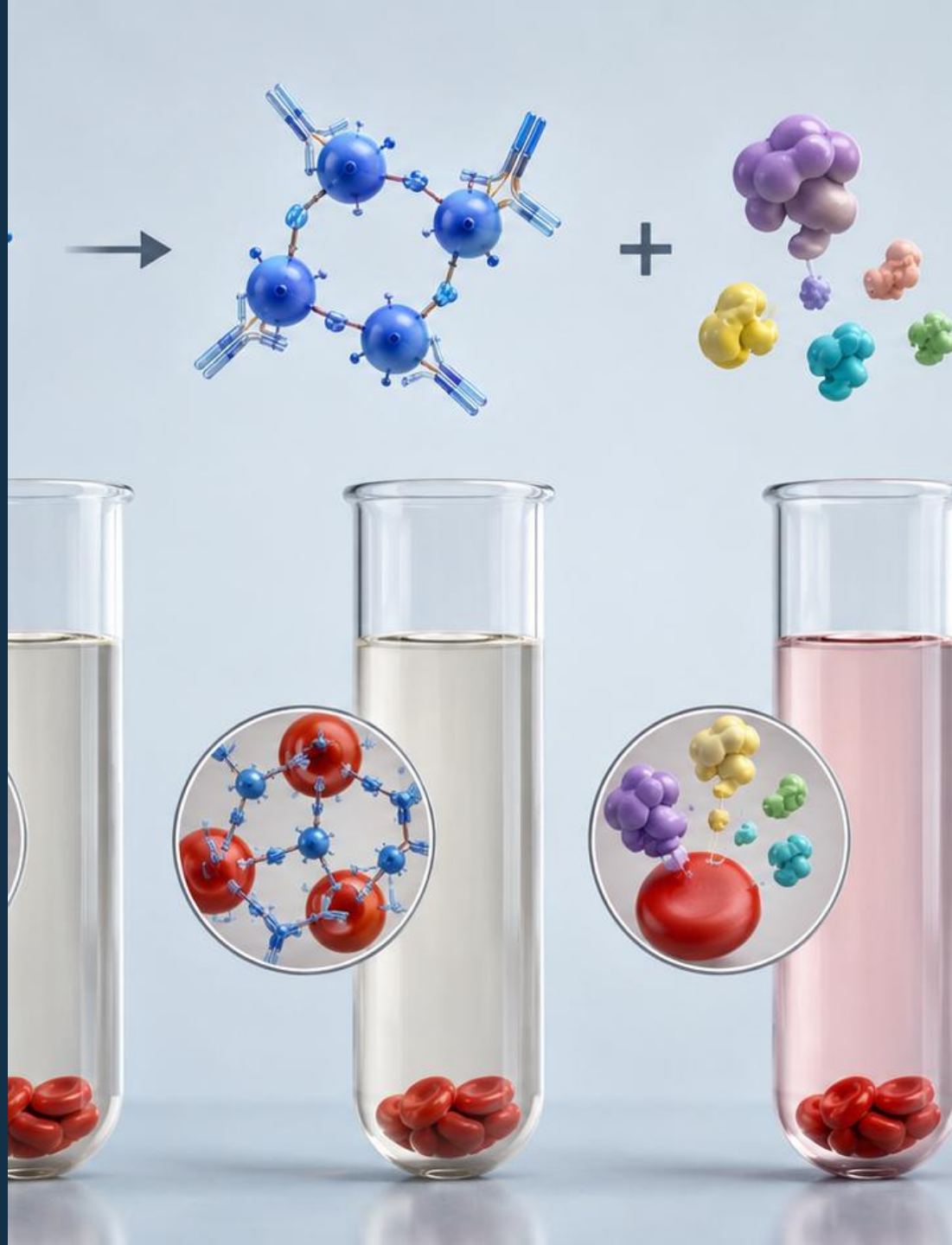
РГП на ПХВ «РВЛ» • КВКиН МСХ РК

Реакция связывания комплемента при исследовании сыворотки крови на бруцеллёз животных

Обучающая презентация: комплемент, гемолитическая система, контроль пригодности, интерпретация, кейсы и задачи

СОП-РВЛ-РСК-002-2026 • Версия №5 • дата введения 01.06.2026



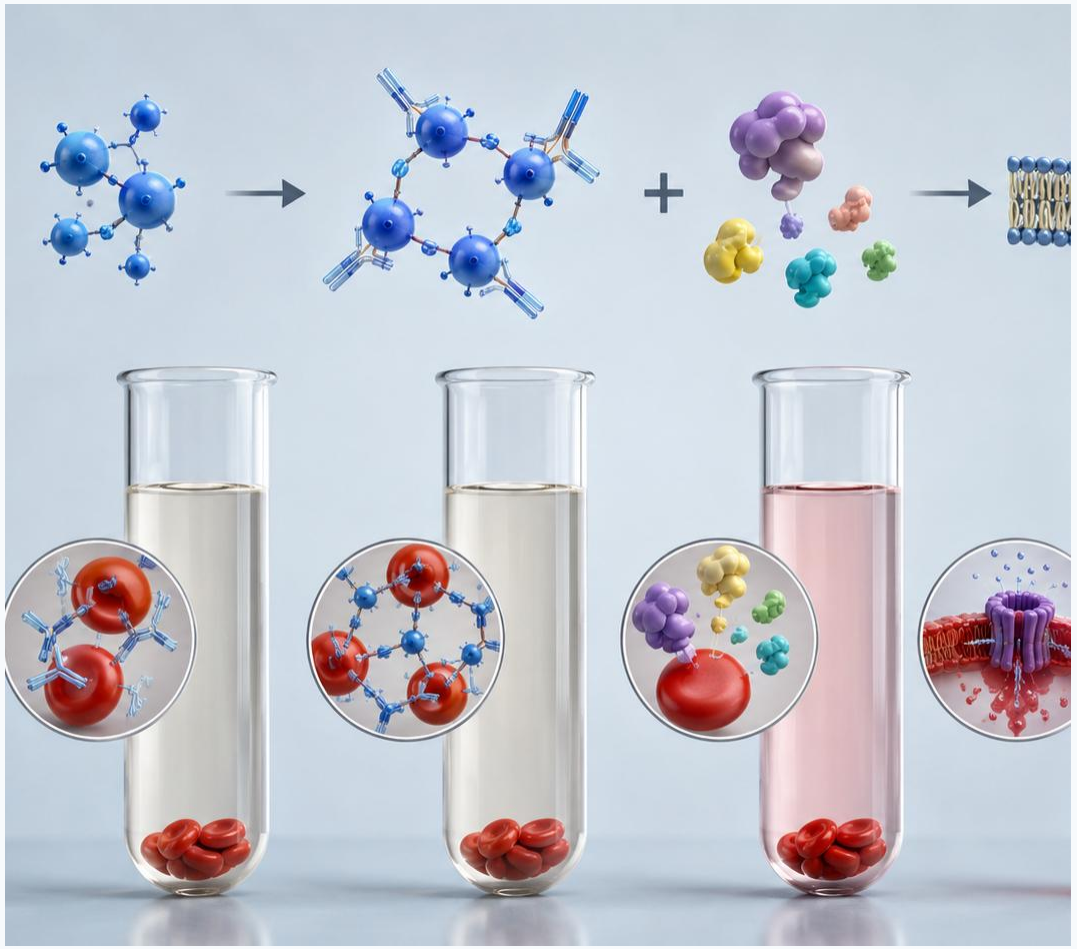
Что должен уметь работник после обучения

- объяснить иммунологическую основу РСК
- подготовить эритроциты, гемолизин, комплемент и антиген
- выполнить титрации и проверки пригодности компонентов
- поставить массовый метод и перестановку классическим методом
- оценить задержку гемолиза и оформить результат



Смысл метода РСК

- антитело и антиген образуют иммунный комплекс
- комплемент связывается иммунным комплексом и не участвует в гемолизе
- если антител нет — комплемент остается свободным и вызывает гемолиз
- по степени задержки гемолиза оценивают результат



Когда РСК особенно важна



- подтверждение положительных и сомнительных серологических реакций
- оценка реакции в системе с антигеном, комплементом и индикатором
- требует строгих контролей: антикомплементарность и гемотоксичность
- качество компонентов напрямую влияет на достоверность результата

Область применения

- КРС, МРС, верблюды, лошади, свиньи
- пушные звери, собаки и кошки
- испытуемый материал — сыворотка крови
- метод регламентирует порядок постановки РСК при бруцеллёзе животных



Биобезопасность и рабочая дисциплина



- использовать защитную одежду: халат, перчатки, маска, чепчик
- не допускать перекрестного загрязнения проб и компонентов
- обеззараживать и утилизировать биологические отходы
- немедленно сообщать о проливе, травме, нарушении упаковки

Компоненты РСК

- испытуемая сыворотка и бруцеллёзный антиген
- 0,85% физиологический раствор
- сухой комплемент
- гемолитическая сыворотка — гемолизин
- 2,5% взвесь эритроцитов барана
- позитивная и негативная контрольные сыворотки



Оборудование



- водяная баня 37–38 °C и 58–62 °C
- дозаторы, наконечники, пробирки Флоринского
- аппарат Флоринского, штативы, центрифуга
- pH-метр, таймер, дезинфицирующие средства
- маркер и карандаш для точной маркировки

Цепочка ключевой подготовки

1. промыть эритроциты
2. приготовить 2,5% взвесь
3. титровать гемолизин
4. титровать комплемент
5. проверить пригодность компонентов



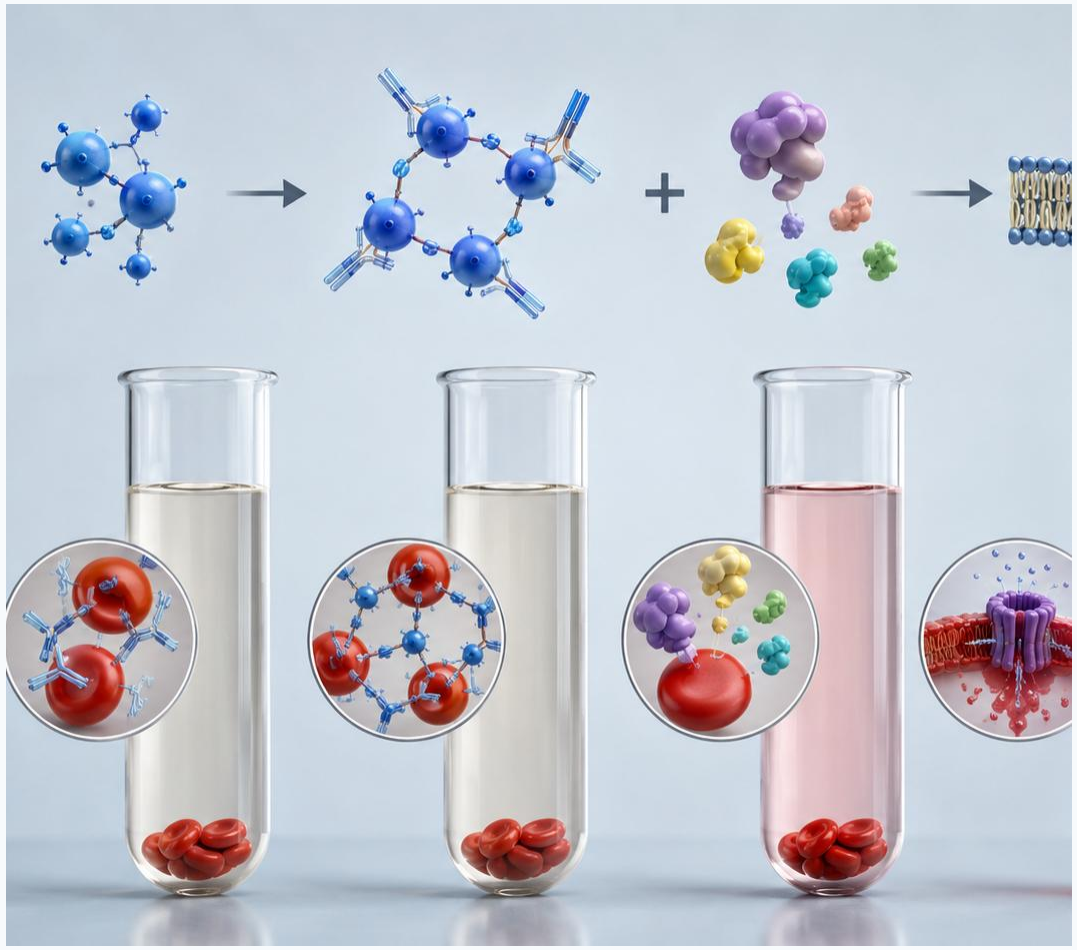
В РСК до результата есть обязательные этапы титрации и контроля пригодности.

Титрация гемолизина

- титрация проводится при поступлении новой серии
- готовят разведения примерно 1:500–1:4000
- титр — минимальное количество для полного гемолиза за 10 минут
- рабочий титр для РСК — удвоенная доза
- пример: титр 1:2000 → рабочий титр 1:1000



Титрация комплемента



- комплемент титруют перед каждой постановкой
- титр — минимальная доза, вызывающая полный гемолиз
- рабочий титр — на два интервала больше титра
- пример: титр 0,08 мл → рабочая доза 0,12 мл
- рабочие растворы для проверок готовят отдельно

Проверка пригодности компонентов

• антикомплементарность: должен быть полный гемолиз
• гемотоксичность: должна быть полная задержка гемолиза
• непригодные компоненты нельзя использовать в основной реакции
• контроль позволяет отличить истинную реакцию от влияния компонентов
• при нарушении контроля партия результатов не принимается



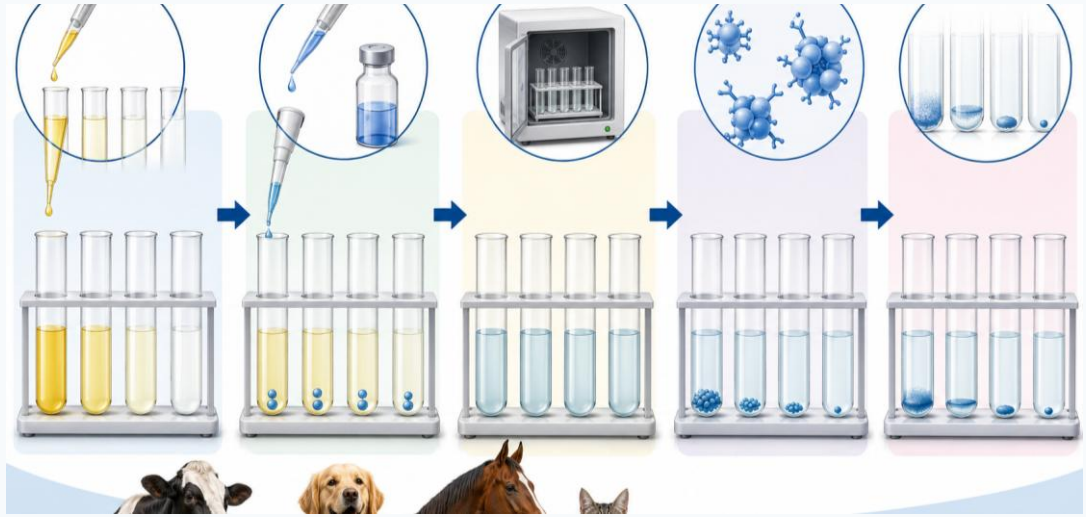
Постановка контрольных рядов



- контроли ставят один раз для всей партии проб
- позитивный ряд маркируют «#», негативный ряд — «=»
- в контролях есть пробирка без антигена для контроля сыворотки
- инактивация: КРС/МРС/верблюды 60–62 °C; свиньи 58–60 °C
- после антигена и комплемента вносят гемолитическую систему

Алгоритм массового исследования

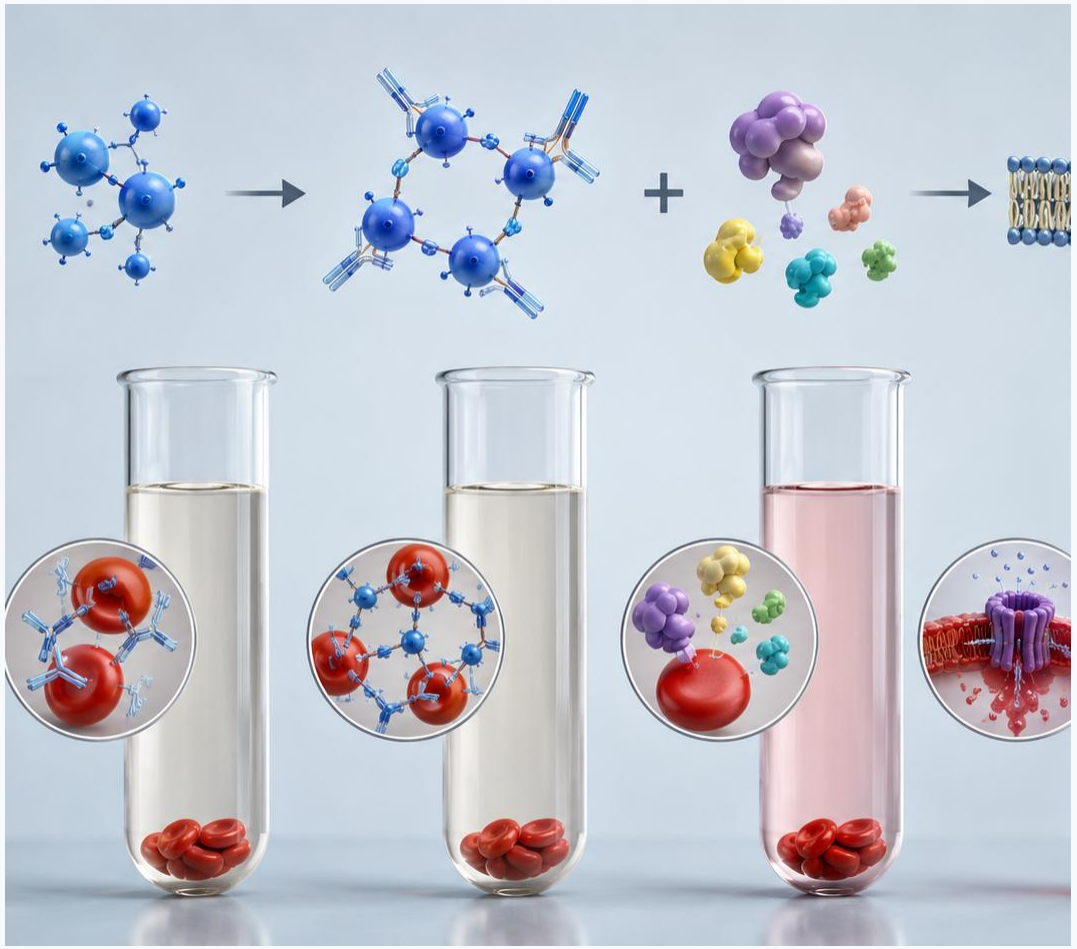
1. развести сыворотку 1:5
2. инактивировать 30 минут
3. внести антиген и комплемент
4. 20 минут при 37–38 °C
5. внести гемолитическую систему и учесть



Положительные или сомнительные реакции переставляют классическим методом.

Шкала гемолиза

- ++++: гемолиза нет, осадок 100% эритроцитов
- +++: гемолиз 25%, осадок 75%
- ++: гемолиз 50%, осадок 50%
- +: гемолиз 75%, осадок 25%
- –: полный гемолиз, жидкость интенсивно окрашена



Решение по результату



- положительно: задержка гемолиза 2–4 креста в одном/двух разведениях с антигеном
- условие: в пробирке без антигена должен быть полный гемолиз
- сомнительно: задержка гемолиза на 1 крест при полном гемолизе без антигена
- отрицательно: полный гемолиз во всех пробирках
- нет полного гемолиза без антигена — оценка недействительна

Типичные ошибки и профилактика

- неверная температура инактивации сывороток
- использование нетитрованного комплемента перед постановкой
- плохая промывка эритроцитов барана
- нераздельное приготовление рабочих растворов для контроля и опыта
- учет результатов без выдержки 1–2 часа после водяной бани



Документирование и хранение данных



- рабочий журнал и опись отбора проб
- журнал серологических исследований №10-вет
- ИС VetLab и протокол испытания
- расход компонентов — журнал титрации и АС SimBase
- подпись ветеринарного врача и заведующего лабораторией

Кейс 1. РСК: задержка гемолиза

Исходные данные

В пробирке 1:5 с антигеном — ++. В пробирке 1:10 с антигеном — +. В пробирке без антигена — полный гемолиз. Контроли партии сработали корректно.

Задания

- оценить реакцию
- обосновать роль пробирки без антигена
- указать итоговый статус
- сформулировать запись в журнале

Кейс 2. Подозрение на антикомплементарность

Исходные данные

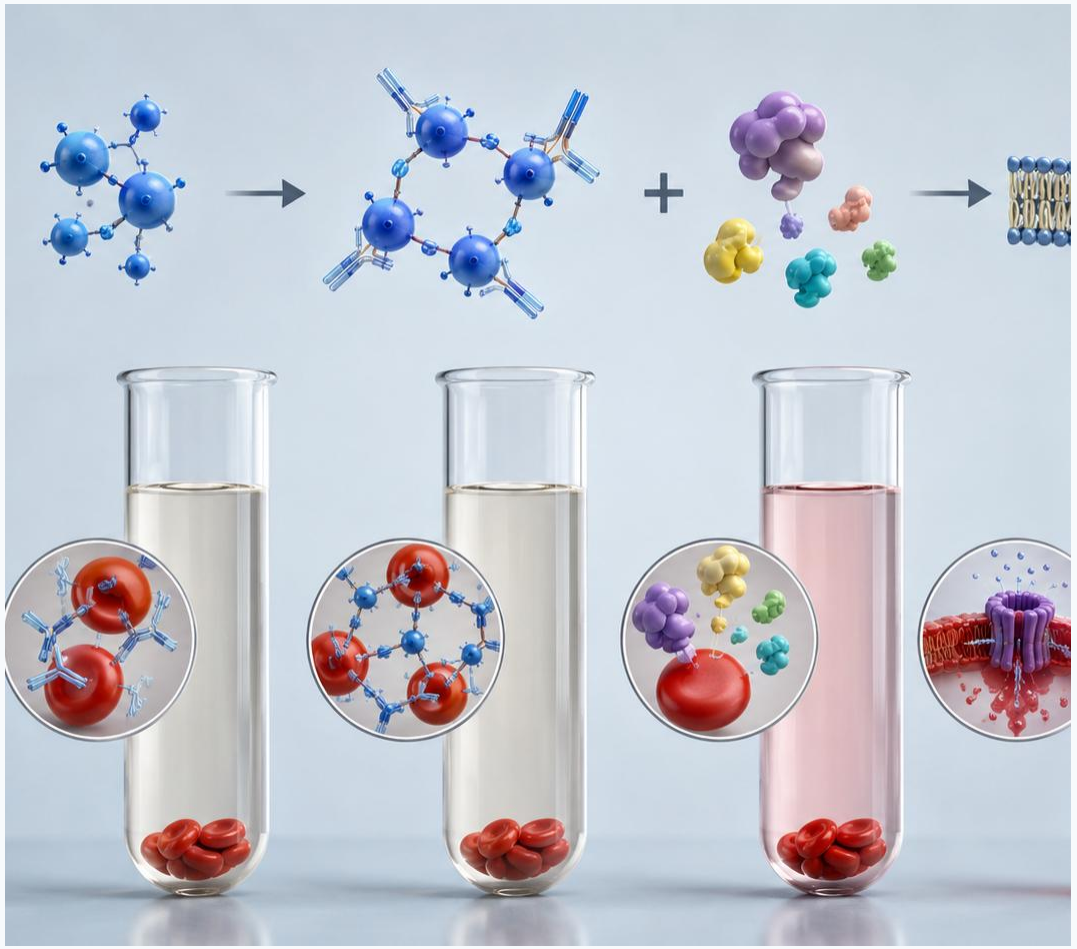
В пробирке без антигена нет полного гемолиза. В пробирке с антигеном также наблюдается задержка гемолиза. Позитивный и негативный контроль поставлены, но контроль сыворотки вызывает сомнение.

Решение

- можно ли считать результат положительным?
- какую проверку нужно повторить?
- какой риск для достоверности?
- что сообщить заведующему лабораторией?

Практические задачи

- По титрации комплемента полный гемолиз впервые получен при 0,08 мл. Определите рабочий титр.
- Опишите, какие компоненты входят в гемолитическую систему.
- Составьте алгоритм действия при сомнительном результате +.
- Назовите критерий пригодности контроля на антикомплементарность.



Итоговые вопросы для тестирования

1. Что происходит с комплементом при наличии антител?
2. Что означает полный гемолиз в отрицательной реакции?
3. Когда титруют комплемент?
4. Что такое рабочий титр комплемента?
5. Какая система вносится после первой инкубации?
6. Когда реакция считается положительной?
7. Что означает пробирка без антигена?
8. Где фиксируют результаты исследования?

Ответы и подсказки для преподавателя

1) Он связывается иммунным комплексом антиген–антитело.
2) Комплемент остался свободным и разрушил эритроциты.
3) Перед каждой постановкой РСК.
4) Два интервала больше титра комплемента.
5) Гемолитическая система: гемолизин + эритроциты барана.
6) Задержка гемолиза на 2–4 креста при полном гемолизе без антигена.
7) Контроль сыворотки / исключение антикомплементарности.
8) Рабочий журнал, №10-вет, VetLab и протокол испытания.

Краткий чек-лист перед работой

- проверить эритроцитарную взвесь и растворы
- уточнить титр гемолизина и комплемента
- оценить антикомплементарность и гемотоксичность
- соблюдать температуры инактивации и инкубации
- обязательно проверить пробирку без антигена

