

1. Реакция гемагглютинации

(РГА)

метод обнаружения и идентификации вирусов, основанный на наличии у некоторых вирусов способности избирательно агглютинировать эритроциты определенных видов животных.

В основе РГА лежит феномен склеивания эритроцитов, происходящий под влиянием различных факторов. Различают прямую и непрямую гемагглютинацию.

При реакции прямой гемагглютинации происходит склеивание эритроцитов при адсорбции на них определенных антигенов, например вирусов.

В серологических исследованиях применяют реакцию торможения прямой гемагглютинации, когда выделенный у больного вирус нейтрализуют специфической иммунной сывороткой, а затем соединяют с эритроцитами. Отсутствие гемагглютинации говорит о соответствии вируса и используемой иммунной сыворотки.

Реакция непрямой гемагглютинации (пассивная гемагглютинация) наблюдается в тех случаях, когда к эритроцитам, заранее обработанным (сенсibilизированным) различными антигенами, прибавляют иммунную сыворотку или сыворотку больного, имеющую соответствующие антитела. Происходит специфическое склеивание эритроцитов, их пассивная гемагглютинация.

Реакция непрямой, или пассивной, гемагглютинации по чувствительности и специфичности превосходит другие серологические методы, и ее используют при диагностике инфекций, вызванных бактериями, риккетсиями, простейшими.

Методика постановки реакции непрямой гемагглютинации состоит из нескольких этапов. Вначале эритроциты отмывают изотоническим раствором хлорида натрия, затем при необходимости (при использовании антигенов белковой природы) их обрабатывают раствором танина 1 : 20000 и сенсibilизируют растворимыми антигенами. После отмывания буферным изотоническим раствором хлорида натрия эритроцитарный антиген готов к употреблению. Исследуемые сыворотки разводят изотоническим раствором хлорида натрия в пробирках или специальных пластмассовых пластинках с луночками, затем к каждому разведению сыворотки добавляют эритроцитарный диагностикум. Результаты реакции непрямой гемагглютинации учитывают по характеру осадка эритроцитов, образовавшегося на дне пробирки. Положительным считают результат реакции, при котором эритроциты равномерно покрывают все дно пробирки. При отрицательной реакции эритроциты в виде маленького диска или «пуговки» располагаются в центре дна пробирки.

Использование РГА

РГА используется для индикации (обнаружения) вирусов при проведении ориентировочной диагностики, для титрования вирусов по гемагглютинирующим свойствам (установление гемагглютинирующих единиц - АЕ).

Адсорбция вирусов

Основу феномена агглютинации, вызываемого вирусами, составляет адсорбция вирусов на поверхности эритроцитов, сопровождающаяся склеиванием (агглютинацией) последних и выпадением в осадок.

Антиген для РГА

В качестве антигена для РГА берут любой материал (патматериал в виде суспензии из органов, материал из зараженных КЭ, культур ткани и др.), в котором предполагается наличие вируса. Материал должен быть жидким, без крупных частичек.

Постановка ориентировочной РГА

Для постановки ориентировочной РГА на чистое и хорошо обезжиренное предметное стекло наносят одну каплю вирусосодержащего материала, к ней добавляют одну каплю 5% взвеси эритроцитов и перемешивают стеклянной палочкой.

Оценка реакции РГА

Оценивают реакцию в крестах (плюсах).

При оценке реакции в крестах обращают внимание на характер осадка. Если эритроциты осели тонким слоем равномерно по дну пробирки (в виде зонтика), реакцию оценивают в четыре креста

2. Реакция торможения гемагглютинации — серологическая реакция, основанная на способности антител предотвращать агглютинацию эритроцитов гемагглютинирующими видами вирусов (аденовирусами, арбовирусами, некоторыми энтеровирусами, вирусами гриппа и парагриппа, кори, реовирусами). Специфические противовирусные антитела взаимодействуют с поверхностными молекулами гемагглютининов вирионов этих вирусов и блокируют их связывание с комплементарными им молекулами мембраны эритроцитов.

В последнее время реакция широко используется в лабораториях клинической вирусологии для определения титров специфических антител к тем или иным вирусам, а также для серологической идентификации и типирования изолятов вирусов из клинического материала от больных. Используют несколько ограничено в силу наличия в сыворотке крови людей неспецифических ингибиторов вирусов, а также естественных антител — агглютининов.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Несмотря на своё название, принцип реакции во многом аналогичен РН вирусов, так как основан на способности АТ связывать различные вирусы и нейтрализовать их, лишая возможности агглютинировать эритроциты. Визуально этот эффект и проявляется в «торможении» гемагглютинации. РТГА применяют при диагностике вирусных инфекций для выявления специфических антигемагглютининов и идентификации различных вирусов по их гемагглютинином, проявляющим свойства Аг.

Реакция торможения гемагглютинации

(РТГА)

метод идентификации вируса или выявления противовирусных антител в сыворотке крови больного, основанный на феномене отсутствия агглютинации эритроцитов препаратом, содержащим вирус, в присутствии иммунной к нему сыворотки крови.

Реакция торможения гемагглютинации. Механизм и практическое использование.

Многие вирусы обладают способностью агглютинировать эритроциты строго определенных видов млекопитающих и птиц. Так, вирусы гриппа и эпидемического паротита агглютинируют эритроциты кур, морских свинок, человека, а аденовирусы – эритроциты крыс, мышей. В связи с этим для их обнаружения в материале больных или культурах клеток, эмбрионов и животных ставят реакцию гемагглютинации (РГА). Для этого в лунках планшетов готовят двукратно возрастающие разведения вирусосодержащих материалов и жидкостей, добавляя к ним отмытые изотоническим раствором взвеси NaCl эритроцитов. Для контроля спонтанной агглютинации эритроциты смешивают ещё с равным объемом изотонического раствора NaCl. Смеси инкубируют в термостате при температуре 37°C или при комнатной температуре.

Результаты РГА учитывают по характеру агглютинации эритроцитов через 30–60 мин, когда они обычно полностью осаждаются в контроле. Положительная реакция обозначается плюсами. «++++» –осадок в виде «зонтика», «+++» – осадок с просветами, «++» – осадок с большими просветами, «+» –хлопьевидный осадок, окруженный зоной скопированных эритроцитов, и «-» – такой же резко очерченный осадок эритроцитов в виде «пуговицы», как и в контроле

Являясь группоспецифической, РГА не дает возможности определить видовую принадлежность вирусов. Их идентифицируют с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Для ее постановки используют заведомо известные иммунные противовирусные сыворотки, которые в двукратно снижающихся концентрациях разводят в изотоническом растворе натрия хлорида и разливают по лункам. К каждому их разведению добавляют равное количество вирусосодержащей жидкости. Контролем является взвесь вируса в изотоническом растворе натрия хлорида. Планшеты со смесью сывороток и вируса выдерживают в термостате 30 мин или при комнатной температуре 2 ч, затем в каждую из них добавляют взвесь эритроцитов. Спустя 30 мин определяют титр вируснейтрализующей сыворотки (т.е. максимальное ее разведение), вызвавшей задержку агглютинации эритроцитов.

Используют РТГА в серологической диагностике вирусных болезней, в частности гриппа и аденовирусных инфекций. Ставить ее лучше так же, как и РН, с парными сыворотками. Четырехкратное нарастание титра антител во второй сыворотке подтверждает предполагаемый диагноз

3. Серологическое исследование позволяет поставить диагноз в случае обнаружения специфических антител в сыворотке больных. Для серологических реакций используют парные сыворотки, которые берут в первые дни от начала заболевания и спустя 1 - 3 недели, но изучают одновременно. Диагностическое значение имеет нарастание титра антител в 4 раза и более. РТГА, РН, РСК, РТГадс, РИФ, РИА, ИФА ставят с антигенами (диагностикума-ми), приготовленными из эталонных штаммов соответствующих вирусов.

4. Парные - это значит, что кровь дважды берут с каким-то интервалом времени. По нарастанию титра антител определяют, что заражение произошло. Если титр антител не меняется, значит, эти антитела в организме уже давно, свежего заражения нет.

Наибольшую диагностическую ценность представляет исследование парных сывороток, взятых от животных в начале и в конце заболевания (с промежутком в 14-21 день). Сыворотку отбирают в стерильные пробирки и хранят для исследования.

Описание

Набор для диагностики парвовирусной болезни свиней предназначен для обнаружения парвовирусного антигена в суспензии внутренних органов абортированных плодов в реакции гемагглютинации (РГА) и специфических антител в сыворотке крови свиней, а также новорожденных поросят (до приема молозива) в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Реакцию ставят микрометодом в лунках полистироловых пластин.

- полистироловые 96-луночные планшеты для иммунологических реакций;
- антиген специфический инактивированный, обладающий гемагглютинирующей активностью не ниже 1:128;
- сыворотка специфическая, обладающая активностью в РТГА не ниже 1:256;
- сыворотка нормальная (отрицательный контроль).

Время проведения анализа:

РГА – 2,5-3,5 часа, РТГА – 3,5-4,5 часа (не учитывая время подготовки материалов для исследования).

Принцип метода:

Реакция гемагглютинации (РГА) основана на склеивании взвешенных в жидкости эритроцитов под воздействием гемагглютинирующих свойств вируса и образования рыхлого осадка в виде зонтика. Сущность РТГА заключается в нейтрализации гемагглютинирующих свойств вируса специфическими антителами, содержащимися в сыворотке крови, в результате чего не происходит склеивания эритроцитов и они оседают на дно, образуя плотный осадок в виде пуговки.

Условия хранения

Набор хранят в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C.

После растворения компоненты набора можно хранить в замороженном состоянии в течение 1 месяца, повторное замораживание не допускается.

Срок годности

2 года.

Эритроциты (или частицы латекса) с адсорбированными на них антигенами взаимодействуют с соответствующими антителами сыворотки крови, что вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка. При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде пуговки.

Реакцию агглютинации можно проводить в микроварианте в ячейках 96-луночного планшета для иммунологических исследований с коническим дном. В лунки планшета вносят по 0,05 мл ФСБ (рН 7,2-7,4) и готовят двукратные разведения испытуемых сывороток крови от 1:2 и выше. Затем в каждую ячейку вносят по 0,005 мл суспензии грибных клеток в концентрации 100 тыс. грибных клеток в 1 мл. Планшет осторожно встряхивают и выдерживают 2 часа в термостате при 37°C, а затем 16-18 часов - при 4°C. В качестве отрицательного контроля используют нормальную (негативную) сыворотку крови и ФСБ.

Результаты реакции учитывают с помощью микроскопа и визуально и определяют в крестах по следующей схеме:

(++++) - полное просветление жидкости и образование агглютината на дне лунки в виде перевернутого "зонтика", при встряхивании "зонтик" разбивается на хлопья;

(+++) - неполное просветление жидкости и хорошо выраженный "зонтик";

(++) - заметное просветление жидкости, "зонтик" выражен умеренно;

(+) - едва заметное просветление жидкости, "зонтик" выражен слабо;

(-) - отрицательный результат, просветление жидкости не наступило, на дне лунки осадок в виде пуговки, при легком встряхивании образуется равномерная взвесь.

За титр антител принимали последнее разведение испытуемой сыворотки, в котором произошла агглютинация не менее чем в два креста (++)