

Министерство сельского хозяйства РФ

ФГБОУ ВО Брянский ГАУ

Институт ветеринарной медицины и биотехнологии

Кафедра эпизоотологии, микробиологии, паразитологии  
и ветеринарно-санитарной экспертизы

## **ОСНОВНЫЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

учебно-методическое пособие  
для проведения лабораторных занятий по дисциплине  
«Микробиология» со студентами, обучающимися по направлению  
36.03.02 «Зоотехния»



Брянск 2024

УДК 619:616-097:579 (076)  
ББК 48:52.54:28.4  
О 75

Основные серологические методы исследования: учебно-методическое пособие для проведения лабораторных занятий по дисциплине «Микробиология» со студентами, обучающимися по направлению 36.03.02 «Зоотехния» / авт.-сост. А. Е. Рябичева, Н. С. Андрюшина. – Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2024. – 40 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с типовой учебной программой по изучению дисциплины «Микробиология» для проведения лабораторных занятий со студентами, обучающимися по направлению 36.03.02 «Зоотехния».

**Рецензенты:** Е.Е. Адельгейм, доцент кафедры нормальной и патологической морфологии и физиологии животных БГАУ;

В.И. Ивашин, директор ГБУ Брянской области «Дубровская зональная ветлаборатория».

*Рекомендовано к изданию методической комиссией института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянского ГАУ, протокол №3 от 21.11.2024 года.*

© Брянский ГАУ, 2024  
© Рябичева А.Е., 2024  
© Андрюшина Н.С., 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b>	<b>4</b>
<b>Тема 1. Биологические препараты и их контроль</b>	<b>5</b>
<b>Тема 2. Реакция агглютинации, непрямой гемагглютинации, реакция Кумбса.</b>	<b>10</b>
<b>Тема 3. Реакция преципитации, кольцепреципитации, диффузной преципитации</b>	<b>18</b>
<b>Тема 4. Реакция связывания комплемента.</b>	<b>24</b>
<b>Тема 5. Иммуноферментный анализ. Реакция нейтрализации.</b>	<b>32</b>
<b>Список литературы</b>	<b>39</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Реакции между антигенами и антителами *in vitro*, имеющие диагностическое значение, называют **серологическими** (от *лат.* *serum* — сыворотка), так как источником антител служила сыворотка крови. При появлении методов иммунохимического анализа серологические реакции стали частью широкого набора реакций, выявляющих механизмы взаимодействия между антигенами и антителами. Если на разных этапах развития иммунологии в качестве антител для постановки серологических реакций использовали только сыворотку крови, теперь благодаря разнообразным методам выделяют из нее высокоочищенные иммуноглобулины.

Достижения современной иммунохимии позволили проводить данные реакции на уровне, который вряд ли можно назвать серологическим, хотя источником антител продолжает оставаться сыворотка крови. Понятие «серологическая реакция» окончательно отпадает, когда речь заходит о взаимодействии антигена с моноклональными антителами, получаемыми благодаря разработке гибридомной техники, и когда реакция «антиген — антитело» протекает при аллергии.

Каждая из разновидностей серологических реакций имеет свои варианты, а их постановка — различные модификации, поэтому методики проведения реакций между антигеном и антителом довольно разнообразны.

После освоения раздела студенты должны знать: биологические препараты и их контроль, основные методы серологических исследований, методики их постановки и учет результатов.

## ТЕМА 1.

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ И ИХ КОНТРОЛЬ

**Цель занятия:** ознакомить студентов с вакцинами различных типов, лечебно-профилактическими и диагностическими иммунными сыворотками, антигенами, аллергенами и принципами их контроля.

**Материалы и оборудование:** вакцины (против рожи свиней из штамма ВР-2, против сальмонеллеза из штамма ТС-177, против лептоспироза, ботулизма, пастереллеза), лечебно-профилактические иммунные сыворотки (против пастереллеза, рожи свиней), диагностические агглютинирующие и флуоресцирующие сальмонеллезные сыворотки, диагностические аллергены (бруцеллин, туберкулин, маллеин), стерильные МПА, МПБ, среда Китта-Тароцци в пробирках, агар Сабуро; стерильные пипетки Пастера, масло, люминесцентный микроскоп; сенсibilизированные бруцеллами морские свинки с положительной реакцией ГЗТ, плакаты.

#### **Содержание и методика работы**

#### **Вакцины**

Эти биологические препараты содержат в качестве активного начала цельные микробные клетки или их компоненты. Вакцины предназначены для создания искусственного активного иммунитета. Различают несколько основных типов вакцин против инфекционных болезней сельскохозяйственных животных.

**Контроль вакцин.** Вакцины всех типов после приготовления проверяют в основном по трем параметрам.

**Стерильность** (инактивированные) или **чистоту роста** (живые) контролируют посевом на питательные среды.

**Безвредность** проверяют введением вакцины тем или иным лабораторным животным. Вакцина не должна вызывать заболевание и гибель животных.

**Активность (иммуногенность)** обычно контролируют следующим образом. Вакцину вводят лабораторным животным, и через промежуток времени, достаточный для выработки активного иммунитета (15-20 сут.), эту группу вместе с контрольной группой непривитых животных заражают летальной дозой возбудителя. 80% и более контрольных животных должны погибнуть, вакцинированные должны выжить. В некоторых случаях об иммуногенности препарата судят по косвенным показателям: количеству агглютининов у привитых животных (лептоспирозная вакцина), антитоксинов в РН (вакцина против ботулизма).

Например, сухую живую вакцину против рожи свиней ВГНКИ из штамма ВР-2 контролируют следующим образом. Для контроля чистоты сухую (лиофилизированную) вакцину разводят стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:10. Из суспензии бактерий готовят мазки, красят по Граму, микроскопируют. В препарате должны быть типичные мелкие грамположи-

тельные палочковидные клетки при отсутствии посторонних микроорганизмов. Одновременно проводят посевы на МПА, МПБ, среду Китта-Тароцци и агар Сабуро. Посевы выдерживают 10 сут. при 37-38°C, посевы на грибы — 15 сут. при 20-25°C. Рост посторонней микрофлоры в указанные сроки на всех питательных средах должен отсутствовать при наличии типичного роста на МПА и МПБ культуры возбудителя рожи.

С целью контроля вакцины на безвредность и активность 20 белым мышам массой 17-18 г вводят подкожно 0,2 мл препарата. Вакцину считают безвредной, если погибает не более пяти мышей. Через 14 сут. всех оставшихся в живых вакцинированных и пять контрольных мышей заражают летальной дозой культурой вирулентного штамма возбудителя рожи свиней. Вакцину признают активной, если погибают в течение 3-4 сут. контрольные и выживает не менее 75% вакцинированных мышей.

### **Лечебно-профилактические иммунные сыворотки и иммуноглобулины**

Данные биопрепараты применяют для создания пассивного иммунитета при профилактике или лечении. Под пассивной иммунизацией понимают введение готовых иммуноглобулинов (антител) животному. Пассивный иммунитет возникает через 20-24 ч после инъекции и длится максимум 2-3 нед. Иммунные сыворотки получают путем многократного введения антигена животным-продуцентам (волам, лошадям и др.). Для получения каждого типа иммунных сывороток разработаны регламенты приготовления соответствующего антигена, схемы иммунизации и методы, с помощью которых контролируют количество антител в сыворотке крови.

По направленности действия иммунные сыворотки подразделяют на антибактериальные, антитоксические, противовирусные. По достижении необходимого уровня антител у животного берут кровь обычно в объеме 1% массы животного или осуществляют тотальное обескровливание. Полученную кровь сепарируют для получения сыворотки, которую стерилизуют фильтрованием и консервируют 0,25-0,5%-ным фенолом, 0,01-0,03% -ным тиомерсалом или другими веществами.

**Контроль сывороточных препаратов.** Он включает в себя проверку на стерильность, безвредность и специфическую активность.

*Стерильность* препаратов определяют посевом на питательные среды (МПА, МПБ, МППВ, агар Сабуро или Чапека).

Безвредность каждой серии обычно контролируют введением сыворотки морским свинкам. Специфическую активность сыворотки проверяют в зависимости от направленности ее действия.

*Определение превентивных (защитных) свойств* на естественно-восприимчивых или лабораторных животных заключается и в том, что животным вводят подкожно, внутримышечно или внутривентриально сыворотку, а через 20-24 ч иммунизированным и контрольным животным вводят подтитрованную дозу гомологичного вирулентного микроорганизма. Иммунизи-

рованные животные должны остаться здоровыми. Контрольные переболевают с проявлением характерных признаков заболевания.

*Активность* антитоксических и ряда противовирусных сывороток определяют в реакциях нейтрализации (РН). Количество антител в сыворотках устанавливают при помощи серологических реакций (РСК, РА, РИГА, РДП и др.).

Для концентрирования антител иммунной сыворотки, удаления серологически неактивных белков и соответственно повышения специфической активности препарата применяют методы, с помощью которых выделяют глобулиновую фракцию белков иммунной сыворотки. Готовые препараты иммуноглобулинов контролируют, как и иммунные сыворотки: на стерильность, безвредность и специфическую активность.

### Диагностические антитела

Принцип получения диагностических иммунных сывороток такой же, как и лечебно-профилактических. Диагностические сыворотки должны обладать не только высокой активностью в серологических реакциях, но и специфичностью. С помощью диагностических сывороток обнаруживают микробные антигены в тканевых материалах и идентифицируют выделенные микроорганизмы. В зависимости от целевого назначения различают видовые сыворотки (предназначены для идентификации микроорганизмов на уровне вида), групповые (идентификация на уровне серологической группы), серовариантные (на уровне серовара). Иммунные сыворотки готовят для использования в различных серологических реакциях (РА, РП, РДП, РСК, РИГА, РН). При получении антител, меченных флуорохромом и ферментами, из иммунных сывороток предварительно выделяют и очищают иммуноглобулиновую фракцию. В основном диагностические сыворотки (диагностикумы) контролируют на стерильность, активность и специфичность.

**Получение моноклональных антител.** Обычные иммунные диагностические сыворотки, выпускаемые биофабриками, представляют собой смесь антител против различных антигенных детерминант возбудителя инфекционной болезни. Использование таких сывороток для идентификации возбудителя сопряжено с получением перекрестных реакций между сероварами одного вида и даже между различными видами микроорганизмов за счет общих антигенных детерминант. Избежать таких нежелательных перекрестных реакций пытаются различными способами. Один из методов заключается в использовании в качестве антигенов для иммунизации животных-продуцентов компонентов клеток возбудителя, несущих преимущественно специфические антигены. Часто такие вещества получают, разделяя антигенную смесь фильтрованием через сефадексы.

Другое традиционное направление в получении специфических реагентов — **метод адсорбции иммунных сывороток**, когда перекрестно реагирующие антитела удаляют, насыщая сыворотку клетками антигеннородственных бактерий. Клетки бактерий связывают перекрестнореагирующие антитела, и потом их вместе с антителами отделяют от адсорбированной сыворотки центрифуги-

рованием. Подобным образом получают адсорбированные агглютинирующие сыворотки для идентификации сальмонелл и некоторых других видов бактерий.

В качестве специфических антительных реагентов все чаще используют моноклональные антитела. Обычные диагностические сыворотки — поликлональные, поскольку содержат антитела, синтезированные разными линиями (клонами) В-лимфоцитов к различным антигенным детерминантам. Моноклональные антитела представляют собой иммуноглобулины, продуцируемые одним клоном клеток и реагирующие с определенным антигенным эпитопом микроорганизма.

Чтобы получить моноклональные антитела, изолируют и поддерживают линию лимфоцитов, синтезирующих антитела определенной специфической направленности. Клетки-продуценты антител не способны расти *in vitro*. Злокачественная опухоль (миелома) синтезирует в больших количествах аномальные иммуноглобулины и способна к неограниченному росту *in vitro*. Была разработана методика слияния клеток миеломы с лимфоцитами, при этом гибридная клетка (гибридома), как и опухолевая, способна к неограниченному росту и одновременно синтезирует антитела, как лимфоидная. Необходимо обнаружить клон клеток, продуцирующих антитела необходимой специфической направленности. Получение моноклональных антител включает в себя несколько этапов.

Известным антигеном иммунизируют животных. Затем из селезенки выделяют В-лимфоциты.

Проводят слияние (гибридизацию) В-лимфоцитов и миеломных клеток. Получают смесь лимфоцитов гибридных и миеломных клеток.

Смесь клеток культивируют в среде, содержащей ГАТ (гипоксантин — аминоптерин — тимидин), что приводит к гибели лимфоцитов и миеломных клеток, так как на этой среде растут только гибридомы.

Гибридомные клетки рассеивают (клонировать) таким образом, чтобы в лунке панели для микрокультивирования оказалась только одна клетка, дающая начало клону. После размножения клеток оценивают их способность синтезировать нужные антитела (проводят скрининг). Клонирование повторяют. В конечном итоге выбирают стабильный клон, продуцирующий антитела заданной специфичности.

Клетки гибридомы можно длительно хранить в замороженном состоянии (в жидком азоте).

Моноклональные антитела выделяют либо из культуральной жидкости (клетки гибридомы выращивают *in vitro*), либо из асцитической (выращивание *in vivo*).

Моноклональные антитела используют для диагностики инфекционных болезней в иммуноферментном, радиоиммунном и иммунофлуоресцентном анализах.

### **Диагностические антигены**

Предназначены для постановки различных серологических реакций с целью серодиагностики инфекционных болезней животных. В зависимости от

типа серологической реакции антигены могут быть корпускулярными (РА, РСК), на носителях (эритроцитарные антигенные диагностикумы для РИГА), растворимые (РП, РДП). Технология приготовления антигенов разнообразна, но основой для антигенов любого типа служат исходные селекционированные, без признаков диссоциации культуры микроорганизмов.

**Контроль диагностических антигенов** проводят по определенным параметрам:

- контроль стерильности;
- антиген для серологических реакций должен быть определенной оптимальной концентрации, выраженной, например, числом микробных клеток в 1 мл;
- активность антигена определяют в той или иной серологической реакции с заведомо положительной сывороткой. Антиген должен давать четкую положительную реакцию. В некоторых случаях сначала устанавливают предельный титр антигена — разведение, в котором он дает положительную реакцию с наибольшим разведением стандартной положительной сыворотки. Для постановки серологической реакции при диагностических исследованиях используют рабочий титр антигена — двойную дозу предельного титра (единый бруцеллезный антиген);
- специфичность антигена испытывают в серологической реакции с заведомо отрицательной сывороткой. Корпускулярные антигены для серологических реакций осадочного типа контролируют на спонтанную агглютинацию — выпадение в осадок в отсутствие антител.

### **Диагностические аллергены**

Данные биопрепараты (бруцеллин, туберкулин, маллеин) представляют собой экстракты из клеток возбудителя и содержат продукты их метаболизма. Аллергическая диагностика основана на выявлении гиперчувствительности замедленного типа, которая развивается при ряде инфекционных болезней, особенно хронических. В основе этих диагностических тестов лежит специфическая реакция иммунного воспаления с участием сенсibilизированных Т-лимфоцитов.

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое вакцины?
2. Какие существуют контроли вакцин?
3. Что такое лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины?
4. Как осуществляют контроль сывороточных препаратов?
5. Что такое диагностические антигены?
6. Что такое диагностические аллергены вы знаете?
7. Что такое диагностические антитела?

## ТЕМА 2.

### РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ, НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ, РЕАКЦИЯ КУМБСА

**Цель занятия:** ознакомить студентов с реакциями агглютинации, гемагглютинации и реакцией Кумбса, с техникой их постановки и учета результатов.

**Материалы и оборудование:** культуры *E. coli* различной серогрупповой принадлежности на МПА, О-агглютинирующие диагностические эшерихиозные сыворотки, бруцеллезный роз-бенгал антиген, положительная бруцеллезная сыворотка, планшеты с результатами титрования иммунной сыворотки в РНГА, единый бруцеллезный антиген, мерные пипетки.

#### *Содержание и методика работы*

Взаимодействие микробного антигена и антител носит строго специфический характер и направлено в животном организме на нейтрализацию возбудителя и его токсинов. Взаимодействие антигена и антител *in vitro* при определенных условиях сопровождаются видимыми феноменами (агглютинация, преципитация, иммунный лизис), что позволяет использовать АГ—АТ-реакции, получившие название серологических (лат. *serum* - сыворотка), в практических целях. Биофабрики выпускают антигены и иммунные сыворотки (антитела) известной специфической направленности (диагностические). При помощи таких сывороток в серологических реакциях можно идентифицировать неизвестный микроорганизм или, применяя известный антиген, обнаружить в организме антитела, синтезированные в ответ на внедрение возбудителя, и таким образом поставить диагноз (серологическая диагностика). Кроме того, серологические реакции можно использовать для оценки интенсивности иммунного ответа после вакцинации или перенесенной инфекционной болезни.

Реакции агглютинации, непрямой гемагглютинации и Кумбса основаны на взаимодействии *in vitro* корпускулярных антигенов с антителами и способности образовавшихся комплексов выпадать в осадок. В качестве корпускулярных антигенов используют бактериальные клетки или растворимые антигены, экстрагированные из микроорганизмов и сорбированные на корпускулах носителей: эритроцитах, частицах латекса и т. д.

Антигенные детерминанты корпускулярных антигенов специфически взаимодействуют с гомологичными антителами (специфическая, невидимая фаза реакции), а затем комплексы антиген — антитело образуют крупные, видимые невооруженным глазом конгломераты, которые выпадают в осадок — агглютинат (песпецифическая, видимая фаза реакции). Антигены и антитела взаимодействуют лишь в присутствии электролита (в 0,8%-м растворе хлорида натрия).

## Реакция агглютинации (РА)

Разработано несколько вариантов реакции агглютинации, различающихся по методическому исполнению и цели исследования.

**РА на стекле.** 1. Для идентификации микроорганизма на обезжиренное предметное стекло наносят раздельно каплю известной агглютинирующей диагностической сыворотки, например сальмонеллезной, и каплю физиологического раствора (контроль). Затем бактериологической петлей берут бактериальную массу изучаемой культуры из колонии в чашке Петри или с поверхности скошенного МПА в пробирке и суспендируют раздельно в иммунной сыворотке и физиологическом растворе до получения гомогенной взвеси. Результат учитывают через 2..4 мин.

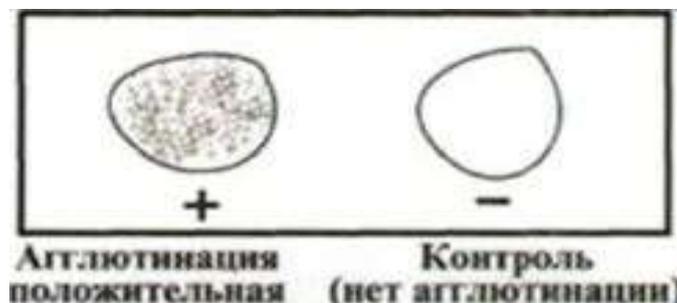


Рис. 1. Реакция агглютинации

Учет результатов: в контрольной пробе изменения должны отсутствовать. При специфическом соответствии культуры бактерий иммунной сыворотке появляются хлопья агглютината (положительный результат), в случае отсутствия феномена агглютинации делают заключение о том, что исследуемая культура бактерии не соответствует иммунной сыворотке.

2. Обнаружение антител в исследуемой сыворотке крови рассмотрим на примере роз-бенгал пробы, применяемой при серодиагностике бруцеллеза. На предметное стекло наносят 0,3 мл исследуемой сыворотки крови животного и 0,03 мл бруцеллезного антигена (окрашенные розовым-бенгальским клетки бруцелл). Компоненты тщательно перемешивают покачиванием стекла и через 4 мин учитывают результат.

*Учет результатов:* при положительной реакции появляются розовые хлопья агглютината. Серологическую реакцию подобного типа относят к качественной, так как с ее помощью можно выявлять антитела к возбудителю в сыворотке крови животного, но невозможно оценить их количественное содержание.



*Рис. 2. Реакция агглютинации на предметном стекле в капле сыворотки – ориентировочная*

**Пробирочная РА.** 1. Обнаружение антител в сыворотке крови рассмотрим на примере РА для серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. Схема постановки опыта приведена в таблице 2. Общий объем компонентов реакции 1 мл.

Таблица 1- Схема постановки пробирочной РА для обнаружения антител в сыворотке крови

Компонент реакции	Количество компонента (мл) в пробирке					
	1-й (исходное разведение и контроль антигена)	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й (контроль антигена)
Физиологический раствор	2,4	-	0,5	0,5	0,5	0,5
Исследуемая сыворотка крови	0,1	0,5 из 1-й проб.	0,5 из 1-й проб.	Последовательный перенос по 0,5 мл, начиная с 3-й проб.		-
Полученное разведение	1:25	1:25	1:50	1:100	1:200	
Бруцеллезный антиген, 10 <sup>9</sup> кл/мл	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Конечное разведение	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	
	Перемешивают встряхиванием. Инкубирование при 37-38 <sup>0</sup> С 18-20 ч.					

Из 5-й пробирки удаляют 0,5 мл жидкости перед добавлением антигена.

Одновременно по аналогичной схеме исследуют заведомо положительную и отрицательную сыворотки (положительный и отрицательный контроли).

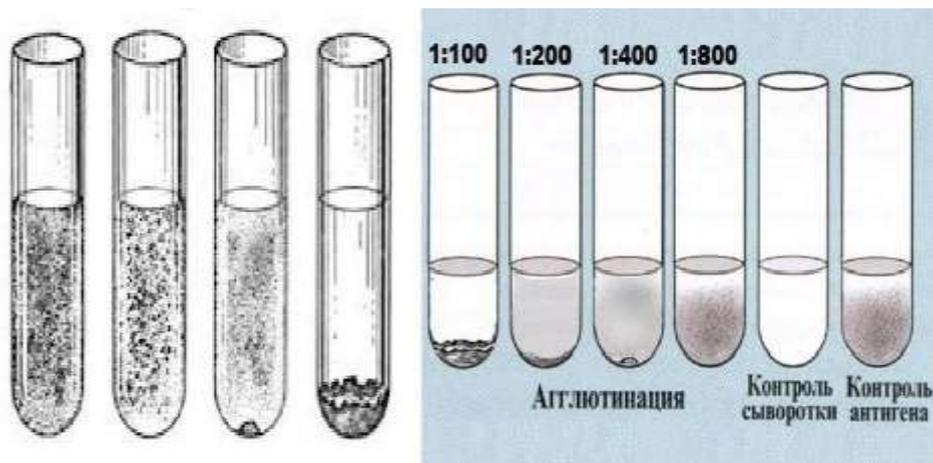


Рис. 3. Пробирочная реакция агглютинации

Учет результатов начинают с контрольных пробирок — не должно быть спонтанной (неспецифической) агглютинации в 6-й пробирке (контроль антигена) и хлопьев осадка в 1-й пробирке (контроль сыворотки). В остальных пробирках наличие и интенсивность агглютинации учитывают визуально и оценивают в крестах:

1) (++++) — полная агглютинация — хорошо выраженный осадок в виде «зонтика» и полное просветление жидкости, при легком встряхивании «зонтик» разбивается на хлопья и комочки, а жидкость остается прозрачной (агглютинировало 100 % антигена);

2) (+++) — неполная агглютинация с хорошо выраженным осадком в виде «зонтика» и неполным просветлением жидкости (агглютинировало 75% антигена);

3) (++) — частичная агглютинация с неполным просветлением жидкости, «зонтик» умеренно выражен (агглютинировало 50% антигена);

4) (+) — едва заметное просветление жидкости, «зонтик» выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество хлопьев или комочков (агглютинировало 25 % антигена);

5) (—) — просветление жидкости и образование «зонтика» не наступило, на дне пробирки по центру образуется небольшой осадок микробов антигена в виде точки или пятна.

Для более объективной оценки результатов РА в крестах готовят стандарты мутности, соответствующие 75, 50, 25 и 0% просветления жидкости.

В четыре пробирки последовательно наливают 1, 2, 3 и 4 мл антигена, разведенного 1:10. Затем в том же порядке в три первые пробирки добавляют 3, 2 и 1 мл фенолизированного раствора. В четвертую пробирку раствор не добавляют. После встряхивания пробирок из каждой из них переносят по 0,5 мл в серологические пробирки и добавляют по 0,5 мл физиологического раствора. Полученные стандарты соответствуют 75, 50 и 25% просветления жидкости. В чет-

вертой пробирке просветление отсутствует. Стандарты мутности готовят каждый раз при постановке РА и выдерживают в термостате одновременной с основной реакцией.

За положительный результат принимают агглютинацию минимум на два креста. Максимальное разведение исследуемой сыворотки крови, обеспечивающее агглютинацию минимум на два креста или более, называют титром сыворотки. Титр сыворотки отражает количественное содержание антител в крови исследуемого животного.

Таблица 2 - Учет результатов РА для обнаружения антител в сыворотке крови

Сыворотка крови	Номера пробирок (разведение сыворотки)					
	1 (контроль сыворотки)	2 (1:50)	3 (1:100)	4 (1:200)	5 (1:400)	6 (контроль антигена)
Исследуемая	-	++++	++++	+++	+	-
Положительная (контроль)	-	++++	++++	++++	+++	-
Отрицательная (контроль)	-	-	-	-	-	-

Из приведенного примера (табл. 2) видно, что антиген специфичен, так как отсутствует спонтанная агглютинация с физиологическим раствором и нормальной (отрицательной) сывороткой, и активен — взаимодействует с заведомо положительной сывороткой. Следовательно, можно учитывать результаты РА с исследуемой сывороткой крови. Титр исследуемой сыворотки (титр антител) в данном случае составляет 1 : 200.

Пробирочную РА используют не только для серодиагностики инфекционных болезней, но также для оценки активности диагностических агглютинирующих сывороток или интенсивности поствакцинального иммунологического ответа.

Количество антител может служить диагностическим критерием. Под диагностическим титром понимают минимальное количество антител к данному антигену в исследуемой сыворотке, заведомо превышающее количество нормальных антител к используемому в реакции антигену в сыворотке животного того же вида. При диагностическом титре антител и выше животное рассматривают как больное или переболевшее. При некоторых инфекциях этот подход не всегда продуктивен, и тогда исследуют «парные сыворотки», т. е. сыворотки, взятые от животного дважды с интервалом три-четыре недели, причем первую пробу необходимо брать не позднее двух-трех суток после появления клинических симптомов болезни. На активный инфекционный процесс указывает существенное повышение титра антител во второй пробе.

2. Для идентификации микроорганизмов используют пробирочную РА, если из-за антигенного родства с различными видами или внутривидовыми сероварами в РА на стекле микроорганизм идентифицировать не удалось.

Например, если культура *E. coli* дает в РА на стекле положительный результат одновременно с иммунными сыворотками против нескольких О-сероваров, ее испытывают как антиген с теми же сыворотками уже в пробирочной РА и относят к той О-серовару, с сывороткой которой она дает максимальные титры.

### Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА)

Данную реакцию относят к серологической реакции осадочного типа. В ней используют растворимые микробные антигены, сорбированные на эритроцитах как носителях (антигенный диагностикум), или сорбированные на эритроцитах антитела известной иммунной сыворотки (антительный диагностикум). Антигенные диагностикумы применяют для серологической диагностики, антительные—для обнаружения антигенов в исследуемом материале.

*Приготовление антигенных диагностикумов.* Дефибринированную кровь отмывают ФСБР (рН 7,2) три раза. Для стабилизации (фиксации) эритроциты обрабатывают формальдегидом, глутаровым или акриловым альдегидом. Наиболее распространена формализация эритроцитов: 50%-ю суспензию эритроцитов смешивают с 50%-м раствором формалина в соотношении 1:1, выдерживают, периодически встряхивая, при 37<sup>0</sup>С 2 ч и затем отмывают ФСБР три раза.

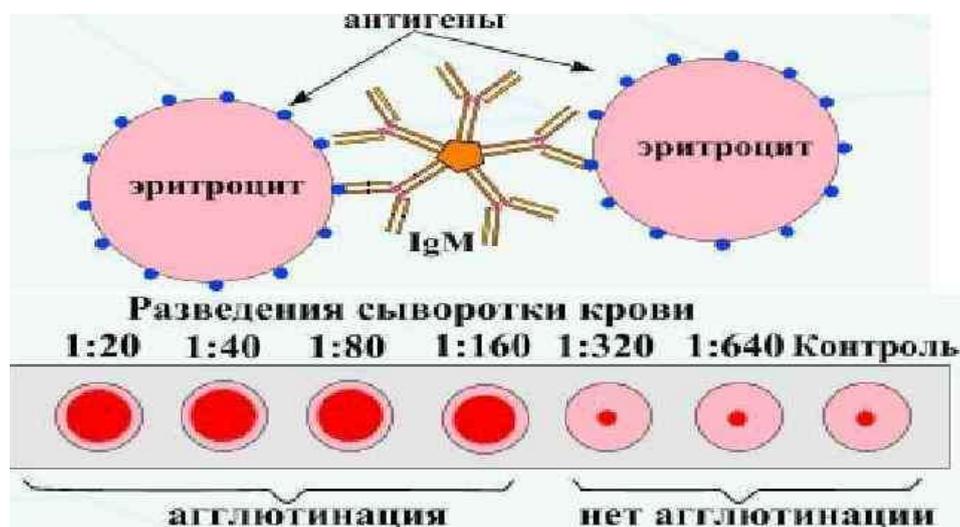


Рис. 4. Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА)

Эритроциты легко сорбируют на своей поверхности полисахариды, а после обработки танином и белки. Танинизацию проводят, смешивая 2,5%-ю суспензию эритроцитов и раствор танина (1:20 000) в соотношении 1:1 с последующим выдерживанием при 37<sup>0</sup>С в течение 15 мин. Затем эритроциты отмывают ФСБР (три раза) и доводят концентрацию до исходной. Для сенсibilизации 1 мл 2,5%-й взвеси отмытых таннизированных эритроцитов объединяют с 1 мл антигена и 4

мл ФСБР (рН 6,4) и выдерживают при 37 °С 2 ч. После сенсibilизации эритроциты отмывают три раза и суспендируют в ФСБР (рН 7,2), который содержит 1 % нормальной кроличьей сыворотки, обеспечивающей стабильность суспензии. Следует отметить, что оптимальное количество антигена для сенсibilизации эритроцитов определяют опытным путем в каждом случае.

*Обнаружение антител в сыворотке крови.* Сыворотку крови перед исследованием инактивируют в водяной бане при 56 °С 30 мин и проверяют на наличие антител к антигенам собственно эритроцитов. Для удаления антиэритроцитарных антител исследуемую сыворотку крови предварительно адсорбируют несенсibilизированными эритроцитами.

*РНГА на стекле* применяют для диагностики пуллороза — тифа птиц (качественная кровекapельная реакция непрямой гемагглютинации — ККРНГА). На сухое обезжиренное стекло глазной пипеткой наносят антиген и свежую кровь (в соотношении 1:1), взятую из гребня или подкрыльцовой вены птицы, и смешивают, покачивая стекло. Реакцию считают положительной при выпадении в течение двух минут в смеси крови с антигеном хлопьев коричневого цвета. Параллельно ставят контроли с позитивной и негативной сыворотками.

*Пробирочная РНГА* рекомендована для серологической диагностики многих инфекционных болезней. Например, для диагностики сальмонеллезов используют количественную РНГА. Эритроцитарный антиген содержит О-антигены сальмонелл. Исследуемую сыворотку разводят физиологическим раствором в полистироловых планшетах в объеме 0,5 мл от разведения 1:100 до 1:800. Затем в каждую лунку вносят 0,25 мл диагностикума. Компоненты перемешивают покачиванием планшета и выдерживают в термостате при 37 °С 2...2,5 ч. Результат РНГА оценивают в крестах (рис. 1):

1) (++++) — все эритроциты агглютинированы и в виде «зонтика» покрывают дно лунки;

2) (+++) — агглютинированы почти все эритроциты. На фоне «зонтика» сформировано малозаметное кольцо из осевших неагглютинированных эритроцитов;

3) (++) или (+) — «зонтик» плохо выражен, заметен осадок из неагглютинированных эритроцитов в виде кольца;

4) (—) — эритроциты не склеены и осели на дно в виде узкого колечка с ровными краями либо в виде пунктата или колечка.

Параллельно ставят контроли с заведомо положительной и отрицательной сыворотками.

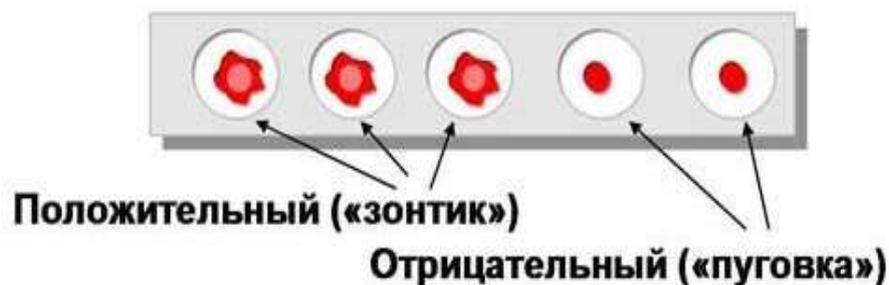
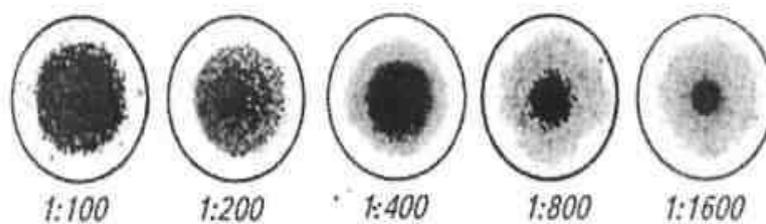


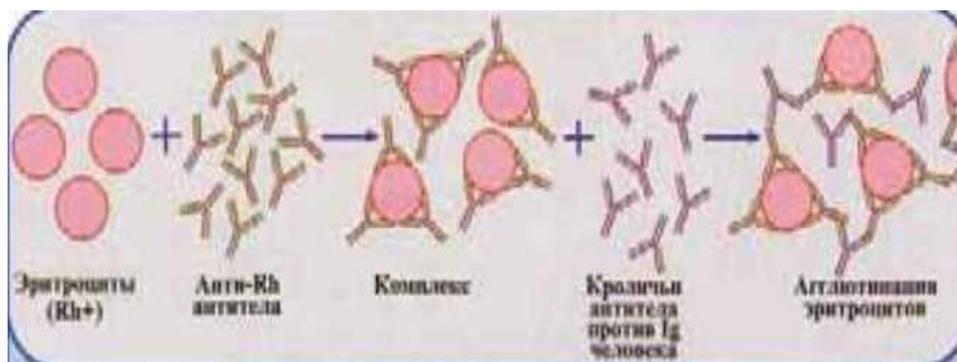
Рис. 5. Результат РНГА



*Рис. 6. Реакция гемагглютинации  
1:100...1:1600 – разведения сыворотки*

### Реакция Кумбса (РК)

Данная серологическая реакция также основана на феномене агглютинации: Предназначена для выявления так называемых «неполных» антител, у которых только один активный центр, и по этой причине они могут специфически взаимодействовать с детерминантами антигена, но реакция не завершается формированием макроскопически видимых комплексов антиген — антитело. В частности, РК используют для серодиагностики бруцеллеза животных.



*Рис. 7. Реакция Кумбса*

Предварительно сыворотки крови исследуют в обычной пробирочной РА. Исходя из результатов РА, для исследования берут пробирки с разведениями сыворотки, где нет агглютинации, но возможно произошло специфическое связывание «неполных» антител с бруцеллезными антигенами. Антиген из этих пробирок отмывают от несвязавшихся (свободных) белков сыворотки крови центрифугированием. К отмывому осадку корпускулярного бруцеллезного антигена добавляют 1 мл разведенной антиглобулиновой сыворотки, содержащей антитела к иммуноглобулинам сыворотки крови животных того вида, который исследуют на бруцеллез. Пробирки со смесью выдерживают при 37 °С 18 ч, затем при комнатной температуре 2...4 ч.

Учет результатов: в положительном случае бруцеллезный антиген будет агглютинировать, так как полные антитела антиглобулиновой сыворотки взаимодействуют с «неполными» антителами на поверхности бруцелл и вызывают агглютинацию корпускул антигена.

## Контрольные вопросы

1. Какие типы антигенов используют в РА?
2. В чем сущность феномена агглютинации?
3. Что такое качественная и количественная РА?
4. Каким образом неизвестный микроорганизм идентифицируют в РА?
5. Как определить титр сыворотки в пробирочной РА?
6. Каким образом получают эритроцитарные диагностикумы для РНГА?
7. В чем сущность реакции Кумбса?

## ТЕМА 3.

### РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ, КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ, ДИФФУЗНОЙ ПРЕЦИПИТАЦИИ

**Цель занятия:** ознакомить студентов с сущностью и техникой постановки реакций, рассмотреть их практическое использование.

**Материалы и оборудование:** сибиреязвенная преципитирующая сыворотка, стандартный сибиреязвенный антиген, стерильный физиологический раствор, пипетки Пастера, пробирки Уленгута, 1,5%-й агаровый гель с мертиолатом (конечное разведение 1:10 000), стерильные чашки Петри, штампы для РДП.

#### Содержание и методика работы

**Реакция преципитации (РП)**, как и реакция агглютинации, принадлежит к разряду серологических реакций осадочного типа, но в отличие от РА в ней используют не корпускулярные, а растворимые антигены микроорганизмов. Образование комплексов антиген — антитело сопровождается изменением оптической плотности среды (помутнением) — преципитацией (от лат. *praecipitatio* — падение вниз), что расценивают как положительный результат реакции.

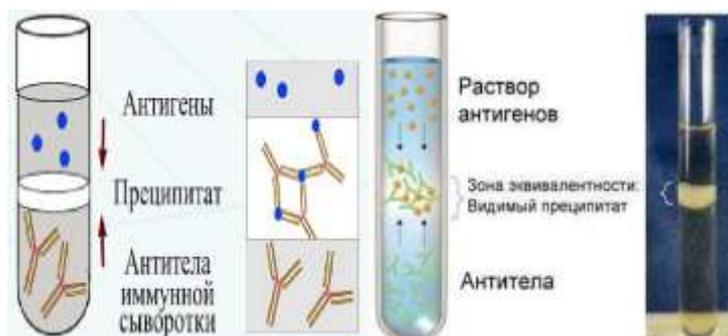


Рис. 8. Реакция преципитации

Антиген для РП готовят из чистых культур микроорганизмов, если антиген предназначен для серодиагностики, или из тканевого материала, содержащего микроорганизмы, если РП ставят, чтобы при помощи известной иммунной сыворотки обнаружить возбудитель в патологическом материале.

Физические методы экстрагирования антигенов основаны на механическом разрушении микробных клеток посредством растирания с кварцевым песком, встряхивания на шюттель-аппарате в колбе со стеклянными шариками, многократного замораживания и оттаивания или воздействия ультразвуком. Полисахаридные термостойкие антигены выделяют термической обработкой (кипячением, автоклавированием).

Из химических методов получения антигенов достаточно широко используют экстрагирование трихлоруксусной кислотой (полный антиген Буавена); кислотный или щелочной термогидролиз—прогревание материала, например, в 1%-м растворе уксусной кислоты или 0,1 н. растворе гидроксида натрия; экстрагирование при помощи ацетона, мочевины, этилового спирта, эфира и других растворителей; часто применяют различные детергенты — дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия и т.д.; используют методы ферментативного разрушения микробных клеток, например, посредством воздействия трипсином.

Выбор того или иного способа выделения растворимого антигена зависит от его химической природы. Главное требование к любому из методов — эффективное извлечение антигена без его денатурации.

На основе феномена преципитации разработаны реакция кольцепреципитации (РКП), реакция диффузионной преципитации (РДП).

### **Реакция кольцепреципитации (РКП)**

Известна по имени автора как реакция Асколи (1911); разработана для диагностики сибирской язвы. РКП используют в ветеринарной диагностической практике преимущественно для выявления микробных антигенов в тканевом материале. Обязательное условие постановки РКП — прозрачность раствора антигена и иммунной сыворотки, поэтому при необходимости компоненты реакции освобождают от взвешенных частиц фильтрованием, например, через асбестовую вату.

Техника постановки РКП включает в себя три варианта.

**Метод «наслаивания» антигена.** В уленгутовские пробирки (диаметр 2...3 см) вносят пастеровской пипеткой с тонким капилляром, не смачивая стенок пробирки, 0,3...0,4 мл иммунной преципитирующей сыворотки. Затем по стенке пробирки осторожно наслаивают на поверхность сыворотки 0,1...0,2 мл растворимого исследуемого антигена (преципитиногена). Смешивания компонентов не происходит благодаря различию плотности сыворотки и экстракта.

Учет результатов проводят на фоне темной бумаги. Через 1...2 мин в зоне взаимной диффузии антигена и антител, на границе контакта компонентов, происходит помутнение среды, видимое сбоку как серо-белый диск (преципитат).

**Метод «подслаивания» антител.** В пробирку вначале вносят антиген, а затем осторожно при помощи пастеровской пипетки на дно пробирки, под антиген, «подслаивают» иммунную сыворотку.

При постановке кольцевой РП в ходе исследования тканевого материала необходимы следующие контроли:

- 1) иммунная сыворотка + стандартный антиген;
- 2) иммунная сыворотка + физиологический раствор;
- 3) иммунная сыворотка + экстракт из тканей здоровых животных.

Показания РП считают достоверными, если в первом контроле получают положительный, а в остальных — отрицательный результат (рис. 39).

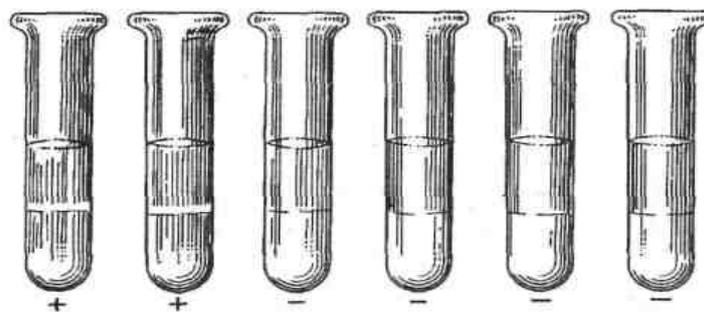


Рис. 9. Реакция кольцепреципитации в пробирках

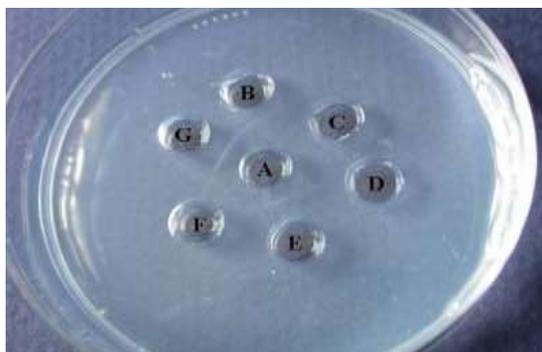
**Микровариант РКП.** Разработан для экономии компонентов. В этом случае используют стеклянные капилляры или тонко оттянутые кончики пастеровских пипеток диаметром 0,5... 1 мм. Капилляр опускают одним концом во флакон с преципитирующей сывороткой, набирают ее на высоту 1... 1,5 см, закрывают верхнее отверстие капилляра указательным пальцем. Затем ватой удаляют излишек сыворотки с наружной стороны капилляра, погружают его в раствор антигена и набирают равное количество антигена. Капилляр переворачивают с таким расчетом, чтобы смесь сыворотки и антигена оказалась в середине капилляра, после чего закрепляют вертикально в пластилиновой пластинке. Результаты учитывают, как и при обычной РКП.

### Реакция диффузионной преципитации (РДП)

Основана на встречной диффузии антител (иммунной сыворотки) и растворимых антигенов в агаровом геле (двойная диффузия). Если антиген состоит из смеси моноантигенов, то каждый из них диффундирует с различной скоростью и точки эквивалентных соотношений каждого антигена и гомологичных антител будут находиться в различных участках агарового геля, где и формируется преципитат в виде линий. Таким образом, каждая пара антиген — антитело образует свою линию преципитации. При помощи РДП можно анализировать сложные антигенные смеси, поскольку каждый антиген дает свою линию преципитации. В ряде случаев РДП используют как метод серологической диагностики инфекционных болезней.

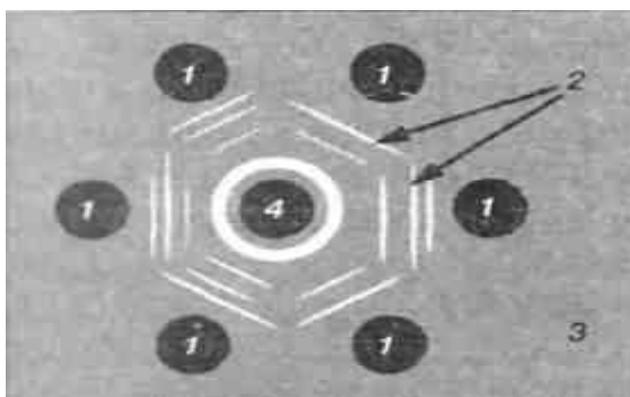
Из очищенного агара фирмы «Дифко» готовят 1,5%-й раствор агара в физиологическом растворе (рН 7,2...7,4) с добавлением мертиолатата (конечное разведение 1:10 000) как консерванта.

На хорошо обезжиренное стекло, лежащее строго горизонтально, наливают расплавленный агар в количестве, достаточном для формирования слоя геля толщиной 3...4 мм. Затем штампами вырезают лунки в агаровом геле; агар из лунки удаляют с помощью трубочек. На дно лунки вносят каплю горячего агара с последующим его удалением, что создает «дно» лунки и предотвращает подтекание компонентов под гель.



*Рис. 10. Полосы преципитации между антигенами в лунках G и E и иммунной сывороткой (антителами) в лунке A.*

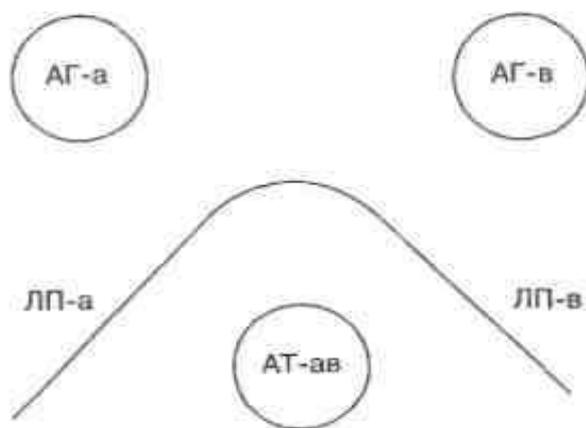
В зависимости от конкретной задачи применяют штампы с различным количеством пробойников, обеспечивающие получение лунок разного диаметра и на разном расстоянии. При изучении неизвестных реагентов оптимальное расстояние между лунками необходимо установить в предварительных опытах. В зависимости от конкретной задачи в центральную лунку вносят иммунную сыворотку, в периферические — анализируемые антигены или наоборот. Сыворотка и антиген не должны выходить за пределы лунки на поверхность агара. Затем пластины помещают в эксикатор. На дно эксикатора наливают небольшое количество воды с антисептиком. Пластины с компонентами выдерживают при комнатной температуре 10...72 ч. (рис. 40).



*Рис. 11. Реакция преципитации в геле по Оухтерлони  
1 – лунки со сравниваемыми антигенами (периферические);  
2- полосы преципитации; 3 – пластинка с агаровым гелем;  
4- лунка с иммунной сывороткой*

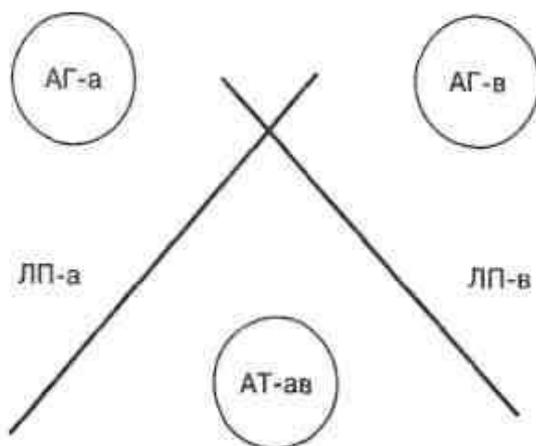
*Учет результатов:* полосы преципитации образуются только в зоне эквивалентности, т. е. там, где все антитела связаны с антигеном. (Если в жидкой среде соединить эквивалентные количества реагентов, то в надосадочной жидкости после формирования преципитата не будет свободных антигена и антител).

При изучении в РДП различных антигенов возможны три варианта результата реакции (рис. 59,60,61).



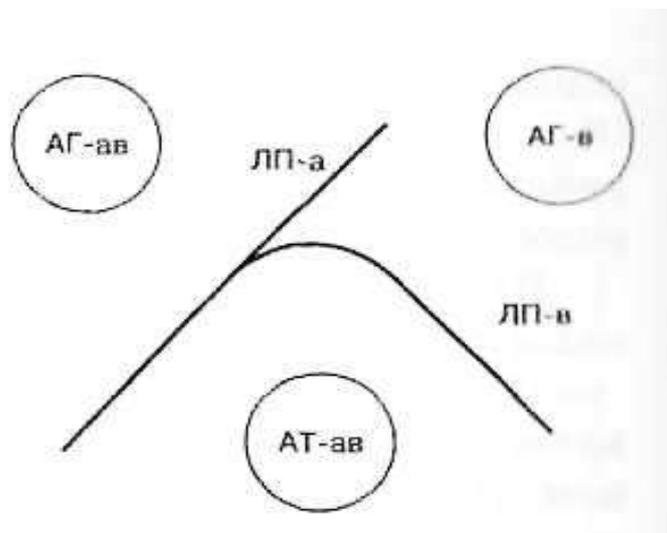
*Рис. 12. 1-й вариант. Линии преципитации сливаются, сравниваемые антигены идентичны:*

*Аг-1, Аг-2 — сравниваемые антигены; Ат — антитела к сравниваемым антигенам; ЛП — линия преципитации*



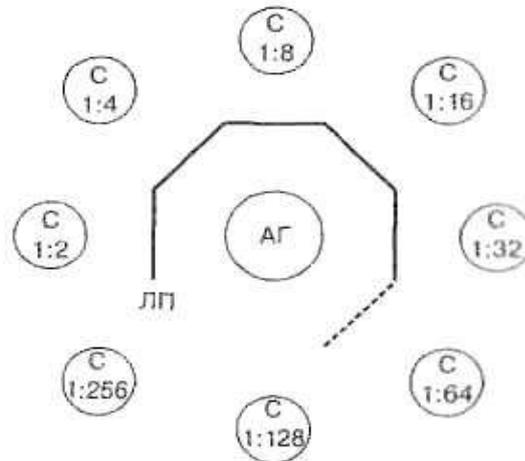
*Рис. 13. 2-й вариант. Линии преципитации пересекаются — «реакция неидентичности», у сравниваемых антигенов нет гомологичных антигенных детерминант:*

*Аг-1, Аг-2 — сравниваемые антигены; Ат — антитела к сравниваемым антигенам; ЛП — линия преципитации*



*Рис. 14. РДП. 3-й вариант. Линии преципитации частично сливаются, у сравниваемых антигенов гомологичные (общие) и гетерологичные детерминанты: Аг-ав, Аг-в — сравниваемые антигены; «в» — гомологичная (общая) антигенная детерминанта в сравниваемых антигенах; «а» — специфическая антигенная детерминанта антигена Аг-ав; Ат-ав — антитела к антигенам Аг-ав, Аг-в; ЛП-в — линия преципитации гомологичных антигенов «в»; ЛП-а — линия преципитации антигена «а» — «шпора»*

1. Реакция идентичности: слияние линий преципитации, относящихся к двум соседним антигенам (у сравниваемых антигенов гомологичные детерминанты — антигены оценивают как идентичные).
  2. Реакция неидентичности: пересечение линий преципитации (у сравниваемых антигенов нет гомологичных антигенных детерминант).
  3. Реакция неполной идентичности: неполное пересечение линий преципитации с формированием так называемой «шпоры». Такая картина возникает, когда у одного из антигенов помимо гомологичных есть и специфические детерминанты, которые второй антиген в составе своей молекулы не несет.
- С помощью реакции диффузионной преципитации можно обнаруживать антитела в сыворотке крови и определять их титр. В этом случае в центральную лунку вносят известный растворимый антиген (бактериальный, вирусный), а в периферические — различные разведения исследуемой сыворотки крови (рис. 15).



*Рис. 15. РДП. Обнаружение антител в исследуемой сыворотке крови: С 1:2...С 1:256 – разведения исследуемой сыворотки крови; Аг - известный микробный антиген; ЛП-линия преципитации. Титр сыворотки в данном случае составляет 1:64*

Чтобы полосы преципитации стали более выраженными, пластины обрабатывают солями кадмия: пластины с готовым гелем отмывают в физиологическом растворе и заливают 0,65%-м раствором сульфата кадмия. В результате через несколько минут полосы преципитации становятся более ярко выраженными (в несколько раз).

### **Контрольные вопросы**

1. В чем сущность феномена преципитации?
2. Какова техника постановки кольцевой РП и РДП?
3. Учет результатов РП.

## **ТЕМА 4.**

### **РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА**

**Цель занятия:** ознакомить студентов с сущностью и принципом постановки реакции связывания комплемента и назначение титрации компонентов.

**Материалы и оборудование:** антиген бактериальный, не обладающий антикомплемментарностью (единый бруцеллезный антиген для РА и РСК), иммунная сыворотка, освобожденная от комплемента и лишенная гемотоксичности (положительная бруцеллезная сыворотка), комплемент, взятый в рабочей дозе, эритроциты барана, отмытые в физрастворе, в виде 2—3%-ной взвеси в физрастворе, гемолитическая сыворотка, физраствор рН 7,2 — 7,4, градуированные пипетки, пробирки, цилиндры, стаканы или колбы для разведений, центрифуга, водяная баня, термостат, штативы, схемы и таблицы постановки РСК.

### ***Содержание и методика работы***

***Реакция связывания комплемента*** (Борде, Жанту, 1901) основана на том, что взаимодействие антигена с соответствующим специфическим антителом происходит только при участии комплемента.

Реакция протекает в две фазы с участием двух систем: бактериальной и гемолитической. РСК относится к прямым двух - системным гетерологичным 5-компонентным реакциям (рис. 63).

Первая фаза реакции — специфическая, происходит при участии антигена (АГ) + антитело (АТ) + комплемент. Положительный результат реакции, наступающий в том случае, когда антитело соответствует антигену, характеризуется образованием специфического бактериального комплекса антиген — антитело с адсорбированием, или связыванием комплемента. Оставаясь невидимым, комплекс не вызывает каких-либо внешних изменений той среды, в которой он образовался.

Отрицательный результат РСК имеет место при отсутствии специфического сродства между антигеном и антителом в сыворотке и характеризуется сохранением свободного активного комплемента.

Первая фаза реакции может происходить при различных температурных условиях: в термостате при 37 °С, при комнатной температуре 20 °С или в холодильнике при 0 — 8 °С. При понижении температуры процесс связывания комплемента происходит медленнее.

Вторая фаза реакции называется индикаторной, она устанавливает, произошла ли адсорбция комплемента в первой фазе реакции или последний остался свободным и протекает при участии специфической гемолитической системы: гемолитическая сыворотка + соответствующие эритроциты. Вторая фаза реакции протекает при температуре 37 °С в термостате.

Реакция считается положительной, если отсутствует гемолиз в гемолитической системе. При отсутствии свободного активного комплемента гемолиз эритроцитов под действием специфических гемолизин не происходит.

Реакция отрицательная, если имеет место гемолиз, обусловленный наличием несвязанного активного комплемента, оставшегося свободным от 1-й фазы реакции.

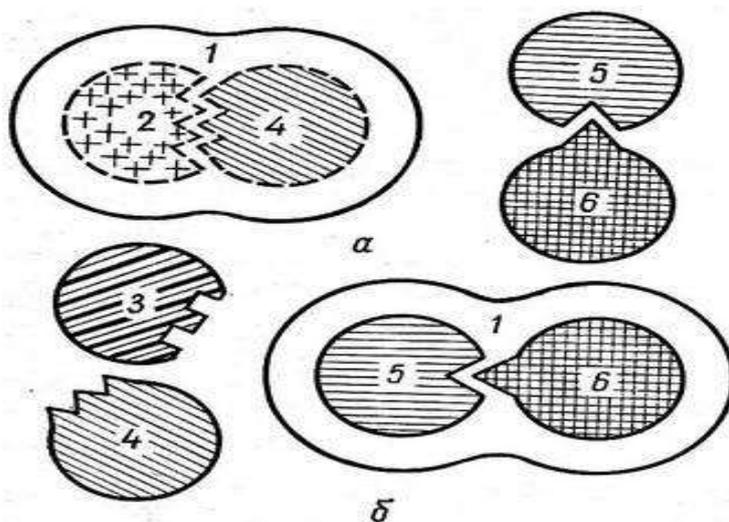


Рис. 16. Схема реакция связывания комплемента.

*а* – положительная; *б* – отрицательная.

1 – комплемент, 2 – сыворотка больного, 3 – сыворотка здорового, 4 – антиген, 5 – гемолитическая сыворотка, 6 – эритроциты барана

РСК может быть использована в двух направлениях:

1) для обнаружения в сыворотке больного специфических антител при помощи известных антигенов (серодиагностики бактериальных, вирусных, риккетсиозных, спирохетозных и других инфекций, диагностики аутоиммунных состояний и др.);

2) для выявления и идентификации в исследуемом материале специфического антигена (коллоидного или корпускулярного) при тех же заболеваниях с помощью иммунной сыворотки, содержащей специфические антитела.

Накануне основного опыта готовят необходимые ингредиенты реакции, посуду и др.

В реакции могут быть использованы эритроциты любых лабораторных животных и человека. Однако преимущественное распространение получили эритроциты барана. Их получают путем пункции яремной вены здорового животного в возрасте от года до 5 лет. Кровопускание у баранов можно производить не чаще одного раза в 10 дней до 200 мл в течение 1 — 1,5 года, после чего животных заменяют.

В области яремной вены выстригают шерсть и место прокола дезинфицируют. Голову барана отгибают назад и в бок. На шею животного накладывают жгут, из набухшей вены толстой иглой берут кровь в стерильную колбу с бусами, которую затем встряхивают в течение 5 — 6 мин для дефибрирования крови с целью предупреждения свертывания, после чего фильтруют через два слоя марли и центрифугируют при 1500 — 2000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант (плазму) отсасывают, а остаток эритроцитов отмывают 2 — 3 раза с пятью объемами физраствора. Последняя промывная жидкость должна быть бесцветной. В реакции применяется 2,5 — 3%-ная взвесь эритроцитов, которую готовят из осадка отмытых эритроцитов (1 мл эритроцитов суспендируют в 40 или 33 мл физраствора). На холоде при 4 °С эритроциты могут сохраняться в

течение 6—7 дней. Для сохранения их на более длительные сроки прибегают к консервированию.

Гемолитическую сыворотку получают путем 3—4-кратной внутривенной иммунизации кролика 50%-ной взвесью эритроцитов барана в количестве 2 — 5 мл с промежутками 2 — 3 дня. На шестой-седьмой день после окончания иммунизации производят забор небольшого количества крови и проверяют активность сыворотки (титр ее должен быть не менее 1:1200). При этом титре и выше производят тотальное кровопускание. Полученную сыворотку прогревают при 56 °С в течение 30 мин, для консервации прибавляют до 0,5% сухой борной кислоты, титруют, разливают по ампулам и хранят в холодильнике при 4 °С. В настоящее время биофабрики выпускают стандартные сухие препараты гемолитической антибараньей сыворотки с титром 1:1200, 1:1500 и т.д. Сухие гемолитические сыворотки разводят стерильным физраствором согласно инструкции и используют в работе.

В качестве комплемента используют свежую сыворотку, полученную от трех — пяти морских свинок, или сухой препарат комплемента, выпускаемый биофабриками. Для сохранения комплемента в свежей сыворотке морских свинок на срок до шести месяцев его консервируют путем добавления на каждые 10 мл сыворотки 0,4 г борной кислоты и 0,5 г сернокислого натрия. Сухой (лиофилизированный) комплемент сохраняет активность в течение нескольких лет.

Для постановки реакции комплемент разводят 1:10 (1 мл сыворотки морских свинок + 9 мл физраствора). Перед каждой постановкой РСК следует проводить титрование комплемента. Титрование проводят в том объеме, в котором в последующем проводится главный опыт.

Антигеном в РСК служат убитые бактериальные, вирусные и другие биологические корпускулярные агенты, а также полученные из них коллоидные антигены. Антигены для РСК не должны обладать антикомплемментарными свойствами. Поэтому их титруют в присутствии комплемента. Допускается употребление антигена, подавляющего активность комплемента не более чем на 30%. Антиген не должен обладать гемотоксичными свойствами. Двойная доза антигена не должна давать даже следов гемолиза рабочего объема 3%-ной взвеси бараньих эритроцитов.

Полученную сыворотку инактивируют прогреванием в зависимости от вида животных при 56 — 61 °С в течение 30 мин. В результате этого разрушают комплемент и добиваются необходимой для реакции стабилизации коллоидов сыворотки. Инактивированную сыворотку можно хранить в течение 5 — 6 дней при 4 °С. При необходимости более длительного хранения сыворотки (2 — 3 недели) после инактивации к ней добавляют 2% сухой борной кислоты. Длительно хранившиеся сыворотки перед постановкой РСК вновь инактивируют.

Схема проведения РСК предусматривает постановку ряда опытов в последующей очередности:

1. Титрование и определение рабочей дозы гемолитической сыворотки (гемолизина).
2. Титрование и определение рабочей дозы комплемента.
3. Титрование иммунной сыворотки на антикомплемментарность.
4. Основной опыт РСК.

Для РСК вначале используют реагенты, каждый в объеме 1 мл, а так как в реакции участвуют 5 компонентов, то общий объем равняется 5 мл. В дальнейшем снижают объем реагентов, вводимых в реакцию. Вместо полного объема (5 мл) реакцию ставят в объеме 2,5, 1,25, 1,0, 0,5 мл, а реагенты берут соответственно — 0,5, 0,25, 0,2, 0,1 мл.

Титрование проводят при получении новой серии сыворотки, а также с целью определения пригодности ее при длительном хранении — 1 раз в 3 — 4 мес.

Для определения титра гемолизина ставят реакцию гемолиза с падающими разведениями сыворотки и комплементом, взятым в разведении 1:10 (табл. 3).

Таблица 3 - Схема разведения гемолитической сыворотки

Компонент	Пробирки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Гемолизин в разведении 1:10	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Физраствор рН 7,3	1,8	3,9	7,9	9,9	11,9	14,9	17,9	20,9
Разведение гемолизина	1:100	1:400	1:800	1:1000	1:1200	1:1500	1:1800	1:2100

Титр гемолизина — максимальное его разведение, которое способно растворить в течение 1 ч при 37 °С 3%-ную взвесь эритроцитов в присутствии комплемента, взятых в равных объемах (табл. 4).

Таблица 4 - Определение титра гемолизина

Компонент	Разведение гемолизина и дозы реагентов, мл						Контроль		
	1:100	1:400	1:800	1:1000	1:1200	1:1400	ГС	к	э
Гемолизин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
Эритроциты барана, 3% взвесь	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Комплемент в разведении 1:10	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-
Физраствор	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
Инкубация при 37 °С в течение 45- 60 минут (через 30 мин встряхнуть пробирки)									
Результат	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-

Обозначение: +++++ — полный гемолиз;

++ — неполный гемолиз;

- — отсутствие гемолиза.

Контроль: ГС — контроль гемолитической сыворотки на гемотоксичность;

К — контроль комплемента на гемотоксичность;

Э — контроль эритроцитов на стабильность в физрастворе.

В указанном опыте титром гемолизина будет разведение сыворотки 1:1200 (полный гемолиз). Для РСК гемолизин применяют в рабочей дозе, равной удвоенному или утроенному титру сыворотки (при титре сыворотки 1:1200 разведение рабочей дозы будет 1:1400 - 1:600).

Гемолитическая система, или гемосистема, представляет смесь эритроцитов барана и гемолитической сыворотки. Готовят ее в день постановки опыта. Для этого к объему 3%-ной взвеси эритроцитов в колбе быстро добавляют равный объем гемолизина, взятого в рабочем разведении. Смесь выдерживают при 37 °С в термостате 30 мин для сенсibilизации эритроцитов и после этого используют в работе.

Гемосистема является цветным индикатором на комплемент.

Для определения дозы комплемента, в которой его следует применять в реакции, проводят титрование.

В дополнительном ряду пробирок приготавливают разведения комплемента. Затем их разливают по 0,1 мл в опытные пробирки, в которые добавляют физраствор и гемосистему по 0,2 мл. Штатив с пробирками встряхивают и выдерживают в термостате при 37 °С 1 ч (табл. 5).

Таблица 5 - Титрование комплемента (в объеме 0,3 мл)

Компонент	Разведения комплемента и дозы реагентов, мл							
	1:10	1:15	1:20	1:25	1:30	1:40	1:60	1:80
Комплемент	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Физраствор	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Гемосистема (сенсibilизированная)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Инкубация при 37 °С в течение 1 ч								
Результат	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-

Результаты оценивают по плюсовой системе. Титр комплемента устанавливают по пробирке с минимальным содержанием комплемента, в которой наблюдается полный гемолиз. В табл. 6 это пробирка с разведением 1:40. В качестве рабочей дозы берут предыдущую пробирку с более высоким содержанием, примерно на 25-30%. В данном опыте это будет пробирка с разведением 1:30.

Для определения рабочей дозы антигена, т.е. максимального количества, в котором он сам по себе не проявляет антикомплемментарного действия, проводят его титрование. С этой целью в дополнительный ряд пробирок переносят по 0,1 мл каждого разведения антигена. Затем в каждую пробирку добавляют по 0,1 мл комплемента, взятого в рабочей дозе, и по 0,1 мл физраствора. Пробирки встряхивают и инкубируют в термостате при 37 °С 1 ч, после чего во все пробирки добавляют по 0,2 мл сенсibilизированной гемосистемы. Пробирки вновь встряхивают и термостатируют при 37 °С еще 1 ч. Затем учитывают результаты и определяют, при каком максимальном количестве антигена отмечается гемолиз. Это количество представляет собой «растворяющую» дозу антигена, которую и принимают за его титр (табл. 4).

Для титрования сыворотки используют рабочую дозу антигена, которая в два раза меньше титра АГ.

Исследуемые сыворотки животных и человека в больших концентрациях могут обладать антикомплементарным действием. Поэтому возникает необходимость определять, какие разведения сыворотки лишены антикомплементарных свойств.

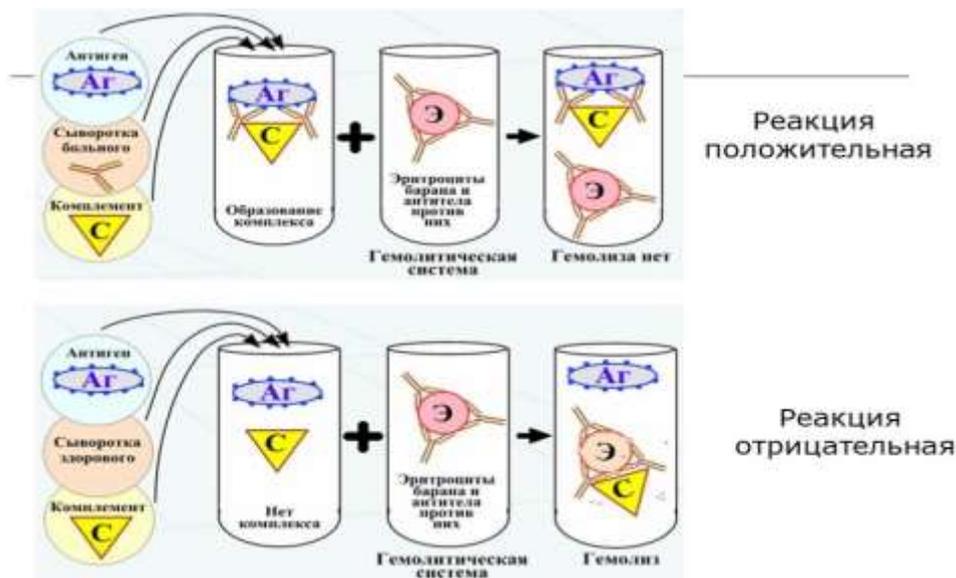


Рис. 17. Реакция связывания комплемента

### Основной опыт РСК

Оттитрованные ингредиенты (антиген, комплемент, гемолитическая сыворотка) разводят физраствором таким образом, чтобы рабочая доза их содержалась в объеме 0,1—0,5 мл. Одновременно готовят 2,5 — 3%-ную взвесь эритроцитов.

РСК можно ставить и в других объемах ингредиентов, например, в объемах по 0,5 мл соответствующих компонентов. Каждую исследуемую пробу сыворотки крови 1:10 инактивируют и разливают в две пробирки по 0,1 -0,5 мл, в штативы ставят два ряда пробирок на каждую сыворотку. Дополнительно ставят еще по две пробирки с нормальной и позитивной сыворотками для контроля. Во все пробирки первых рядов сывороток добавляют по 0,1—0,5 мл антигена, во вторые ряды (безантигенный ряд) по 0,1 — 0,5 мл физраствора, затем во все пробирки обоих рядов вносят комплемент по 0,1 — 0,5 мл. Встряхивают и помещают в водяную баню на 20-40 мин (37-38 °С) для хода реакции в бактериолитической системе. После этого во все пробирки добавляют гемосистему (гемолизин и взвесь эритроцитов барана по 0,1 — 0,5 мл каждого), встряхивают и снова ставят в водяную баню на 15 — 20 мин.

### Основной опыт РСК

Фаза реакции	Ингредиенты, участвующие в реакции	Номера пробирок				
		1, опыт	2, КС	3, КА	4, КГ	5, КК
1.	1. Исследуемая сыворотка, мл	0,5	0,5	-	-	-
	2. Антиген в раб. дозе, мл	0,5	-	0,5	-	-
	3. Комплемент в раб. дозе, мл	0,5	0,5	0,5	-	0,5
	4. Изотонический раствор, мл	-	0,5	0,5	1,5	1,0
Инкубация при 37 С в течение 30 мин						
2.	5. Гемолитическая система, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Инкубация при 37 С в течение 30 мин						
Результат:						
Условные обозначения:		(+) ↑ задержка гемолиза		(-) ↓ гемолиз		

Рис. 18. Основной опыт РСК

Учет результатов проводят дважды: первый предварительный — сразу после водяной бани, второй - через 18 — 20 ч. При первом учете обращают внимание на пробирки второго ряда и пробирки с нормальной сывороткой и антигеном (первый ряд), где должен быть гемолиз. В пробирках с позитивной сывороткой и антигеном гемолиз отсутствует (эритроциты во взвешенном состоянии, жидкость мутная). Окончательный учет проводят на следующий день.

Показания реакции с исследуемыми сыворотками считаются достоверными, если в пробирках с позитивной сывороткой и антигеном нет гемолиза при полном гемолизе в пробирках с этой сывороткой без антигена и во всех пробирках с отрицательной сывороткой.

Результат РСК принято выражать в плюсах в зависимости от его интенсивности:

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

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

++ — частичная задержка гемолиза, имеется незначительный осадок эритроцитов, результат сомнительный;

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

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

### ***Контрольные вопросы***

1. Сущность РСК, принцип постановки.
2. Принцип титрования комплемента и назначения гемолитической системы.
3. Что собой представляют гемолизин, комплемент, как их получают?
4. Что означает рабочий титр гемолизина?
5. Объяснить необходимость инактивации исследуемых в РСК сывороток.
6. Суть методики постановки РДСК и других модификаций РСК.

## **ТЕМА 5.**

### **ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ. РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ**

***Цель занятия:*** ознакомить студентов с различными вариантами ИФА, с сущностью и методикой постановки реакции нейтрализации (РН) применяемыми в микробиологической практике.

***Материалы и оборудование:*** предметные стекла, полистироловые микропанели с плоским дном, автоматические пипетки объемом от 50 до 200 мкл, промывочное устройство, считывающее устройство, световой микроскоп, исследуемый патматериал, исследуемые сыворотки крови, диагностические иммунные сыворотки, бактериальные диагностикумы, иммунопероксидазные конъюгаты, субстрат диаминобензидинтетрахлорид (3,3 ДАБ•4НС1), культуральная жидкость, физиологический раствор, стерильные пробирки и градуированные пипетки на 1, 2, 5 мл, шприцы с иглами на 1 или 2 мл, воронки, фильтровальная бумага, штативы, термостат, резиновые груши, дезинфицирующий раствор, таблицы по схеме.

### ***Содержание и методика работы***

#### **Иммуноферментный метод (ИФА)**

Широко используется как серологический метод выявления антигенов и антител и является перспективным аналитическим методом, обладающим высокой чувствительностью, достаточной специфичностью, хорошо коррелирующим с результатами, полученными при использовании других серологических методов.

Основными направлениями ИФА являются:

ранняя диагностика инфекционных болезней;

проведение массовых эпизоотологических обследований в целях своевременной профилактики животных от ряда инфекционных заболеваний, наносящих значительный ущерб животноводству (бруцеллез, лейкозы, микоплазмозы, ящур и др.);

определение иммунологического статуса у животных и изучение эффективности применения вакцин;

контроль качества биопрепаратов и соблюдение норм на предприятиях биологической промышленности;

контроль качества продуктов животноводства и сырья животного происхождения на предприятиях мясной и мясоперерабатывающей промышленности (трихинеллез, сальмонеллез, пестициды, антибиотики и другие вещества).

В микробиологической практике наибольшее распространение ИФА получил при определении антител против бактериальных антигенов, таких, как О-антиген сальмонелл, О-антиген и экзотоксин холерного вибриона, О-антигенов бруцелл, М-антиген белка стрептококков, антигенов микоплазм, риккетсий, столбнячного и дифтерийного экзотоксинов и т.д.

Иммуноферментный анализ аналогичен МФА (методу флуоресцирующих антител), но в качестве метки антител используют фермент пероксидазу хрена, кислую и щелочную фосфатазу, глюкозооксидазу, галактозидазу, дегидрогеназу, люциферазу и др., которые при добавлении к реагирующим компонентам соответствующего субстрата образуют окрашенные продукты реакции. Чаще всего для метки применяют пероксидазу хрена, так как ее молекулярная масса (40000) меньше молекулярной массы щелочной фосфатазы (100000), галактозидазы (150000) и др., что способствует лучшему проникновению. Пероксидаза устойчива при гистологической обработке. Учет результатов реакции проводят под обычным световым, люминесцентным и электронным микроскопом или с помощью спектрофотометра.

Для идентификации бактериальных антигенов ИФА применяют в двух вариантах: гистохимическом и твердофазном.

### **Гистохимический вариант ИФА, или иммунопероксидазная реакция**

Данный метод проводят в прямом и непрямом вариантах. При прямом иммунопероксидажном тесте используют антибактериальные конъюгаты, т.е. антитела против определенных бактериальных антигенов, меченные ферментом. Такие конъюгаты обычно готовят на предприятиях биологической промышленности.

Материалом для выявления могут служить, мазки-отпечатки из различных органов, мазки из культур, гистосрезы, мазки крови. Препараты в течение 10 мин фиксируют охлажденным ацетоном (-10 — -20 °С), подсушивают на воздухе и наносят на них антибактериальный конъюгат в рабочем разведении. Инкубируют 1—2 ч во влажной камере (чашки Петри с фильтровальной бумагой, смоченной водой) при 37 — 38 °С, затем препарат тщательно промывают (в течение 15 мин) физиологическим раствором, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. В дальнейшем на препарат наносят проявляющий раствор — диаминобензидинтетрахлорид (3,3 ДАБ•4НС1). Для приготовления субстрата 25 мг 3,3 ДАБ•4НС1 растворяют в 100 мл 0,05 М трис-буфера рН 7,5 или в лимоннокислом буфере рН 5,0 (0,05 М лимонная кислота, нейтрализованная 0,05 М уксуснокислым аммонием). Далее 25 мл раствора 3,3 ДАБ•4НС1 смешивают с 3 мл 0,5%-ной НО (готовят *ex tempore!*). Субстрат выдерживают на препарате 5 — 10 мин, промывают 10—15 мин физиологическим раствором и споласкивают дистиллированной водой.

В положительных случаях, т.е. при наличии антигена в исследуемом препарате, после нанесения иммунопероксидазного конъюгата образуется комплекс антиген — антитело, меченный ферментом. После нанесения на препарат раствора субстрата последний под действием фермента разлагается, образуя цветной продукт ферментативной реакции, хорошо видный в световом микроскопе.

Результаты учитывают с помощью светового микроскопа. Диаминобензидин тетрагидрохлорид под действием пероксидазы разлагается, образуя продукт реакции голубого цвета, который быстро переходит в коричневый. В препарате видны или диффузное желто-коричневое окрашивание, или гранулы коричнево-черного цвета. В контрольных препаратах окрашивание не обнаруживают.

Сущность непрямого варианта заключается в том, что он проводится в два этапа: соединение антигена с соответствующей немеченой специфической сывороткой и затем присоединение к этой смеси антивидового иммунопероксидазного конъюгата (антитела против глобулинов определенного вида животных, меченные ферментом). Учет результатов проводят, как и в первом случае, в световом микроскопе.

### Твердофазный вариант ИФА

Впервые был предложен в 1972 г. Энгваллом и Перлманном. Он успешно используется как для обнаружения бактериальных антигенов, так и специфических антител.

Метод твердофазного ИФА основан на применении антител или антигенов, фиксированных на нерастворимых носителях. В качестве носителей применяют стеклянные или нейлоновые шарики, полистироловые пробирки и микропанели. В последнее время широкое распространение получили полистироловые микропанели. Применение их и автоматизация процесса постановки и учета реакции позволяют за короткое время исследовать большое число образцов сывороток на наличие антител и другого материала на наличие бактериального антигена (рис. 66).

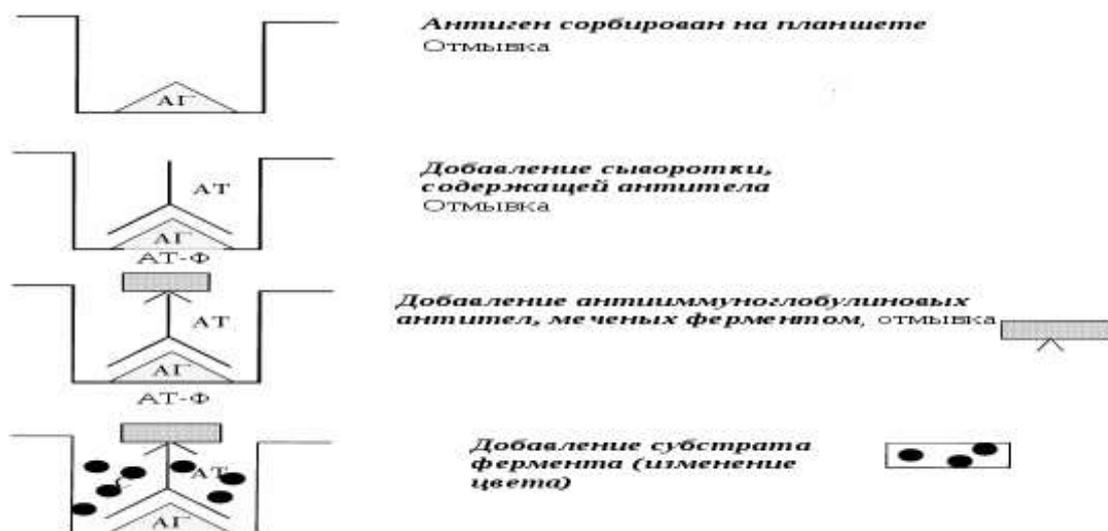


Рис. 19. Принцип выявления антител в твердофазном ИФА

Для выявления антигенов с помощью данного метода наиболее часто используют метод двойных антител (сэндвич-метод). Для этого лунки полистироловых микропанелей сенсibiliзируют гамма-глобулином, выделенным из специфической к исследуемому антигену сыворотки. Оптимальной концентрацией считается такая, при которой уровень оптической плотности положительных образцов в 5—10 раз превышает уровень отрицательных образцов. Чаще всего используют концентрацию 10 — 30 мкг/мл.

В лунки микропанелей вносят по 0,2 мл гамма-глобулина в нужной концентрации в натрия карбонатном буфере с рН 9,6. Микропанели инкубируют в течение 1 ч при 37 °С и оставляют на ночь при 4 °С. На следующий день из лунок удаляют раствор иммуноглобулинов, микропанели промывают 3 раза по 5 мин калийфосфатным буфером с рН 7,4, содержащим 0,05% твина-20. В лунки вносят по 0,2 мл раствора, содержащего исследуемый антиген, и инкубируют при 37 °С 1 ч. В контрольные лунки вносят заведомо известные положительный и отрицательный антигены. Микропанели промывают 3 раза по 5 мин калийфосфатным буфером с рН 7,4, содержащим 0,06% твина-20. Затем в лунки вносят по 0,2 мл раствора субстрата: ортофенилендиамина (ОФД) или 5-аминосалициловой кислоты (для пероксидазы). Инкубируют в темноте при комнатной температуре 5 — 30 мин. Реакцию останавливают добавлением 0,05 мл 2 н. серной кислоты (для пероксидазы) и 3 М NaOH (для щелочной фосфатазы).

Реакцию учитывают визуально по разности в окраске опытных и контрольных образцов или колориметрически при длине волны 490 нм (для пероксидазы) или 405 нм (для щелочной фосфатазы).

При использовании субстрата ортофенилендиамина положительные образцы имеют оранжево-коричневую окраску, а при применении 5-аминосалициловой кислоты — интенсивно-коричневую, контроль либо совсем не окрашен, либо окрашен в слабо-желтый цвет. При использовании щелочной фосфатазы опытные образцы окрашены в желтый цвет.

За положительный результат принимают превышение оптической плотности опытных образцов над контрольными в 5—10 раз.

Для выявления антител в ячейках полистироловых панелей фиксируют антиген аналогично описанному выше (как и для антител). Затем добавляют сыворотку, в которой предполагается наличие антител, оставляют на контакт, промывают и добавляют фермент — меченный антиглобулин, содержащий антитела к глобулинам первой сыворотки. Он фиксируется на комплексе антиген — антитело. Количество прикрепленного конъюгата измеряют после добавления субстрата (проявляющего раствора). Субстрат разлагается под действием фермента и образует цветной продукт.

### **Реакция нейтрализации (РН)**

Предложена П. Районом в 1922 г. как реакция флоккуляции. В ее основе лежит взаимодействие микробного токсина (антигена) и антител — антитоксинов, в результате чего смесь в пробирке мутнеет с последующим просветлением и выпадением осадка. В настоящее время эта реакция используется в вете-

ринарной практике как реакция нейтрализации по Эрлиху (с биопробой) в двух вариантах:

1. С целью выявления, идентификации и определения титра антител. В этом случае в качестве известного компонента используют стандартный микробный токсин.

2. Для установления наличия, идентификации и определения серотипа возбудителя заболевания и изучения его антигенов. В этом варианте применяют известную специфическую сыворотку (антитоксин).

Сущность реакции нейтрализации заключается в способности гомологичных антител иммунной сыворотки подавлять (нейтрализовать) инфекционные свойства возбудителя болезни или продуктов его жизнедеятельности.

РН характеризуется специфичностью, чувствительностью, способностью установить количественные соотношения реагентов реакции, она играет ведущую роль в диагностике бактериальных токсикоинфекций. В микробиологической практике РН в основном применяется для определения вида или типа токсигенных микроорганизмов, таких, как возбудители анаэробной энтеротоксемии, ботулизма, злокачественного отека и др.

Способность микроба продуцировать токсин называется токсигенностью, а это один из важнейших показателей вирулентности. В организме в ответ на образование и воздействие токсина вырабатываются специфические антитела — антитоксины. Они способны нейтрализовать ядовитое действие возбудителя при токсических инфекциях.

Техника постановки РН для выявления токсина *Cl. perfringens* при диагностике анаэробной энтеротоксемии не сложна, идентична в случае ее использования при других заболеваниях и заключается в следующем.

Патологический материал или микробную культуру вначале проверяют на наличие токсина. Для этого исследуемый материал (содержимое тонкого отдела кишечника или фекалии) разводят равным (1:1) или двойным (1:2) количеством физиологического раствора (в зависимости от густоты), экстрагируют при комнатной температуре в течение 1 ч, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и центрифугируют 20 — 30 мин при 5000 об/мин и опять фильтруют через обычный бумажный фильтр. Культуральную и перитонеальную жидкость фильтруют без указанной предварительной обработки. Полученные фильтраты следует немедленно (в виду быстрого разрушения токсинов) использовать для обнаружения в них токсина *Cl. perfringens*. Оставшийся материал помешают в специальную посуду, закрывают резиновыми пробками и хранят при температуре не выше +4 °С до окончания экспертизы. Наличие токсина и его типовую принадлежность выявляют при помощи биологической пробы на белых мышах, морских свинках и кроликах.

Для определения в материале токсина полученный фильтрат вводят внутривенно или внутрибрюшинно по 0,5 мл белым мышам (массой 16—18 г) или внутривенно кроликам (массой 1,5 — 2,0 кг) в дозе 1,0 — 1,5 мл. Контрольным животным вводят такое же количество материала, но прокипяченного на водяной бане в течение 20 — 30 мин. При наличии в исследуемом материале токсина *Cl. perfringens* гибель животных наступает уже через 4 — 6 ч, в зависимости

от его количества. Контрольные животные остаются живыми. Наблюдение за животными ведут в течение суток.

После обнаружения токсина приступают к постановке РН, компонентами которой являются: культура (центрифугат) или фильтрат фекалий в качестве антигена, типоспецифические сыворотки, содержащие антитела — антитоксины, чувствительные биологические объекты (белые мыши, кролики, морские свинки).

Диагностические антитоксические сыворотки *Cl. perfringens* типов А, В, С, Д, Е представляют собой нативные сыворотки крови овец, гипериммунизированных антигенами соответствующего типа *Cl. perfringens*. Диагностические сыворотки перед использованием разводят физиологическим раствором до содержания 10 антитоксических единиц (АЕ) в 1 мл и в разведенном виде применяют для постановки реакции нейтрализации токсинов. За 1 АЕ принимается то минимальное количество сыворотки, которое нейтрализует 100 ДЛМ (минимальная доза — количество культуры (центрифугата), которое вызывает гибель мышей (соответствующего токсина).

Для определения типа основного летального токсина в пять пробирок разливают исследуемый материал в объеме 1,5 мл и добавляют по 1,5 мл типоспецифической сыворотки, предварительно разведенной до 10 АЕ. В первую пробирку — сыворотку типа А, во вторую — типа В, в третью — типа С, в четвертую — сыворотку типа Д, в пятую, типа Е, в шестую — 1,5 мл физраствора. Смесь выдерживают в течение 30 — 45 мин при 37 °С в термостате. Содержимое каждой пробирки вводят внутривенно или внутривентально белым мышам или внутрикожно по 0,2 мл морским свинкам и кроликам. Для каждой сыворотки используют отдельный шприц. Наблюдение за животными ведут в течение 48 ч.

Результаты реакции учитывают по гибели белых мышей или образованию некроза у опытных и контрольных морских свинок (кроликов).

Животные, получившие смесь токсина с гомологичной антитоксической сывороткой, остаются живыми. У морских свинок и кроликов некроз не развивается. Учет результатов РН проводят в соответствии с табл. 6.

Таблица 6 - Схема определения типа возбудителя *Cl. Perfringens*

Тип <i>Cl. perfringem</i>	Токсин в исследуемом материале	Антитоксическая сыворотка				Контроль
		А	С	Д	Е	
А	Альфа	-	+ -	+ -	+ -	+
В,С,Ф	Бета	+	-	+	+	+
Д	Эпсилон	+	+	-	+	+
Е	Йота	+	+	+	-	+

Примечание. (+) — белые мыши пали, у морских свинок и кроликов некроз на месте введения;

(-) — белые мыши живы, у морских свинок и кроликов некроз отсутствует;

(+ -) — результат не учитывается.

При постановке РН по второму варианту, когда исследованию подлежит иммунная сыворотка, вначале готовят последовательные разведения сыворотки на изотоническом растворе натрия хлорида, а затем в каждую пробирку с соответствующим разведением сыворотки вносят постоянную дозу токсина в равном объеме. Смесь инкубируют при 37 °С в течение 30 — 45 мин, а затем инъецируют лабораторным животным.

### ***Контрольные вопросы***

1. Сущность и диагностическое значение ИФА.
2. Техника постановки прямого иммунопероксидазного теста.
3. Техника постановки непрямого иммунопероксидажного теста.
4. Техника постановки «сэндвич-метода» при определении антигена.
5. Техника постановки «сэндвич-метода» при определении антител.
6. Сущность, назначение и практическое применение РН.
7. Техника постановки РН для определения типа токсина в исследуемом материале.
8. Техника постановки РН для определения антитоксинов в сыворотке крови.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микробиология: учеб. пособие для вузов [Электронный ресурс] / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, А.Х. Волков, А.И. Ибрагимова. 4-е изд., стер. СПб.: Лань, 2021. 496 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/171851>
2. Петрищева Т.Ю. Практикум по общей микробиологии [Электронный ресурс]: учеб. пособие. Елец: ЕГУ им. И.А. Бунина, 2022. 89 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/331916>
3. Ромейко Л.В. Общая микробиология и микробиология: лабораторный практикум [Электронный ресурс]: учеб. пособие. Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2022. 173 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/314003>
4. Сахарова О.В., Сахарова Т.Г. Общая микробиология и общая санитарная микробиология [Электронный ресурс]. 3-е изд., стер. СПб.: Лань, 2023. 224 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/346448>

Учебное издание

Рябичева Ангелина Евгеньевна  
Андрюшина Надежда Сигизмундовна

# **ОСНОВНЫЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

учебно-методическое пособие  
для проведения лабораторных занятий по дисциплине  
«Микробиология» со студентами, обучающимися по направлению  
36.03.02 «Зоотехния»

Редактор Осипова Е.Н.

---

Подписано к печати 10.12.2024 г. Формат А4.

Бумага офсетная. Усл. п. л. 2,32. Тираж 25 экз. Изд. № 7777.

---

Издательство Брянского государственного аграрного университета  
243365 Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянский ГАУ