ И ЗДРАВООХРАНЕНИЕ ПО ПРЕДМЕТУ МИКРОБИОЛОГИЯ

за 2022-2023 учебный год

**КУРАТОР КРУЖКА**

**СТАРОСТА КРУЖКА**

**Студент группы 2inl-10A Ahmad Azeem**

**УЧАСТНИКИ КРУЖКА**

## **Виды реакций метода иммунологического исследования**

В зависимости от их механизма и учета результатов, иммунологический метод исследования можно подразделить на 5 видов реакции.

### ***1. Реакции, основанные на феномене агглютинации.***

Агглютинация представляет собой склеивание клеток или отдельных частичек — носителей антигена с помощью иммунной сыворотки к этому антигену.

Реакция агглютинации бактерий с использованием соответствующей антибактериальной сыворотки относится к наиболее простым серологическим реакциям. Взвесь бактерий добавляют к различным разведениям испытуемой сыворотки крови и через определенное время контакта при  $t\ 37^{\circ}$  регистрируют, при каком наивысшем разведении сыворотки крови происходит агглютинация. Реакцию агглютинации бактерий используют для диагностики многих инфекционных болезней: бруцеллеза, туляремии, брюшного тифа и паратифов, бациллярной дизентерии, сыпного тифа.

Реакции агглютинации для определения группы крови и резус-фактора основаны на взаимодействии аллоантител (изоантител) и антигенов эритроцитов. Антитела

против резус-фактора являются неполными, они не способны к прямой реакции с резус-положительными эритроцитами, поэтому для их обнаружения используют реакцию Кумбса, основанную на выявлении неполных антител с помощью антиглобулиновых сывороток. К эритроцитам известной специфичности добавляют исследуемую сыворотку крови, а вслед за этим антиглобулиновую сыворотку против IgG (непрямая реакция Кумбса). Fab-фрагменты неполных антител исследуемой сыворотки крови присоединяются к эритроцитам, а к свободным Fc-фрагментам этих антител присоединяются антитела против IgG, и происходит агглютинация эритроцитов.

Реакция пассивной или непрямой гемагглютинации (РПГА, РНГА). В ней используют эритроциты или нейтральные синтетические материалы (например, частицы латекса), на поверхности которых сорбированы антигены (бактериальные, вирусные, тканевые) или антитела. Их агглютинация происходит при добавлении соответствующих сывороток или антигенов. Эритроциты, сенсibilизированные антигенами, называют антигенным эритроцитарным диагностикумом и используют для выявления и титрования антител. Эритроциты, сенсibilизированные антителами, называют иммуноглобулиновыми эритроцитарными диагностикумами и применяют для выявления антигенов.

Реакцию пассивной гемагглютинации используют для диагностики заболеваний, вызванных бактериями (брюшной тиф и паратифы, дизентерия, бруцеллез, чума, холера и др.), простейшими (малярия) и вирусами (грипп, аденовирусные инфекции, вирусный гепатит В, корь, клещевой энцефалит, крымская геморрагическая лихорадка и др.), а также для определения некоторых гормонов, выявления повышенной чувствительности больного к лекарственным препаратам и гормонам, например пенициллину и инсулину.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) основана на феномене предотвращения (торможения) иммунной сыворотки гемагглютинации эритроцитов вирусами, используется для выявления и титрования противовирусных антител. Она служит основным методом серодиагностики гриппа, кори, краснухи, эпидемического паротита, клещевого энцефалита и других вирусных инфекций, возбудители которых обладают гемагглютинирующими свойствами, например, для серодиагностики клещевого энцефалита, в лунки панели разливают двукратные разведения сыворотки больного на щелочном боратном буферном растворе. Затем добавляют определенное количество, обычно 8 АЕ (агглютинирующих единиц), антигена клещевого энцефалита и после 18 ч экспозиции при  $t 4^{\circ}$  вносят взвесь гусиных эритроцитов, приготовленную на кислом фосфатно-буферном растворе. Если в сыворотке крови больного есть антитела к вирусу клещевого энцефалита, то антиген нейтрализуется и агглютинация эритроцитов не происходит.

## *2. Реакции, основанные на феномене преципитации.*

Преципитация происходит в результате взаимодействия антител с растворимыми антигенами. Простейшим примером реакции преципитации является образование в пробирке непрозрачной полосы преципитации на границе наслоения антигена на антитело. Широко применяют различные разновидности реакции преципитации в полужидких гелях агара или агарозы (метод двойной иммунодиффузии по Оухтерлоню, метод радиальной иммунодиффузии, иммуноэлектрофорез), которые носят одновременно качественный и количественный характер. В результате свободной диффузии, в геле антигенов и антител в зоне оптимального их

соотношения образуются специфические комплексы — полосы преципитации, которые выявляют визуально или при окрашивании. Особенностью метода является то, что каждая пара антиген-антитело формирует индивидуальную полосу преципитации, и реакция не зависит от наличия в исследуемой системе других антигенов и антител.

Для постановки двойной иммунодиффузии наливают слой растопленного геля на стеклянную пластинку и после затвердевания вырезают лунки диаметром 1,5–3 мм. В расположенные по кругу лунки помещают исследуемые антигены, а в центральную лунку — иммунную сыворотку известной специфичности. Диффундируя навстречу друг другу, гомологичные сыворотки и антигены образуют преципитат.

При радиальной иммунодиффузии (по методу Манчини), иммунную сыворотку вносят в агар. Антиген, помещенный в лунки, диффундирует через агар, и в результате преципитации с иммунной сывороткой, вокруг лунок образуются непрозрачные кольца, внешний диаметр которых пропорционален концентрации антигена. Метод используют для определения классов иммуноглобулинов, а модификации метода можно применять для определения противомикробных антител, относящихся к различным классам иммуноглобулинов.

Иммуноэлектрофорез основан на усилении миграции в геле антигенов и антител путем помещения пластины геля с реагентами в электрическое поле. При этом достигается разделение антигенов и антител на компоненты в соответствии с их подвижностью и зарядом.

Разновидностью иммуноэлектрофореза является радиоиммунофорез. В этом случае после электрофоретического разделения антигенов в канавку, вырезанную параллельно движению антигенов в геле, наливают сначала меченную радиоактивным йодом иммунную сыворотку против определяемых антигенов, а затем иммунную сыворотку против IgG-антител, которая преципитирует образовавшиеся комплексы антитела с антигеном. Все несвязавшиеся реагенты вымывают, а комплекс антиген-антитело обнаруживает методом автордиографии.

### *3. Реакции с участием комплемента.*

В качестве комплемента используют свежую сыворотку крови морской свинки, основанную на способности субкомпонента комплемента C1q и затем других компонентов комплемента присоединяться к иммунным комплексам.

Реакция связывания комплемента (РСК) позволяет титровать антигены или антитела по степени фиксации комплемента комплексом антиген-антитело. Эта реакция состоит из двух фаз: взаимодействия антигена с испытуемой сывороткой крови (исследуемая система) и взаимодействия гемолитической сыворотки с эритроцитами барана (индикаторная система). При положительной реакции в исследуемой системе происходит связывание комплемента, и тогда при добавлении сенсibilизированных антителами эритроцитов, гемолиза не наблюдается. Реакцию применяют для серодиагностики сифилиса (реакция Вассермана), вирусных и бактериальных инфекций.

Реакция радиального гемолиза эритроцитов может протекать в геле. Взвесь эритроцитов барана помещают в агарозный гель с комплементом; в застывшем на

стекле слое делают лунки и вносят в них гемолитическую сыворотку. Вокруг лунок в результате радиальной диффузии антител образуется зона гемолиза, радиус которой прямо пропорционален титру сыворотки. Если сорбировать на эритроцитах какой-либо антиген, например гликопротеиновый гемагглютинин вируса гриппа, краснухи или клещевого энцефалита, то можно воспроизвести феномен гемолиза иммунными сыворотками к этим вирусам. Реакцию радиального гемолиза в геле применяют в диагностике вирусных инфекций. Она характеризуется простотой постановки, нечувствительностью к сывороточным ингибиторам, позволяет титровать сыворотки крови по диаметру зоны гемолиза, не прибегая к серийным разведениям.

Иммунное прилипание. Эритроциты, тромбоциты и другие клетки крови имеют на поверхности рецепторы к третьему компоненту комплемента (С3). Если к антигену (бактериям, вирусам и др.) добавить соответствующую иммунную сыворотку и комплемент, то образуется комплекс антиген-антитело, покрытый С3-компонентом комплемента. Эту реакцию применяют при изучении ряда вирусных инфекций (клещевого энцефалита, денге), которые сопровождаются иммунопатологическими процессами и циркуляцией в крови вирусных антигенов в комплексе с антителами.

#### *4. Реакция нейтрализации.*

Основана на способности антител нейтрализовать некоторые специфические функции макромолекулярных или растворимых антигенов, например активность ферментов, токсины бактерий, болезнетворность вирусов. В бактериологии эту реакцию используют для обнаружения антистрептолизина, антистрептокиназы и антистафилолизина. Реакцию нейтрализации токсинов можно оценивать по биологическому эффекту, так, например, титруют антистолбнячные и антиботулинические сыворотки. Смесь токсина с антисывороткой, введенная животным, не вызывает их гибели. Различные варианты реакции нейтрализации применяют в вирусологии. При смешивании вирусов с соответствующей антисывороткой и введении этой смеси животным или в клеточные культуры, патогенность вирусов нейтрализуется и при этом животные не заболевают, а клетки культур не подвергаются деструкции.

#### *5. Реакции с использованием химических и физических меток (ИФА).*

Имунофлюоресценция заключается в использовании меченых флюорохромом антител, точнее, иммуноглобулиновой фракции антител IgG. Меченое флюорохромом антитело образует с антигеном комплекс антиген-антитело, который становится доступным наблюдению под микроскопом в УФ-лучах, возбуждающих свечение флюорохрома. Реакцию прямой иммунофлюоресценции используют для изучения клеточных антигенов, выявления вируса в зараженных клетках и обнаружения бактерий и риккетсий в мазках. Так, для диагностики бешенства, отпечатки кусочков мозга животных, подозреваемых на вирусносительство, обрабатывают люминесцирующей антирабической сывороткой. При положительном результате, в цитоплазме нервных клеток выявляются глыбки ярко-зеленого цвета. На обнаружении антигенов вирусов в клетках отпечатков со слизистой оболочки носа основана экспресс-диагностика гриппа, парагриппа и аденовирусной инфекции.

Более широко применяют метод непрямой иммунофлюоресценции, основанный на выявлении комплекса антиген-антитело с помощью люминесцирующей иммунной сыворотки против IgG-антител и используемой для обнаружения не только антигенов, но и титрования антител. Метод нашел применение в серодиагностике

герпеса, цитомегалии, лихорадки Ласса. Препараты с наслоенной исследуемой сывороткой крови помещают в термостат при  $t\ 37^{\circ}$  для образования иммунных комплексов, а затем, после отмывания несвязавшихся реагентов, выявляют эти комплексы меченой люминесцирующей сывороткой против глобулинов человека. Применяя меченые иммунные сыворотки против IgM- или IgG-антител, можно дифференцировать тип антител и обнаруживать ранний иммунный ответ по наличию IgM-антител.

Иммунофлюоресценцию широко используют не только в бактериологии, вирусологии, паразитологии, но и в иммунопатологии для обнаружения антител к тканевым антигенам человека.

Иммуноферментные или энзим-иммунологические методы основаны на использовании антител, конъюгированных с ферментами, главным образом пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой. Чтобы обнаружить соединение меченых антител с антигеном, добавляют субстрат, разлагаемый присоединенным к IgG ферментом, с окрашиванием в желто-коричневый (пероксидаза) или желто-зеленый (фосфатаза) цвет. Используют также ферменты, разлагающие не только хромогенный, но и люмогенный субстрат. В этом случае при положительной реакции появляется свечение. Подобно иммунофлюоресценции, иммуноферментный метод применяют для обнаружения антигенов в клетках или титрования антител на антигенсодержащих клетках.

Наиболее популярной разновидностью иммуноферментного метода является иммуносорбция. На твердом носителе, которым могут быть целлюлоза, полиакриламид, декстран и различные пластмассы, сорбируют антиген. Чаще носителем служит поверхность лунок микропанелей. В лунки с сорбированным антигеном вносят исследуемую сыворотку крови, затем меченую ферментом антисыворотку и субстрат. Положительные результаты учитывают по изменению цвета жидкой среды. Для обнаружения антигенов, на носитель сорбируют антитела, затем вносят в лунки исследуемый материал и проявляют реакцию меченой ферментом антимикробной сывороткой. Повышению чувствительности иммунофлюоресцентного и иммуноферментного методов способствует введение в систему реакции авидина и биотина.

Радиоиммунологический метод основан на применении радиоизотопной метки антигенов или антител. Является наиболее чувствительным методом определения антигенов и антител, используется для определения гормонов, лекарственных веществ и антибиотиков, для диагностики бактериальных, вирусных, риккетсиозных, протозойных заболеваний, исследования белков крови, тканевых антигенов. Первоначально он был разработан как специфический метод измерения уровня циркулирующих в крови гормонов. Тест-системой являлись меченый радионуклидом гормон (антиген) и антисыворотка к нему. Если к такой антисыворотке добавить материал, содержащий искомый гормон, то он свяжет часть антител, при последующем внесении меченого титрованного гормона с антителами свяжется уменьшенное по сравнению с контролем его количество. Результат оценивают по сопоставлению кривых связанной и несвязанной радиоактивной метки. Эта разновидность метода носит название конкурентной реакции. Существуют и другие модификации радиоиммунологического метода.

Иммуногистологические методы предназначены для определения антигенов на поверхности или внутри клетки, например для обнаружения маркеров лимфоцитов и

иммунокомплексов при гломерулонефритах и других заболеваниях почек. В этой реакции для выявления антигенов пользуются или иммунофлюоресценцией, или иммуноферментными конъюгатами с пероксидазой. Количество специфических антигенов определяют по интенсивности окрашивания. Иногда используют автоматическую регистрацию с помощью спектрофотометра.

*Иммуноблоттинг применяют для выявления антител к отдельным антигенам или «узнавания» антигенов по известным сывороткам. Метод состоит из 3 этапов:*

- разделения биологических макромолекул (например, вируса) на отдельные белки с помощью электрофореза в полиакриламидном геле;
- переноса разделенных белков из геля на твердую подложку (блот), путем наложения пластины полиакриламидного геля на активированную бумагу или нитроцеллюлозу (электроблоттинг);
- выявления на подложке искомым белков с помощью прямой или непрямой иммуноферментной реакции.

Как диагностический метод, иммуноблоттинг используют при ВИЧ-инфекции.

Диагностическую ценность имеет обнаружение антител к одному из белков внешней оболочки вируса.