

## ***Занятие 12***

Реакция агглютинации и ее варианты (развернутая и ориентировочная).  
Реакция гемагглютинации (РГА). Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА). Реакция Кумбса.  
Реакция иммобилизации подвижных бактерий. Реакция преципитации и ее варианты (кольцепреципитация, иммунодиффузия в геле, иммуноэлектрофорез). Реакция нейтрализации токсина (РНТ). Реакция радиальной иммунодиффузии (РИД).

**dos. V.Nərimanov**  
**prof. A.Qurbanov**

## Обсуждаемые вопросы:

- 1. Сущность реакции агглютинации.
- 2. Механизм реакции агглютинации.
- 3. Виды реакций агглютинации: ориентировочная, развернутая. Диагностический титр.
- 4. РГА (реакция гемагглютинации), РТГА (реакция торможения гемагглютинации).
- 5. РПГА (реакция пассивной гемагглютинации).
- 6. Реакция Кумбса (прямой и непрямой вариант).
- 7. Реакция иммобилизации подвижных бактерий.
- 8. Сущность реакции преципитации.
- 9. Механизм реакции преципитации
- 10. Варианты реакции преципитации:
  - кольцепреципитация.
  - преципитация в геле: двойная иммунодиффузия (по Оухтерлони), радиальная иммунодиффузия.
  - иммуноэлектрофорез.
  - встречный иммуноэлектрофорез.
- 11. Реакция нейтрализации токсина, значение, применение.
- 12. Реакция радиальной иммунодиффузии.

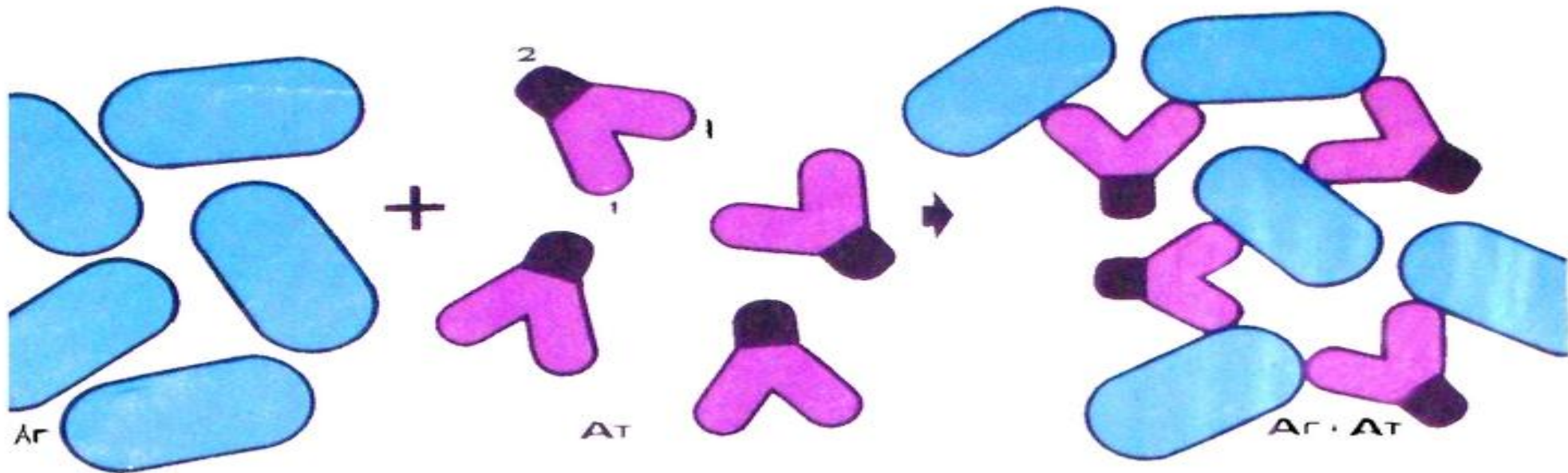
## Цель занятия:

- ознакомить студентов с сущностью, механизмом и видами реакции агглютинации и научить методам ее постановки. Объяснить РГА, РТГА, РПГА, реакции Кумбса и иммобилизации. Ознакомить студентов с сущностью, механизмом, видами, методами постановки и применением реакции преципитации. Объяснить сущность реакций нейтрализации токсина и радиальной иммунодиффузии.

# ***РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ***

## ***(механизм)***

• **Реакция агглютинации** – РА (от лат. ***agglutinatio*** – склеивание) – связывание антителами корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов или других клеток, нерастворимых частиц с адсорбированными на них антигенами, а также макромолекулярных агрегатов). Антитела, способствующие связыванию антигенов называют агглютинидами, клетки микробов участвующих в РА – агглютиногенами.



## РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (применение )

Реакции агглютинации используют для определения антител в сыворотке крови больных при помощи известных антигенов и определения возбудителя при помощи известных антител.

- ***Серологическая идентификация микроорганизмов***  
выделенных от больного проводится с помощью иммунных диагностических сывороток, содержащих специфические антитела.
- С целью обнаружения ***в сыворотке крови специфических антител*** используются реакции Райта, Хеддельсона, Видаля и пр.

# Варианты реакций агглютинации

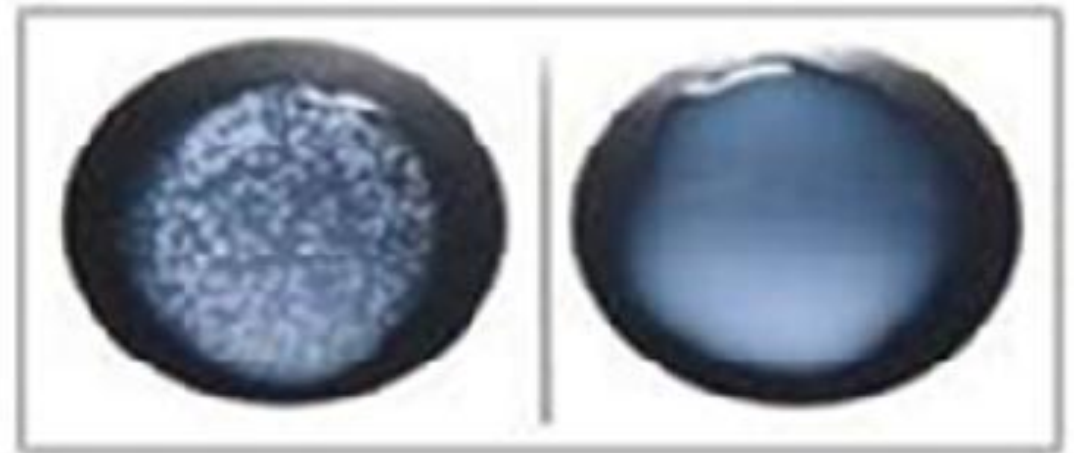
Существует несколько вариантов реакции агглютинации:

- **ориентировочная,**
- **развернутая,**
- **непрямая и др.**

# Ориентировочная реакция агглютинации

Обычно проводится с целью серологической идентификации микробов

- На предметном стекле смешивают каплю диагностической агглютинирующей сыворотки и каплю исследуемого микроба
- При положительной реакции через несколько минут в капле с сывороткой и микробом появляются хлопья



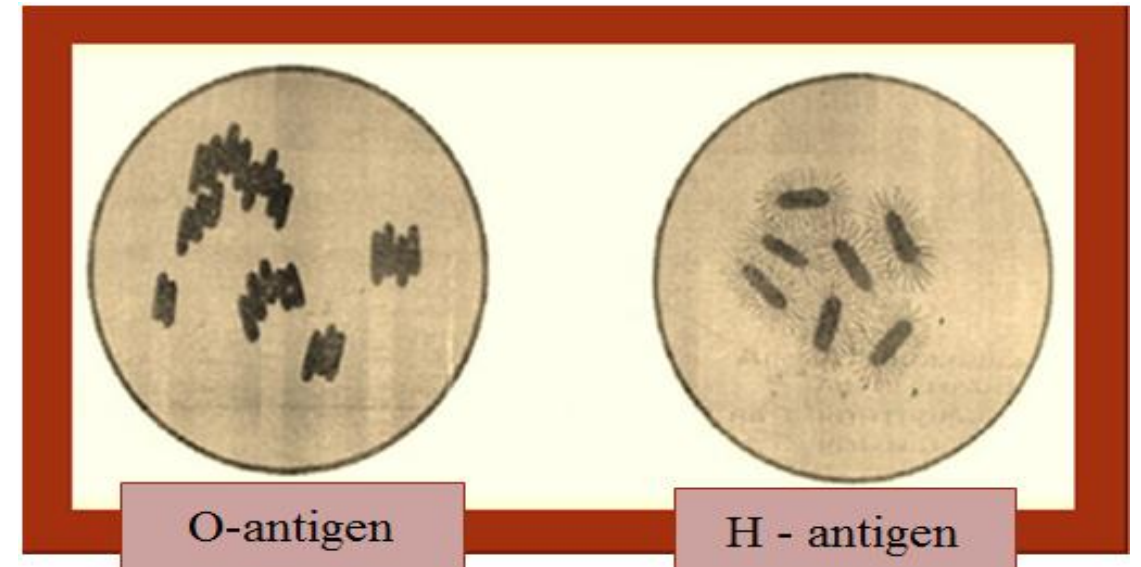
Тәcrүбә «+»

Kontrol «-»

# О- и Н-агглютинация

В зависимости от антигенных свойств бактерий существуют несколько видов агглютинации:

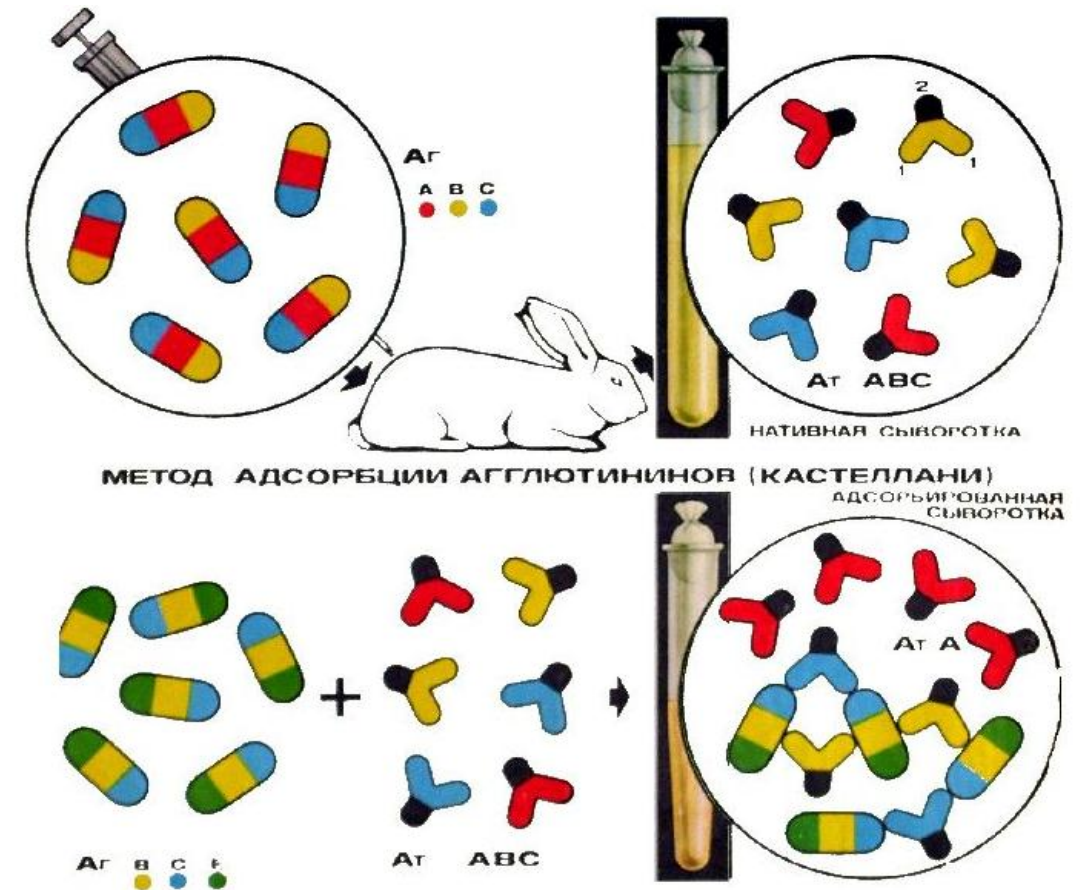
- О-агглютинация - бактерии агглютинируются посредством соматического антигена, при этом образуются мелкие компактные зерна
- Н-агглютинация – бактерии склеиваются друг с другом через жгутики (Н-антиген), при этом образуются рыхлые хлопья





# Получение адсорбированных агглютинирующих сывороток

- Разные родственные бактерии могут агглютинироваться одной и той же диагностической агглютинирующей сывороткой, что затрудняет их идентификацию.
- Поэтому пользуются **адсорбированными агглютинирующими сыворотками**, из которых удалены перекрестно реагирующие антитела путем адсорбции их родственными бактериями. В таких сыворотках сохраняются антитела, специфичные только к данной бактерии. Получение таким способом **монорецепторных диагностических агглютинирующих сывороток** было предложено А. Кастеллиани (1902).



**Ориентировочная реакция агглютинации используется также для получения ориентировочных результатов в серологической диагностике.**

- Для этого сыворотку пациента смешивают на предметном стекле с соответствующим диагностикумом
- При положительной агглютинации, проводится развернутая реакция для определения титра антител.

# Развернутая реакция агглютинации

Проводится для определения титра антител в сыворотке больного

Для этого готовят двухкратные серийные разведения сыворотки больного - 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, затем в каждую пробирку вносят суспензию диагностикума, и культивируют при 37<sup>0</sup>С в течение 2 часов, далее при комнатной температуре 16-18ч

# **Ингредиенты и оборудование, необходимые для постановки развернутой реакции агглютинации**

- Исследуемая сыворотка крови
- Культура микроба или диагностикум (корпускулярный антиген)
- Физиологический раствор
- Пипетки
- Пробирки в штативе

## **Получение сыворотки для реакции агглютинации**

Для проведения теста обычно берут кровь взятую стерильно из локтевой вены или из пальца 1-2 мл или палце. Для отделения сыворотки кровь выдерживают в пробирках в термостате в течение 1 часа 10-15 минут, чтобы она хорошо свернулась. Свернувшуюся кровь отделяют от стенки пробирки острым концом пастеровской пипетки, затем флаконы выдерживают в холодильнике до полного отделения сыворотки от крови, сыворотку отсасывают стерильной пипеткой и переливают в еще одну пробирку. Если сыворотка мутная, ее следует центрифугировать.

## Приготовление диагностикума

Микробную эмульсию (антиген) для реакции агглютинации получают промыванием 18-24-часовой агаровой культуры физиологическим раствором. Чаще для РА используют *готовые диагностикумы*

Для промывания культуры в пробирку стерильной пипеткой добавляют физиологический раствор в количестве, достаточном для покрытия боковой поверхности агара.

После замачивания культуры пробирку вращают между двумя руками, чтобы промыть культуру.

Пробирку выдерживают некоторое время, затем эмульсию пипеткой переносят в чистую пробирку.

## Разведение сыворотки крови

- Перед постановкой реакции готовят исходное разведение испытуемой сыворотки
- В отдельной пробирке смешивают 0,2 мл сыворотки с 1,8 мл физиологического раствора, таким образом получают рабочее разведение сыворотки в соотношении 1:10.

# Проведение развернутой реакции агглютинации

Реакцию проводят в пробирках или в планшетах

- В каждую из пробирок добавляют 1 мл физиологического раствора
- Затем 1 мл рабочего разведения сыворотки добавляют в 1-ю пробирку, смешивают, берут 1 мл и переносят во 2-ю пробирку, со 2-ой в 3-ю, с 3-ей в 4-ую и т. д. из последней же пробирки удаляется 1 мл. Таким образом, получают 1:20, 1:40, 1:80, 1: 160, 1: 320 и т.д. разведения сыворотки крови.
- В качестве контроля сыворотки в предпоследнюю пробирку вносят только 1 мл исходного разведения сыворотки. В последнюю пробирку помещают контроль антигена – к раствору хлорида натрия добавляют суспензию микробов



## Учет результатов

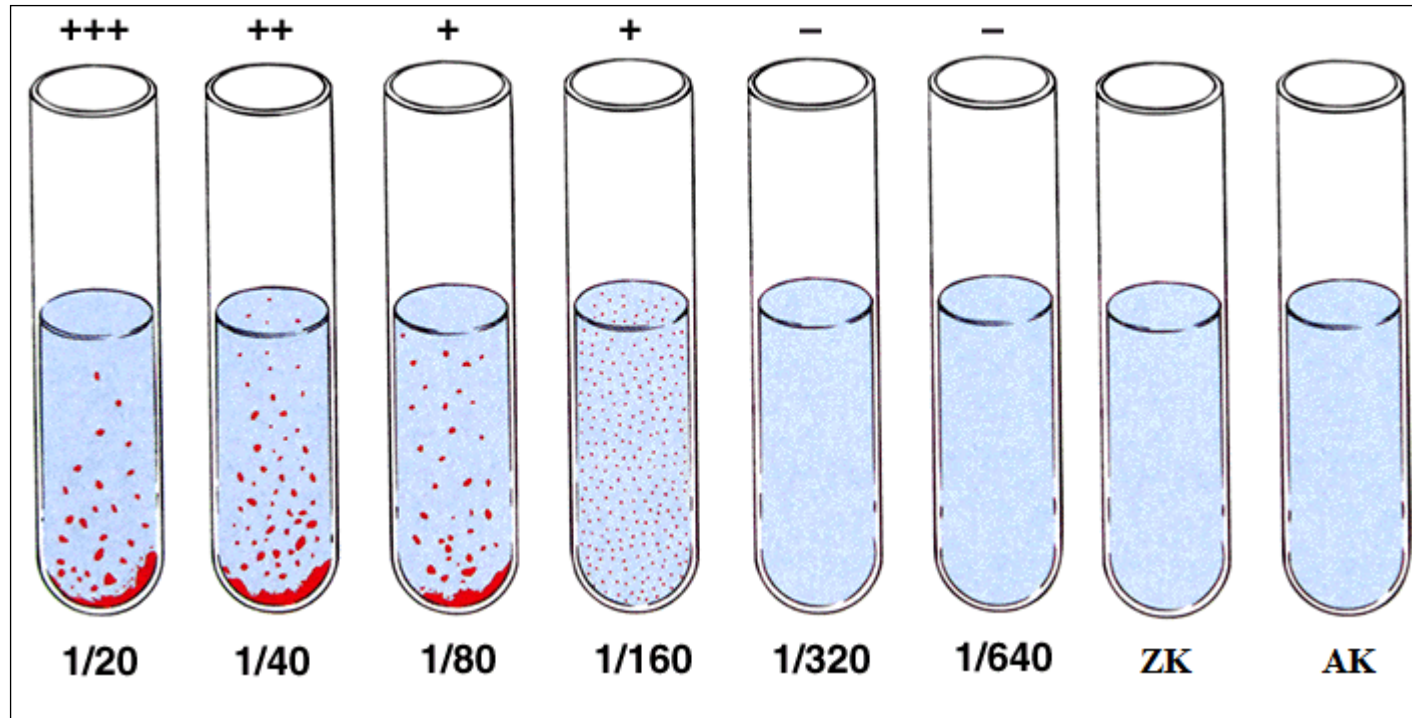
При постановке реакции агглютинации в пробирке учет результатов проводят по 4-крестовой системе:

- (++++ ) - полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями;
- (++++) - почти полное просветление жидкости с хорошо выраженными хлопьями;
- (++) - агглютинат неотчетливо выражен на фоне мутной жидкости;
- (+) - незначительное количество агглютината на фоне мутной жидкости
- Отсутствие агглютината соответствует отрицательному результату

# Титр реакции агглютинации

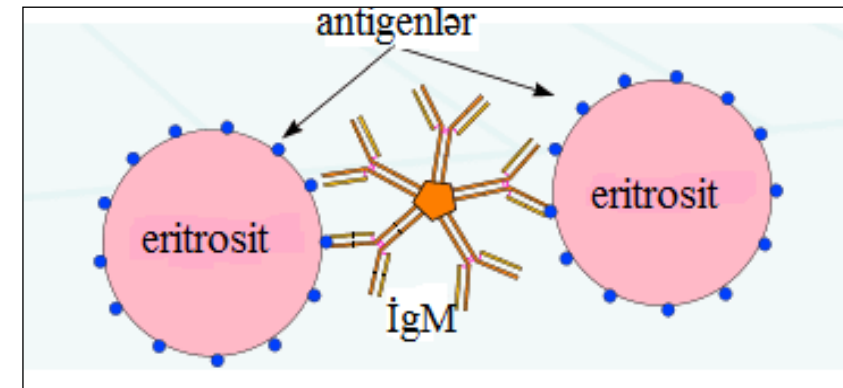
- Если в опытных пробирках наблюдается явная (++) агглютинация при отсутствии агглютинации в контрольных пробирках, реакция считается положительной. Наибольшее разведение сыворотки крови, дающее агглютинацию считают **титром реакции агглютинации**
- Определение титра реакции имеет важное значение при диагностике. Из за того, что нормальные антитела сыворотки могут вызывать реакцию агглютинации даже в небольших разведениях, необходимо определение «диагностического титра» реакции для каждой болезни. Таким образом **диагностический титр** – это наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается положительная реакция

## Развернутая реакция агглютинации (КС -контроль сыворотки, КА-контроль антигена)



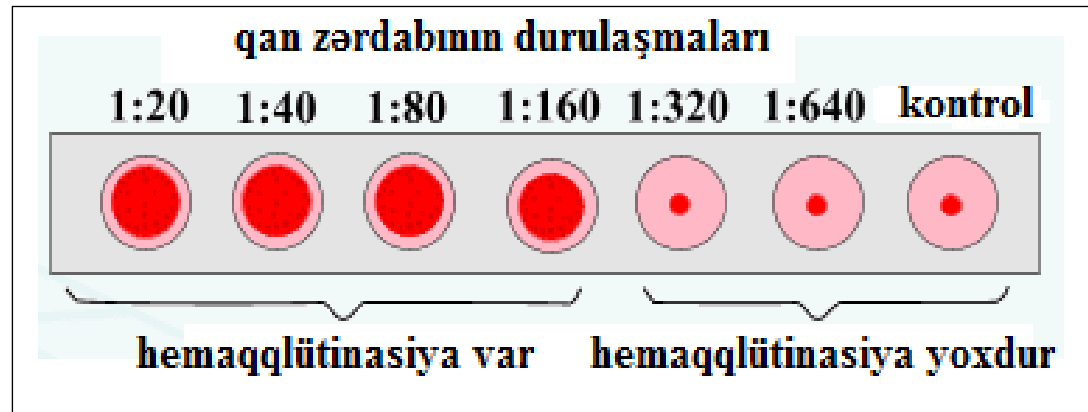
# Реакция пассивной гемагглютинации

- Основана на использовании эритроцитов или латекса с адсорбированными на их поверхности антигенами или антителами, взаимодействие которых с соответствующими антителами или антигенами вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка («зонтика»). При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговки».
- Обычно в РНГА выявляют антитела с помощью антигенного эритроцитарного диагностикума, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами.



# Техника реакции пассивной гемагглютинации

- Обычно в РНГА выявляют антитела с помощью антигенного **эритроцитарного диагностикума**, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами
- В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных разведений сыворотки больного. В предпоследнюю лунку планшета добавляют 0,5 мл положительной сыворотки, в последнюю - 0,5 мл физиологического раствора (контроль). Затем во все лунки добавляют 0,1 мл эритроцитарного диагностикума, перемешивают и выдерживают смесь в термостате в течение 2 часов.
- **При положительном результате** эритроциты агглютинируются и выпадают в осадок в виде перевернутого зонтика, **при отрицательном результате** эритроциты скапливаются в центре лунки, образуя пуговку



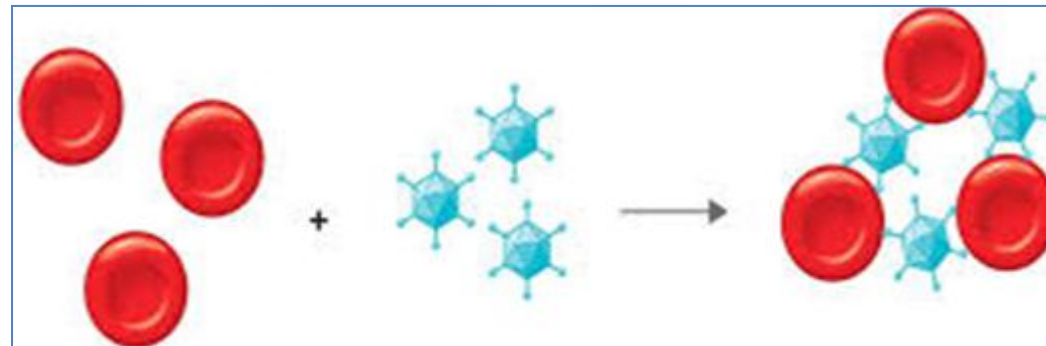
# Реакция гемагглютинации

**Реакция гемагглютинации**— реакция склеивания эритроцитов, бывает серологической и не серологической.

- ***Серологическая реакция гемагглютинации*** — основана на взаимодействии антигенов эритроцитов (гемагглютиногенов) с антителами в сыворотке крови (гемагглютинидами) и используется для определения групп крови.
- ***Не серологическая реакция гемагглютинации*** основана на способности антигенов некоторых вирусов (гемагглютининов) агглютинировать эритроциты различных животных и используется при индикации (обнаружении) вирусов.

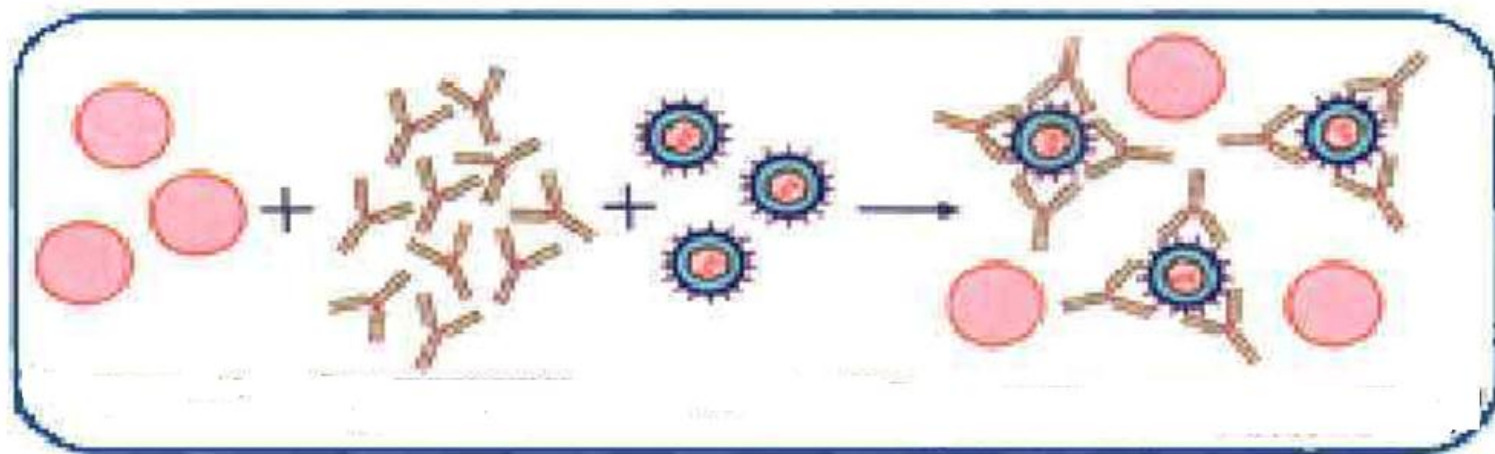
# Техника не серологической реакции гемагглютинации

- Реакцию ставят в лунках плексигласового планшета
- В лунки вносят двухкратные разведения вируссодержащего материала (аллантоисная жидкость куриного эмбриона).
- В качестве контроля в отдельную лунку добавляют 0,5 мл аллантоисной жидкости, взятой из неинфицированного куриного эмбриона. Затем к каждому разведению добавляют 0,5 мл 1% суспензии куриных эритроцитов. Результат реакции регистрируют через 40 минут после оседания эритроцитов в контрольной лунке.
- **При положительной реакции** осадок эритроцитов зернистый и располагается на дне лунки в виде зонтика, **при отрицательной реакции** осадок плотный, округлой формы в виде пуговки.
- В контрольной лунке гемагглютинация отсутствует



# Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

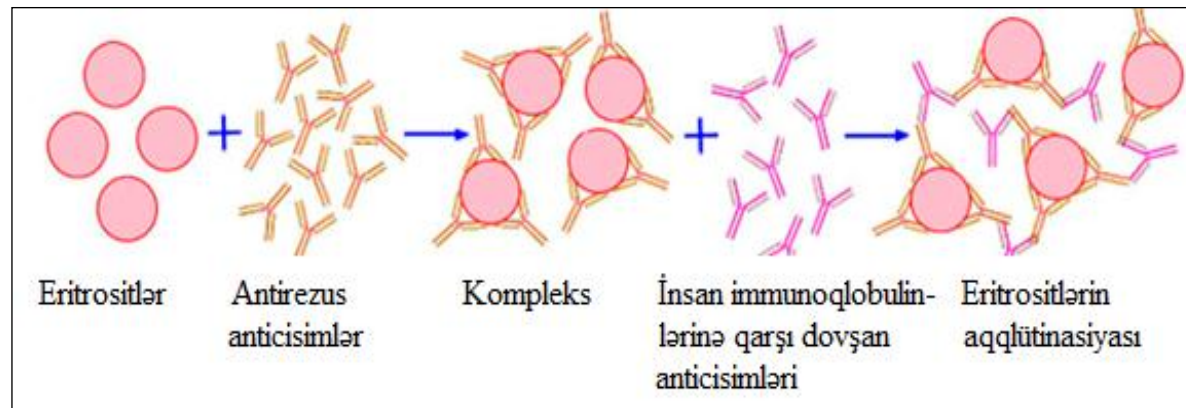
- РТГА применяют для диагностики многих вирусных болезней, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита и др.) могут агглютинировать эритроциты различных животных.
- Для определения вида и типа вирусов в исследуемом материале, добавляют сыворотки, содержащие антитела к определенным вирусам. При подавлении антигенов вирусов антителами иммунной сыворотки, вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты, происходит реакция ***реакция торможения гемагглютинации***





# Реакция Кумбса

- Определение **неполных антител** в сыворотке крови имеет диагностическое значение при некоторых инфекциях. Неполные антитела имеют один активный центр, и при связывании их с антигеном, образованный иммунный комплекс невозможно наблюдать. Причиной этого явления может быть экранирование одного из антигенсвязывающих центров мономерной молекулы Ig, а также недостаточное число или малая доступность антигенных детерминант на молекуле антигена. В связи с этим их еще называют непреципитирующими или блокирующими антителами. Выявить неполные антитела можно при помощи **реакции Кумбса** – путем использования «вторых», антииммуноглобулиновых антител.
- Для постановки реакции необходима антиглобулиновая сыворотка, содержащая полные АТ. Неполные антитела предварительно инкубируют с корпускулярным антигеном и вносят антиглобулиновую сыворотку. При наличии в исследуемой сыворотке крови соответствующих антител, они связываются с диагностикумом, образуя при этом комплекс антиген-антитело. Одна молекула полных антител связывается с двумя молекулами неполных АТ, связавших антиген, в результате происходит видимая агглютинация.



# Реакция Кумбса

Реакция Кумбса также применяется при **диагностике резус-конфликта**, так как против резус-антигенов образуются неполные антитела

- Резус-конфликт — это гуморальный иммунный ответ резус-отрицательной матери на эритроцитарные антигены резус-положительного плода, при котором у матери образуются антирезусные антитела. При попадании в кровь ребёнка через плаценту эти антитела матери вызывают гемолиз эритроцитов плода, что приводит к развитию гемолитической болезни
- Для обнаружения антирезусных антител к сыворотке матери добавляют резус-положительные эритроциты и антиглобулиновую сыворотку (антитела к человеческим иммуноглобулинам). Если реакция положительная, наблюдается агглютинация эритроцитов

# **РЕАКЦИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ**

**Подвижные  
бактерии**

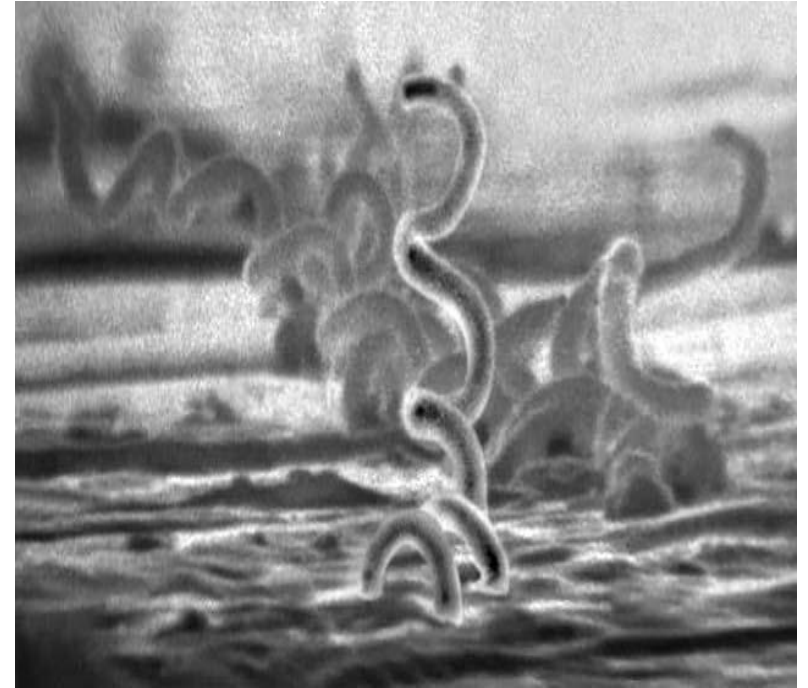
**+ Антитела + Комплемент**



**Обездвиживание бактерий**

# Реакция иммобилизации подвижных бактерий

- Способность иммунных сывороток вызывать иммобилизацию подвижных бактерий связано с наличием специфических антител, которые проявляют свое действие в присутствии комплемента.
- Иммобилизирующие антитела обнаружены при сифилисе, холере и некоторых других инфекционных заболеваниях.
- Это послужило основанием для разработки реакции иммобилизации трепонем, которая по своей чувствительности и специфичности превосходит другие серологические реакции, используемые при лабораторной диагностике сифилиса



# Реакция иммобилизации возбудителя сифилиса

| ингредиенты<br>(ml)                            | опыт           |               |      |      |      | Контроль ингредиентов |      |      |      |
|------------------------------------------------|----------------|---------------|------|------|------|-----------------------|------|------|------|
|                                                | Номер пробирок |               |      |      |      |                       |      |      |      |
|                                                | 1<br>опыт      | 2<br>контроль | 3    | 4    | 5    | 6                     | 7    | 8    | 9    |
| Инактивированная<br>исследуемая сыворотка      | 0,05           | 0,05          |      |      |      |                       |      |      |      |
| Активированный<br>комплемент                   | 0,15           |               | 0,15 |      | 0,15 |                       | 0,15 |      |      |
| Инактивированный<br>комплемент                 |                | 0,15          |      | 0,15 |      | 0,15                  |      | 0,15 |      |
| Антиген                                        | 0,35           | 0,35          | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35                  | 0,35 | 0,35 | 0,35 |
| Инактивированная<br>положительная<br>сыворотка |                |               | 0,05 | 0,05 |      |                       |      |      |      |
| Инактивированная<br>отрицательная<br>сыворотка |                |               |      |      | 0,05 | 0,05                  |      |      |      |

# Реакция преципитации

- При связывании корпускулярных антигенов с антителами происходит агглютинация. При связывании растворимых антигенов (*преципитиногенов*) со специфическими антителами (*преципитинами*) наблюдается *реакция преципитации*.
- ***Реакция преципитации*** – РП (от лат. *praecipito* – осаждать) – это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого преципитатом. Он образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах; избыток одного из них снижает уровень образования иммунного комплекса.

# Реакция преципитации

- Реакции преципитации которые ставят *в жидких средах* проявляются в виде мути, *в плотных средах* (в гелях, питательных средах) реакция проявляется в виде полос преципитации.
- В соответствии с этим существуют разные варианты реакции

# Реакция кольцепреципитации

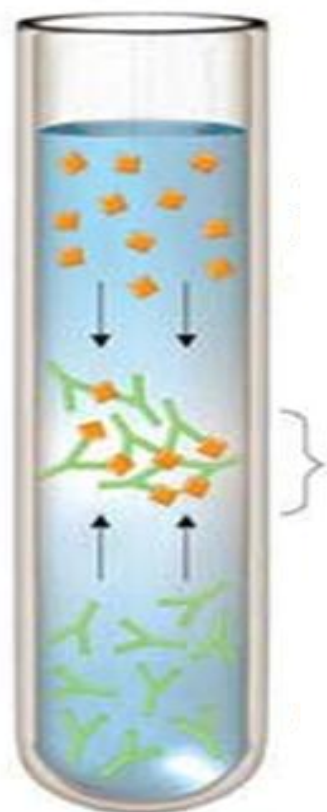
- Реакцию проводят в узких преципитационных пробирках с иммунной сывороткой, на которую наслаивают растворимый антиген. При положительном результате на границе этих двух растворов образуется непрозрачное **кольцо преципитата**
- Для образования реакции преципитации главным условием является то, что антиген и иммунная сыворотка не должны смешиваться. В противном случае возникает диффузное помутнение.
- В качестве примера кольцепреципитации проводят реакцию термопреципитации **по Асколи** (при сибирской язве).



## Постановка реакции ко́льцепреципитации

- При постановке реакции в пробирку с малым диаметром наливают 0,2 мл преципитирующей сыворотки, затем пастеровской пипеткой осторожно наслаивают на сыворотку 0,2 мл растворенного антигена так, чтобы он не смешивался с сывороткой
- К иммунной сыворотке в контрольной пробирке добавляют соответствующее количество физраствора. Пробирки аккуратно помещают в штатив в вертикальном положении, не смешивая при этом жидкости.
- В зависимости от типов антигенов и антител, результаты реакции учитываются через 5-10 минут, 1-2 часа или 20-24 часа. При положительной реакции на границе сыворотки и исследуемого антигена в пробирке образуется белое кольцо преципитата.

# Реакция кольцепреципитации



Антиген

Видимый  
преципитат

Иммунная  
сыворотка



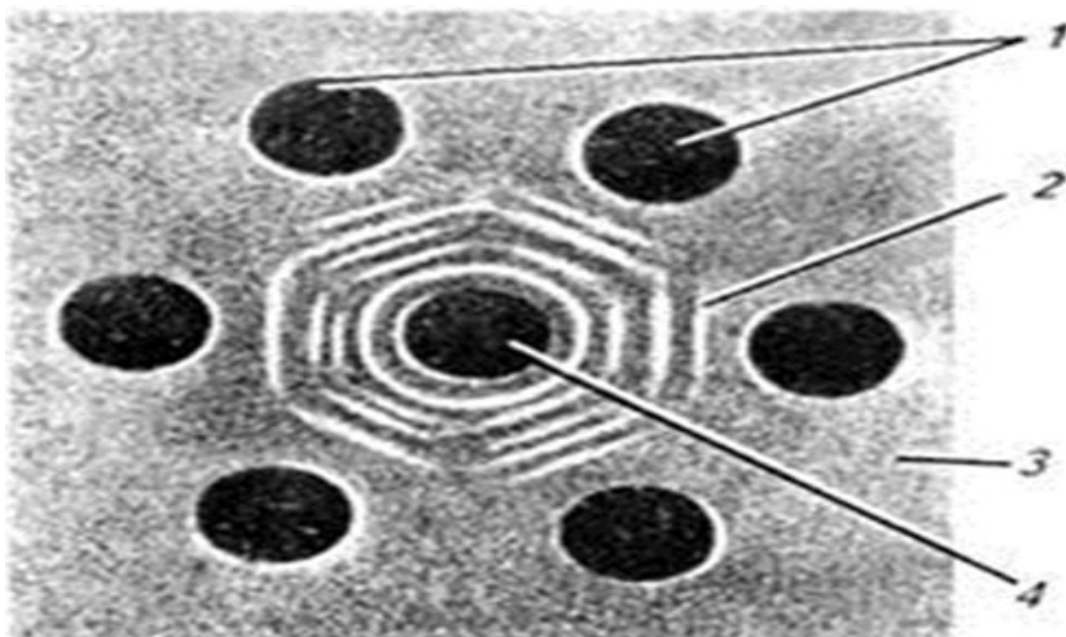
## Реакция преципитации в агаре (геле)

- Реакцию проводят в твердой фазе, представляющей собой агар или гель.
- Антиген и антитело диффундируют в плотную среду навстречу друг к другу, и на месте их встречи образуются полосы преципитата
- Широкое распространение получили разновидности реакции преципитации в геле агара или агарозе: **двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез** и др.

## Двойная иммунодиффузия по Оухтерлони

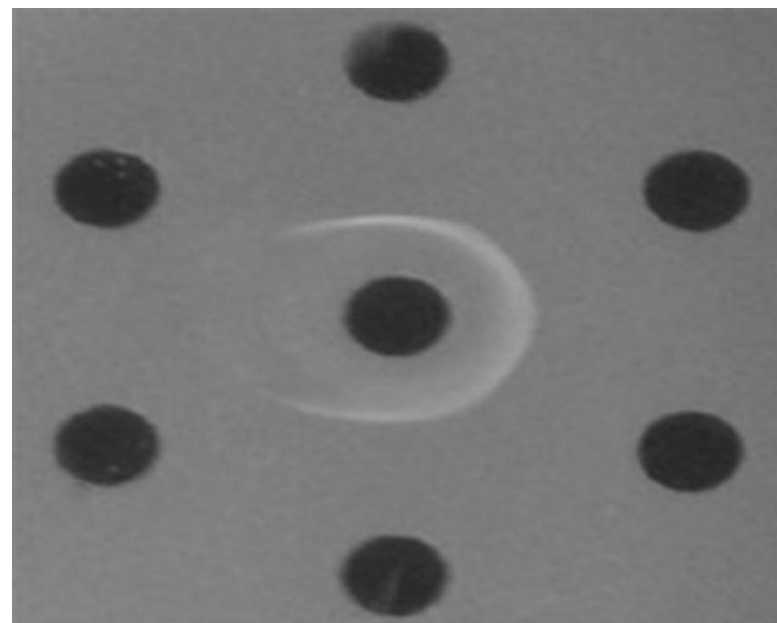
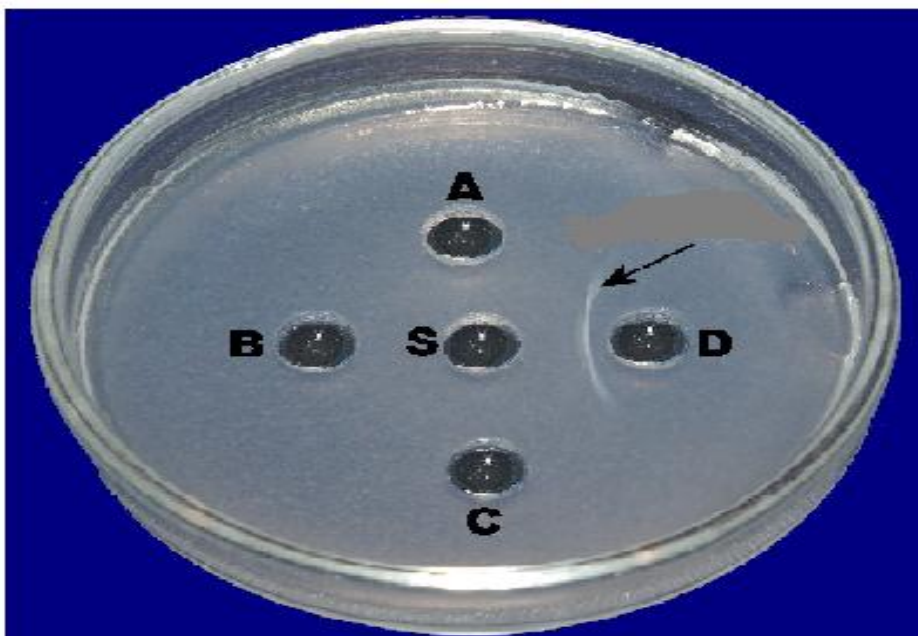
- Реакцию ставят в геле на стеклах или чашках Петри
- В слое геля вырезают лунки, в которые отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу.
- В месте встречи компонентов реакции в эквивалентных соотношениях образуется преципитат в виде белой полосы.

# Двойная иммунодиффузия по Оухтерлони



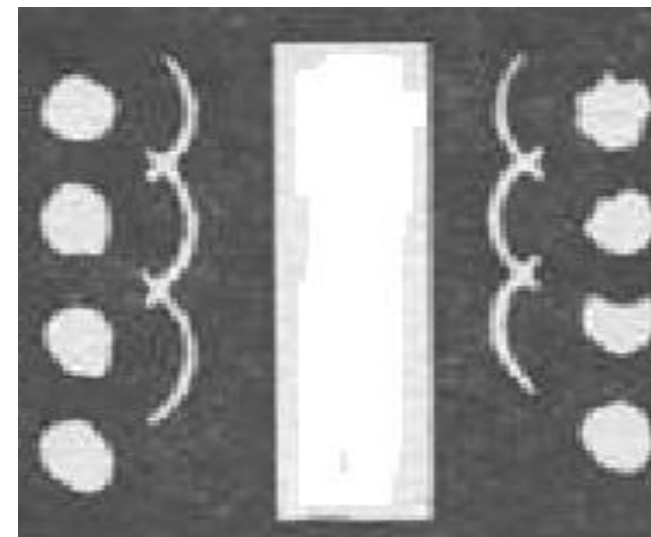
1. Лунки с искомым антигеном
2. Линии преципитата
3. Слой агарозного геля
4. Лунка с иммунной сывороткой

## Двойная иммунодиффузия по Оухтерлони



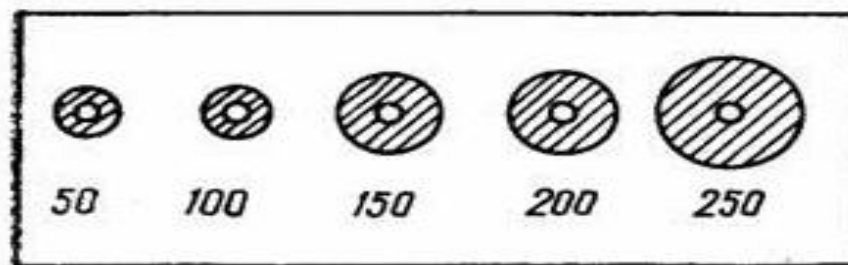
## Определение токсигенности возбудителя дифтерии с помощью реакции преципитации в геле

- Токсигенность штаммов возбудителей дифтерии, выделенных от больных, определяют с помощью **метода Элека**.
- Для этого полосу стерильной фильтровальной бумаги, пропитанную противодифтерийной антитоксической сывороткой, помещают на поверхность питательной среды в чашке Петри. Исследуемые культуры инокулируют на расстоянии 1 см от края бумажной полосы. Таким способом можно инокулировать от 3 до 10 культур в одной чашке.
- В качестве контроля используется нетоксигенная культура
- Чашки инкубируют в термостате при 37 ° С в течение 24-48-72 часов. Если культура выделяет токсин, вокруг нее на некотором расстоянии от бумажной полосы образуются специфические линии преципитации

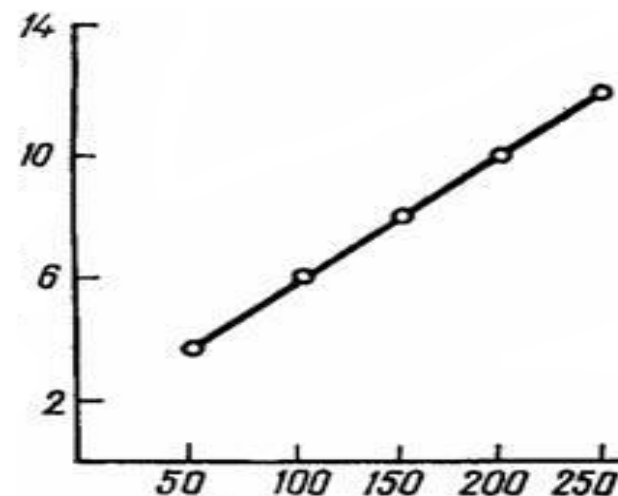


# Реакция радиальной иммунодиффузии

- Иммунную сыворотку смешивают с расплавленным и охлажденным до 40 °С агаром
- Агар наливают на стеклянную пластинку, и после затвердевания в нем вырезают лунки, в которые добавляют различные разведения антигена.
- Во время инкубации антиген диффундирует в агар и связывается с антителами, что приводит к образованию зон преципитации в виде колец
- Диаметр колец преципитации соответствует концентрации антигена
- Эта реакция используется для определения концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови (метод Манчини).



А

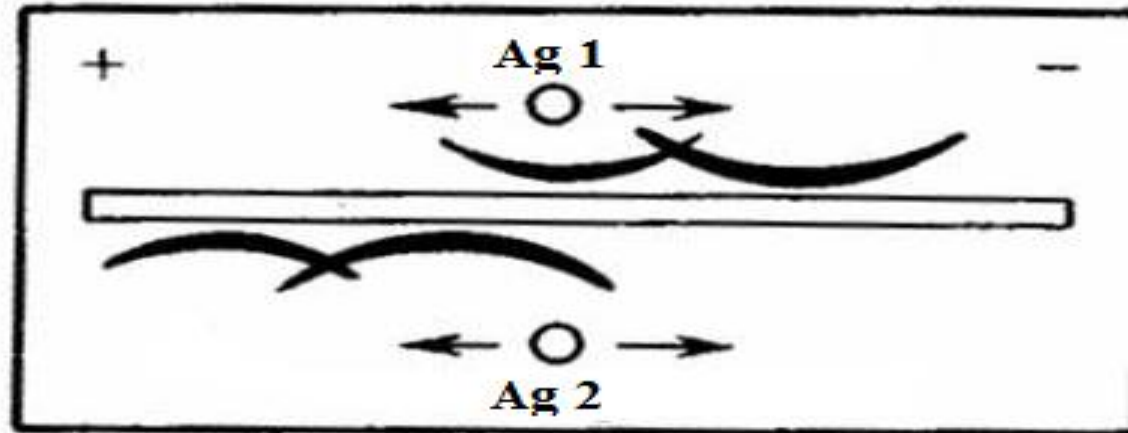


В



# Иммуноэлектрофорез

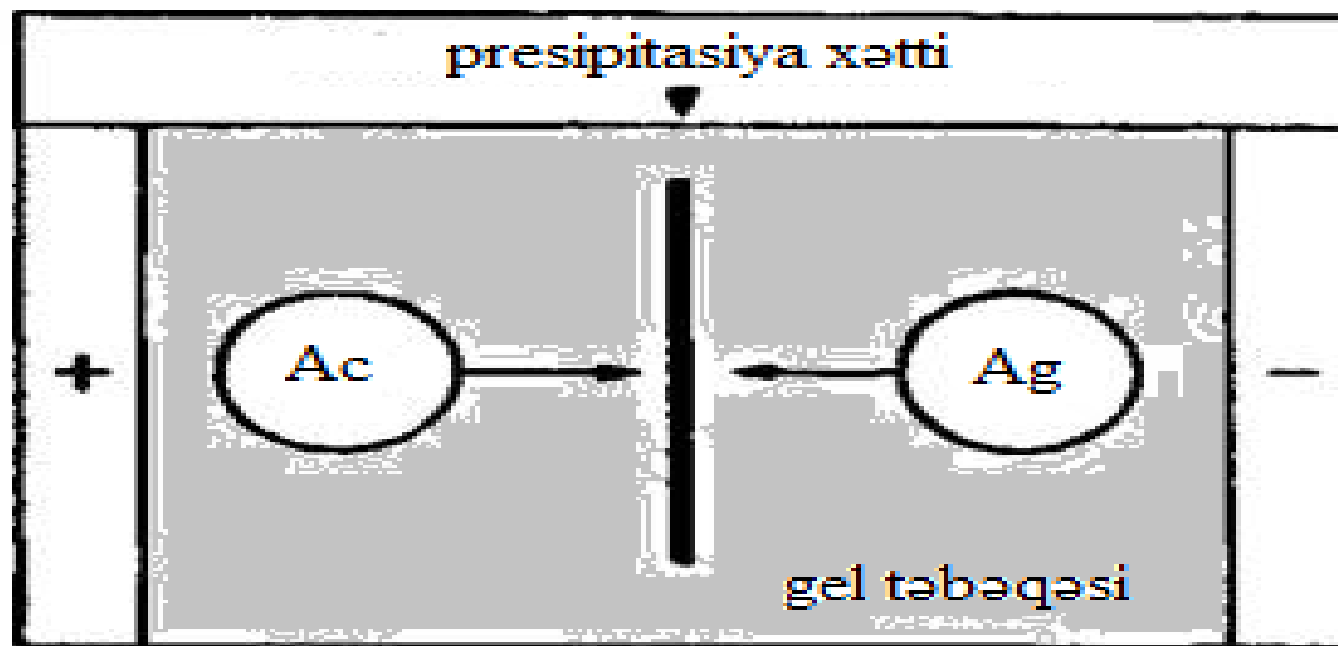
- **Иммуноэлектрофорез** – сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации; смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза.
- Затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой, диффундируя в гель, образуют в месте «встречи» с антигеном линии преципитации



# Встречный иммуноэлектрофорез

- Этот метод основан на образовании линий преципитации в результате встречной диффузии антигенов и антител под воздействием электрического поля в агаровом геле.
- В слое агара на определенных расстояниях друг от друга вырезают лунки для антигена и сыворотки.
- Исследуемый антиген помещают со стороны катода, а со стороны анода помещают сыворотку. Пластинку с агаром ставят в камеру для электрофореза
- Положительная реакция проявляется в образовании линий преципитации между лунками, в которые добавлены антиген и сыворотка.

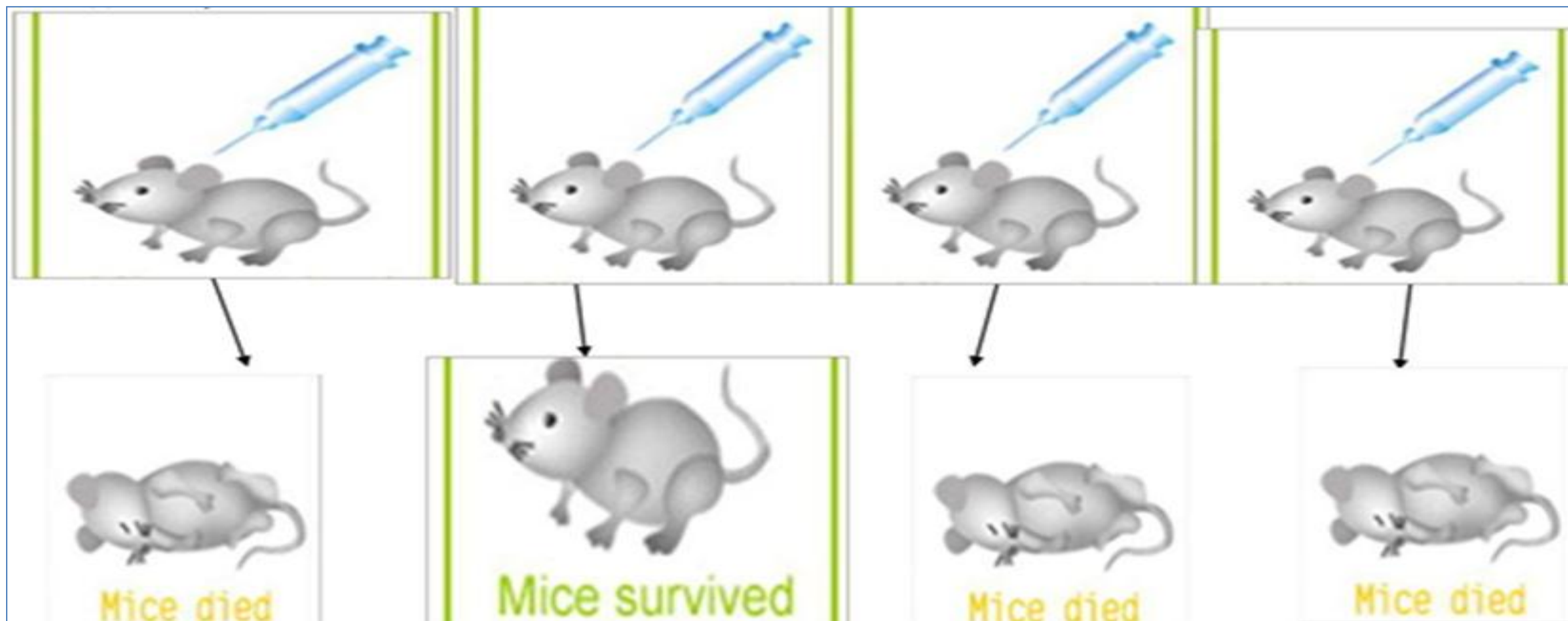
# Встречный иммуноэлектрофорез



# Реакция нейтрализации

- Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие микробов или их токсинов на чувствительные клетки и ткани, что связано с блокадой микробных антигенов антителами, т. е. их **нейтрализацией**. Реакцию нейтрализации (РН) проводят путем введения смеси антиген- антитело животным или в чувствительные тест-объекты (культуру клеток, эмбрионы).
- **Реакция нейтрализации вирусов.** Наличие антител, нейтрализующих вирусы выявляют смешиванием культуры возбудителя с сывороткой и последующим введением смеси лабораторному животному или заражением культуры клеток. На эффективность нейтрализации указывает выживание животного либо отсутствие гибели клеток в культурах.
- **Реакция нейтрализации токсина** антитоксином основана на способности антитоксических антител связывать токсин и блокировать его действие. Для идентификации токсина и определения титра антитоксических антител их смесь вводят лабораторным животным. При соответствии типа токсина и антител в сыворотке животное не погибает.

## Реакция нейтрализации токсина антитоксином *in vivo*



# Реакция флоккуляции

- **Реакция флоккуляции** (от лат. *flossus* — хлопья шерсти) — появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммунопреципитации) в пробирке (*in vitro*) при реакции токсин–антитоксин или анатоксин–антитоксин. Реакция позволяет определить активность антитоксической сыворотки, анатоксина и токсина.
- В пробирке, где анатоксин и антитоксическая сыворотка находятся в эквивиалентном соотношении, наблюдают помутнение. Таким образом, зная концентрацию антитоксической сыворотки, можно рассчитать концентрацию анатоксина

