

Занятие 19

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.

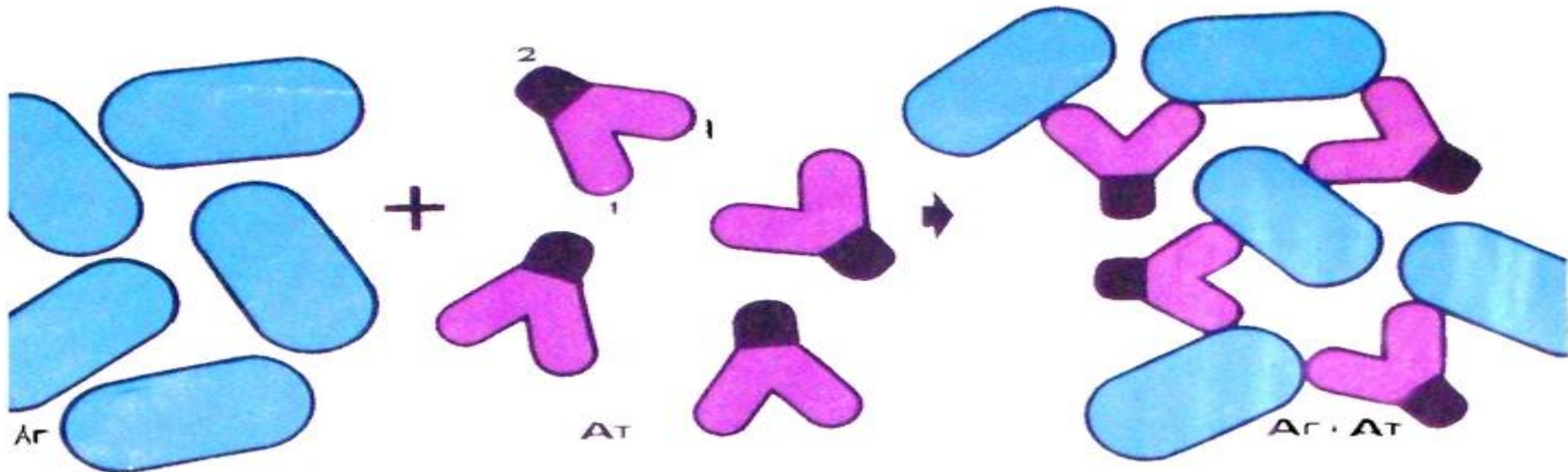
Цель занятия:

- 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

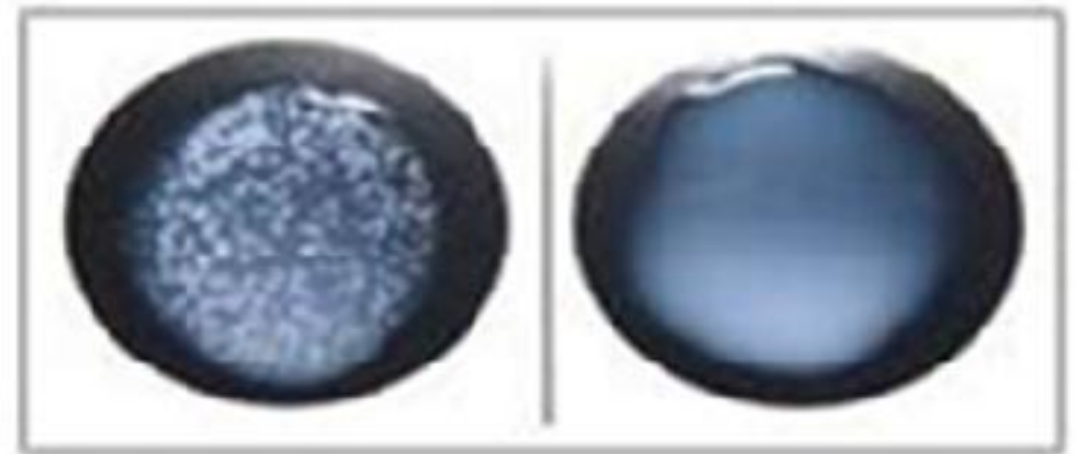
Существует несколько вариантов реакции агглютинации:

- 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



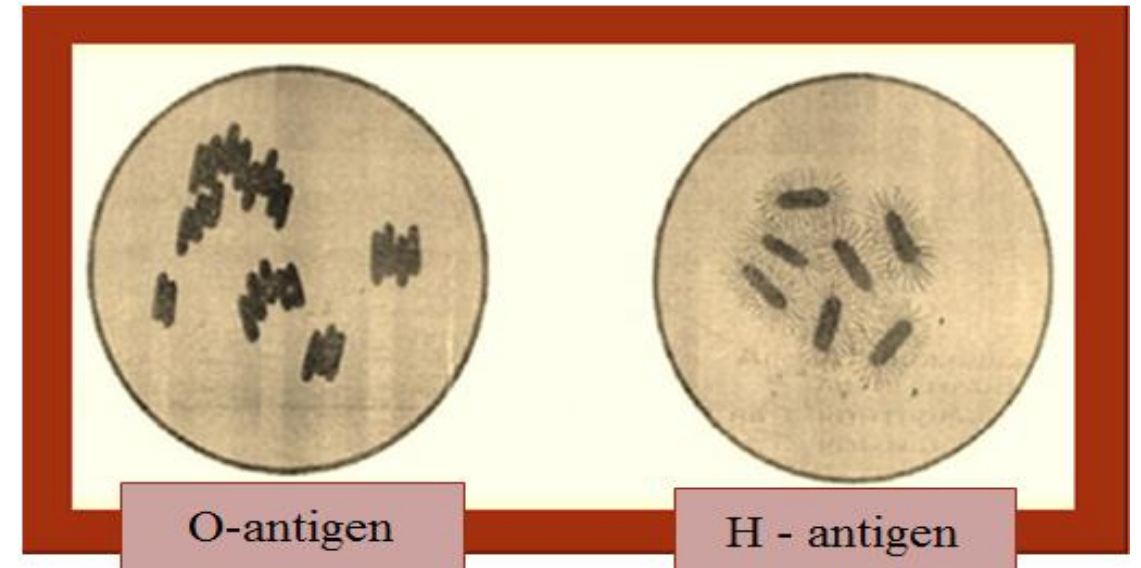
Тәсрүбә «+»

Kontrol «-»

O- и H-агглютинация

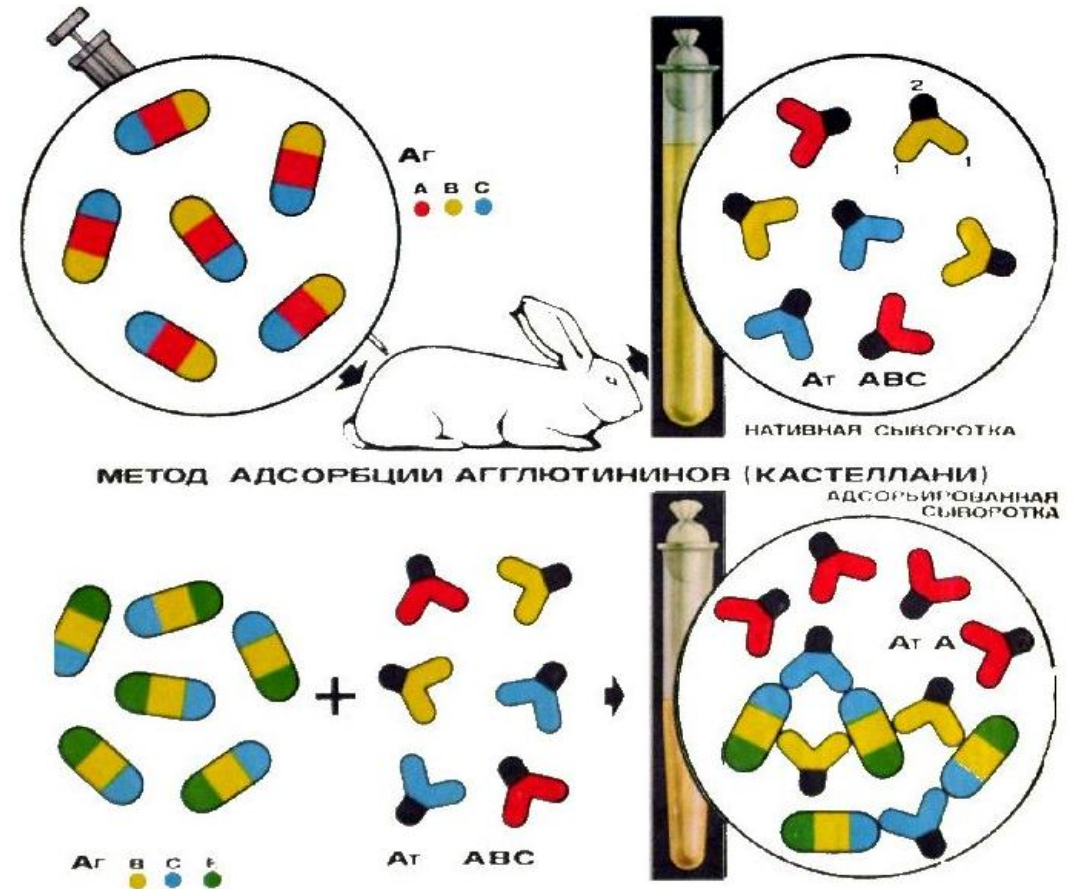
В зависимости от антигенных свойств бактерий существуют несколько видов агглютинации:

- O-агглютинация - бактерии агглютинируются посредством соматического антигена, при этом образуются мелкие компактные зерна
- H-агглютинация – бактерии склеиваются друг с другом через жгутики (H-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 37⁰С 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 пальце. 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

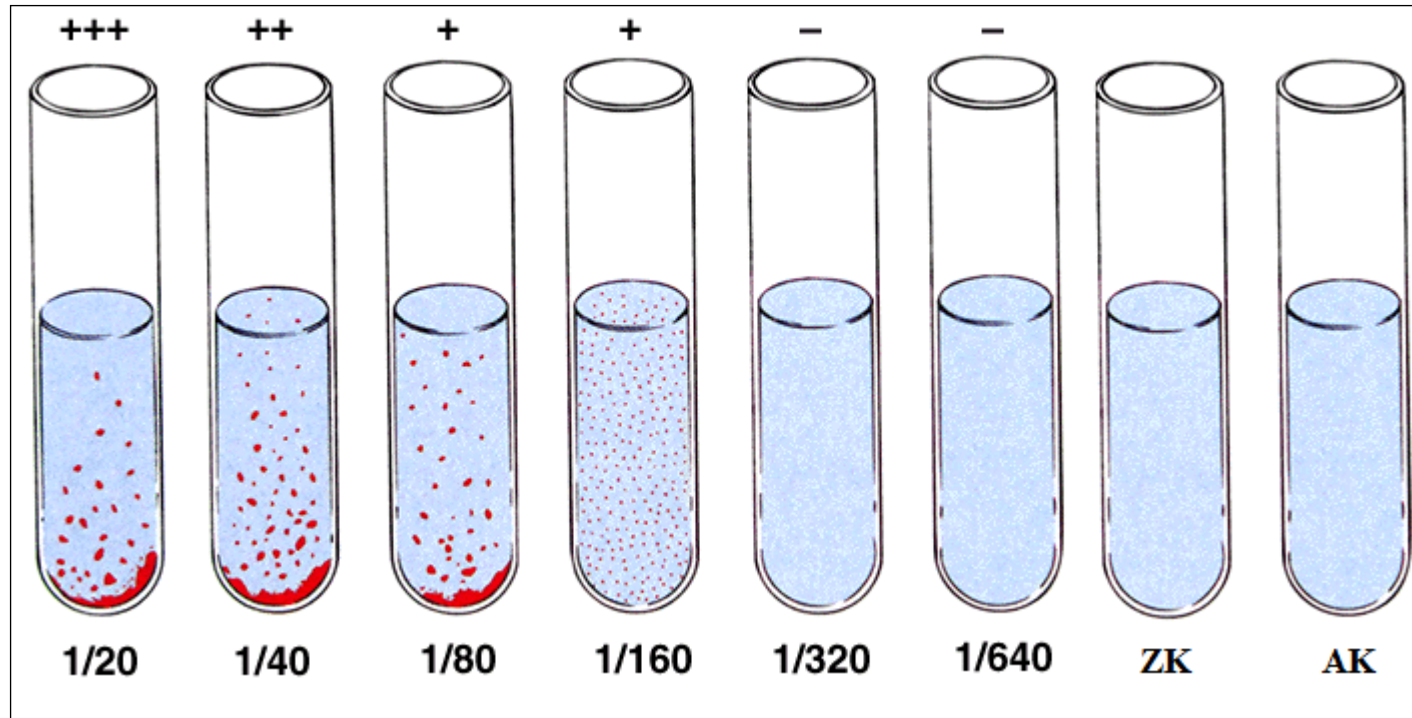
При постановке реакции агглютинации в пробирке учет результатов проводят по 4-крестовой системе:

- (++++) - 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

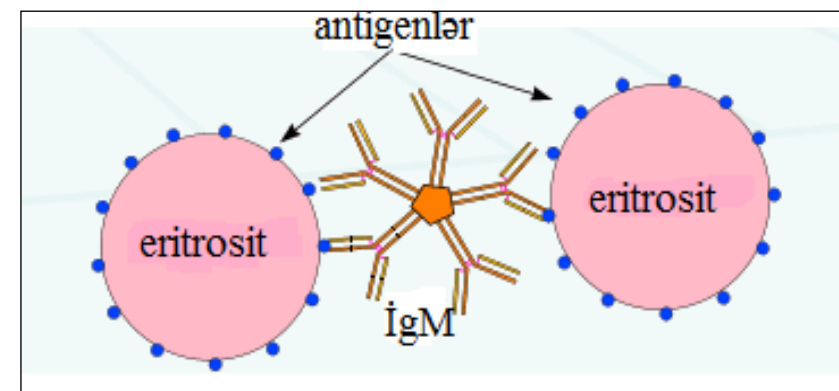
- Если в опытных пробирках наблюдается явная (++) агглютинация при отсутствии агглютинации в контрольных пробирках, реакция считается положительной. Наибольшее разведение сыворотки крови, дающее агглютинацию считают **титром реакции агглютинации**
- Определение титра реакции имеет важное значение при 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)



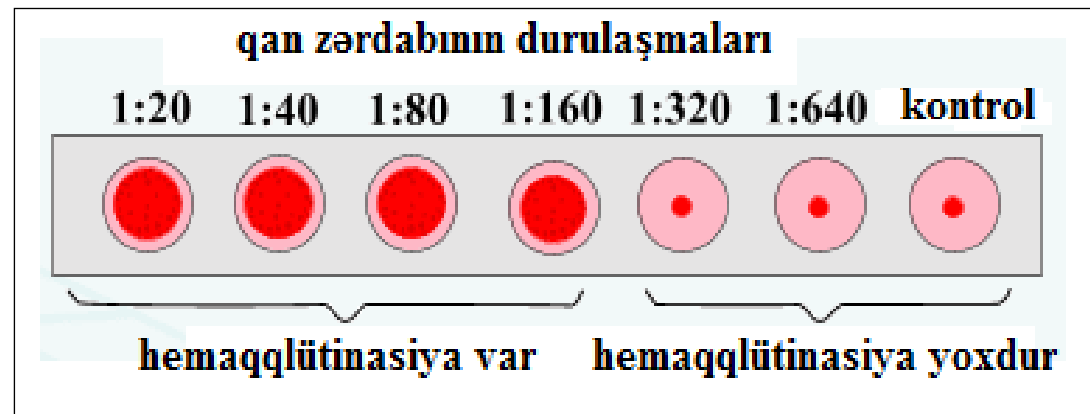
Реакция пассивной гемагглютинации

- 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



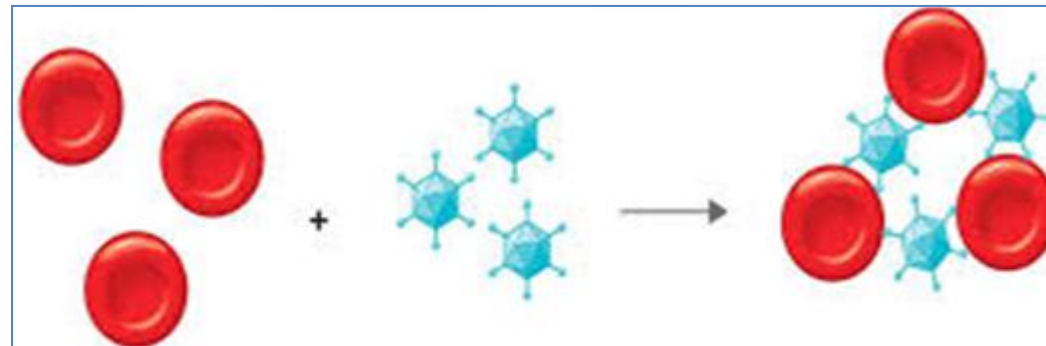
Реакция гемагглютинации

Реакция гемагглютинации– реакция склеивания эритроцитов, бывает серологической и не серологической.

- ***Серологическая реакция гемагглютинации*** – основана на взаимодействии антигенов эритроцитов (гемагглютиногенов) с антителами в сыворотке крови (гемагглютинаинами) 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.

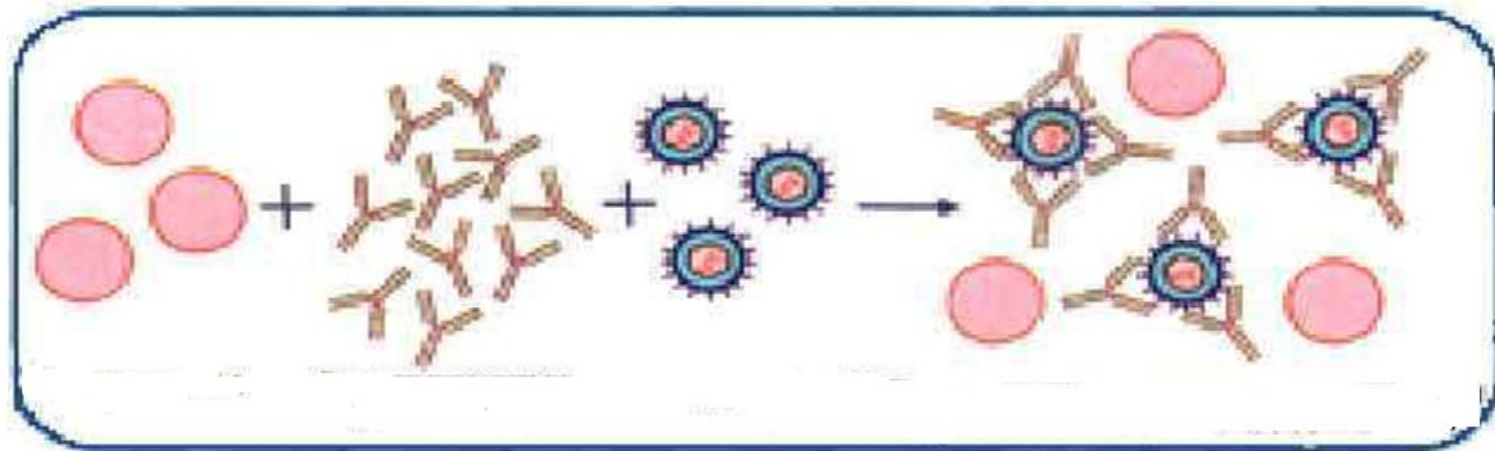
Техника не серологической реакции гемагглютинации

- 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



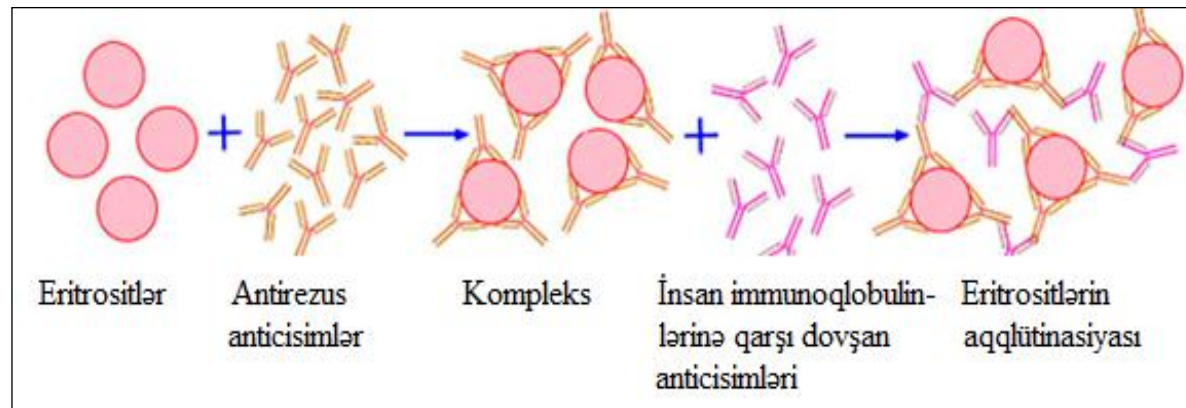
Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

- 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**

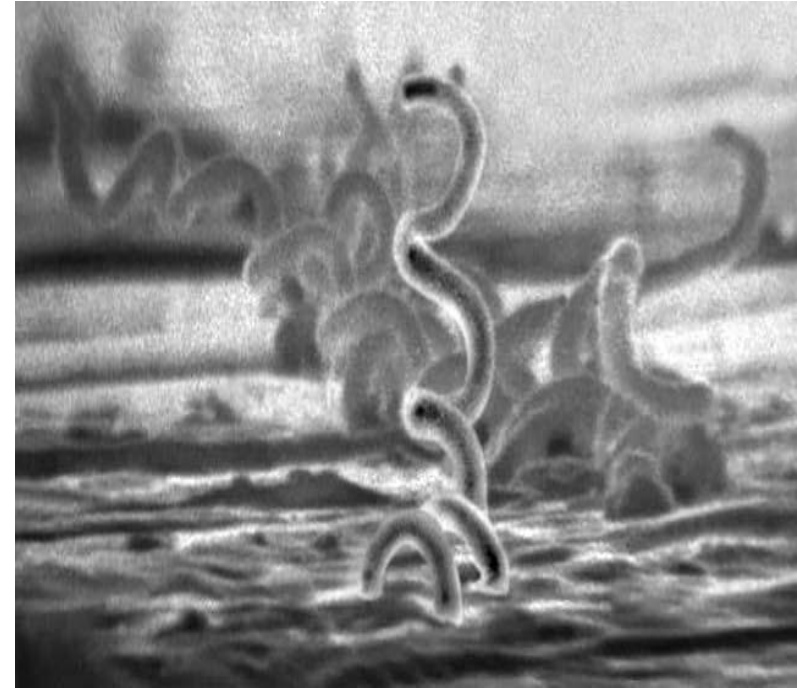
+ Антитела + Комплемент



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 (ml)	опыт					Контроль ингредиентов			
	Номер пробирок								
	1 опыт	2 контроль	3	4	5	6	7	8	9
Инактивированная исследуемая сыворотка	0,05	0,05							
Активированный комплемент	0,15		0,15		0,15		0,15		
Инактивированный 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 положительная сыворотка			0,05	0,05					
Инактивированная отрицательная 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

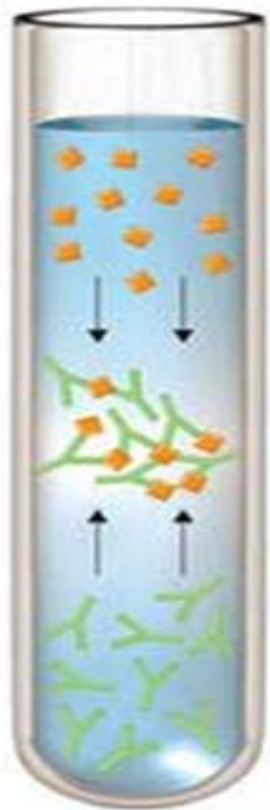
Реакция кольцепреципитации

- 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 кольцепреципитации

- 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



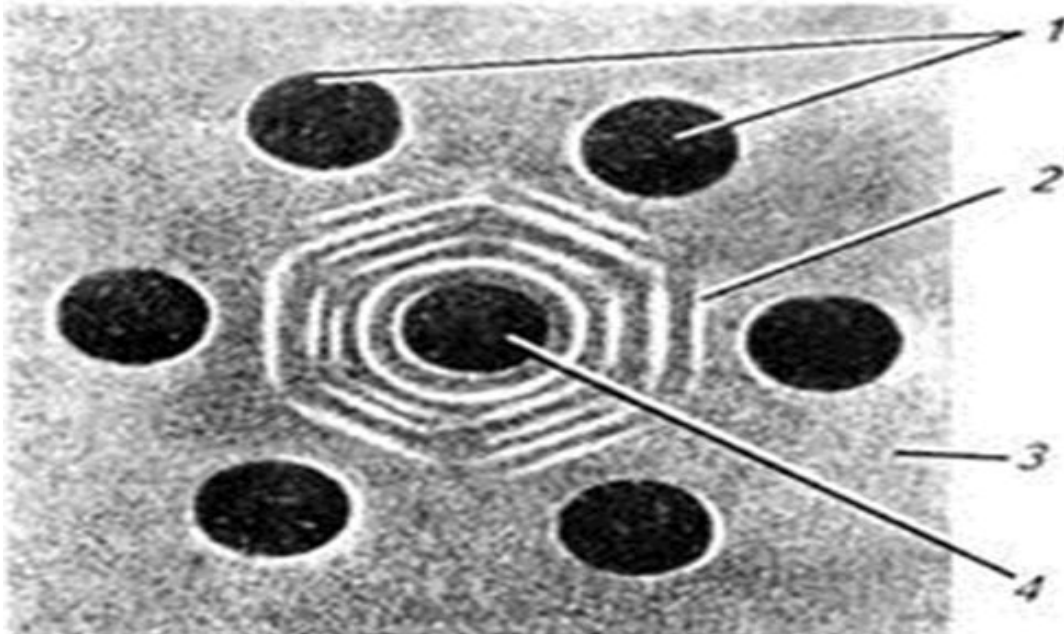
Реакция преципитации в агаре (геле)

- 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

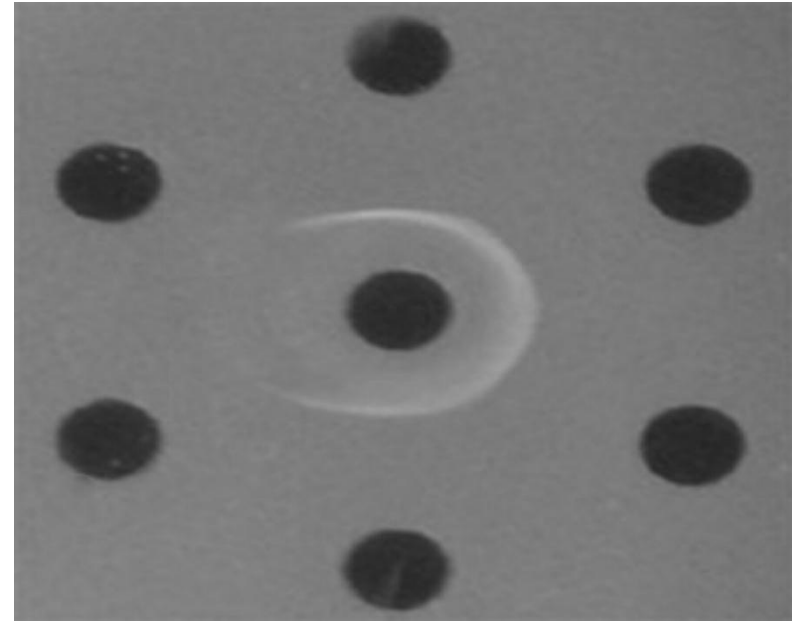
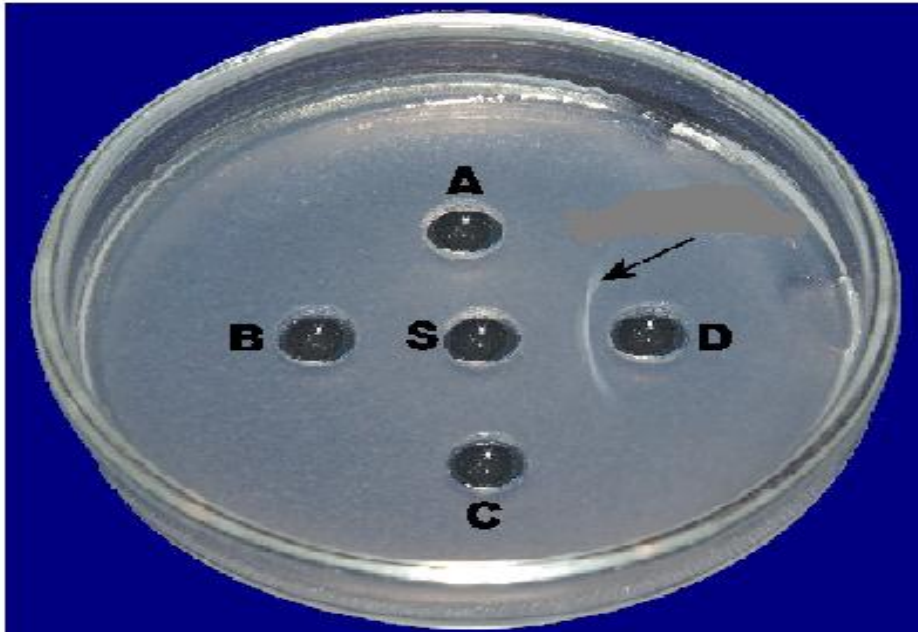
- Реакцию ставят в геле на стеклах или чашках Петри
- В слое геля вырезают лунки, в которые отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу.
- В месте встречи компонентов реакции в эквивалентных соотношениях образуется преципитат в виде белой полосы.

Двойная иммунодиффузия по Оухтерлони



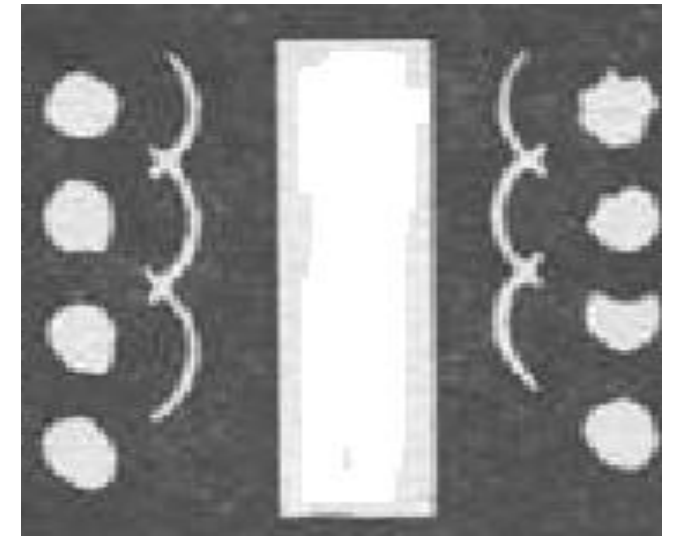
1. Лунки с искомым антигеном
2. Линии преципитата
3. Слой агарозного геля
4. Лунка с иммунной сывороткой

Двойная иммунодиффузия по Оухтерлони



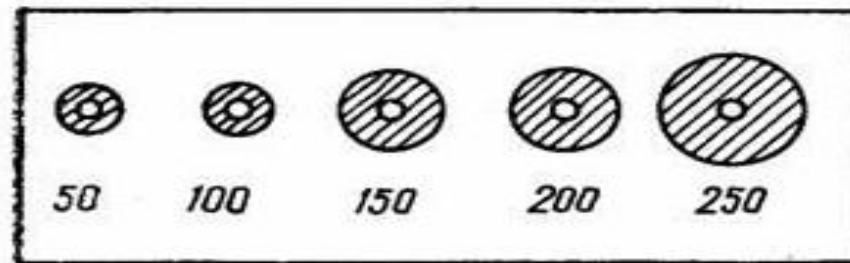
Определение токсигенности возбудителя дифтерии с помощью реакции преципитации в геле

- Токсигенность штаммов возбудителей дифтерии, выделенных от больных, определяют с помощью **метода Элека**.
- Для этого полоску 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 полоски. 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 полоски образуются специфические линии преципитации

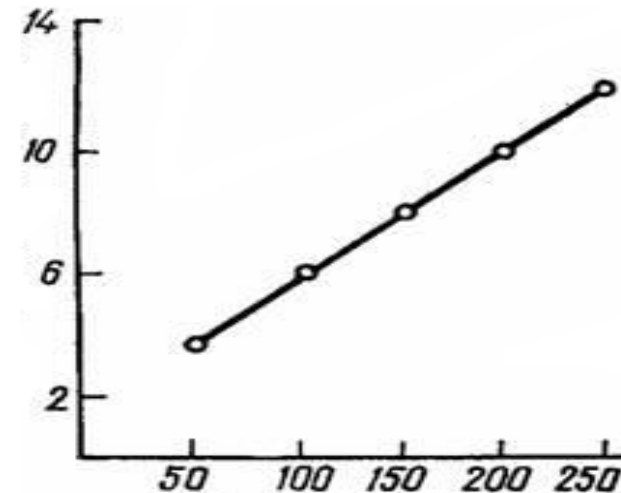


Реакция радиальной иммунодиффузии

- 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).



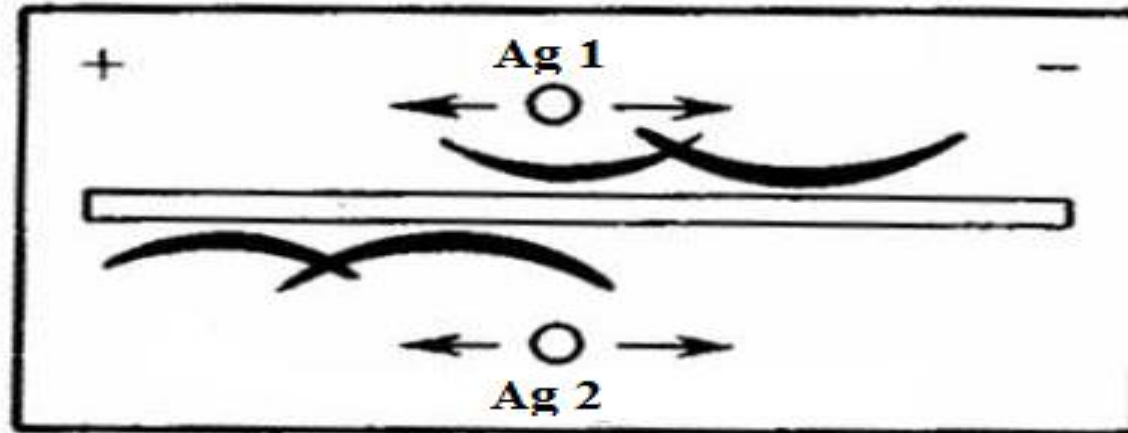
А



В

Иммуноэлектрофорез

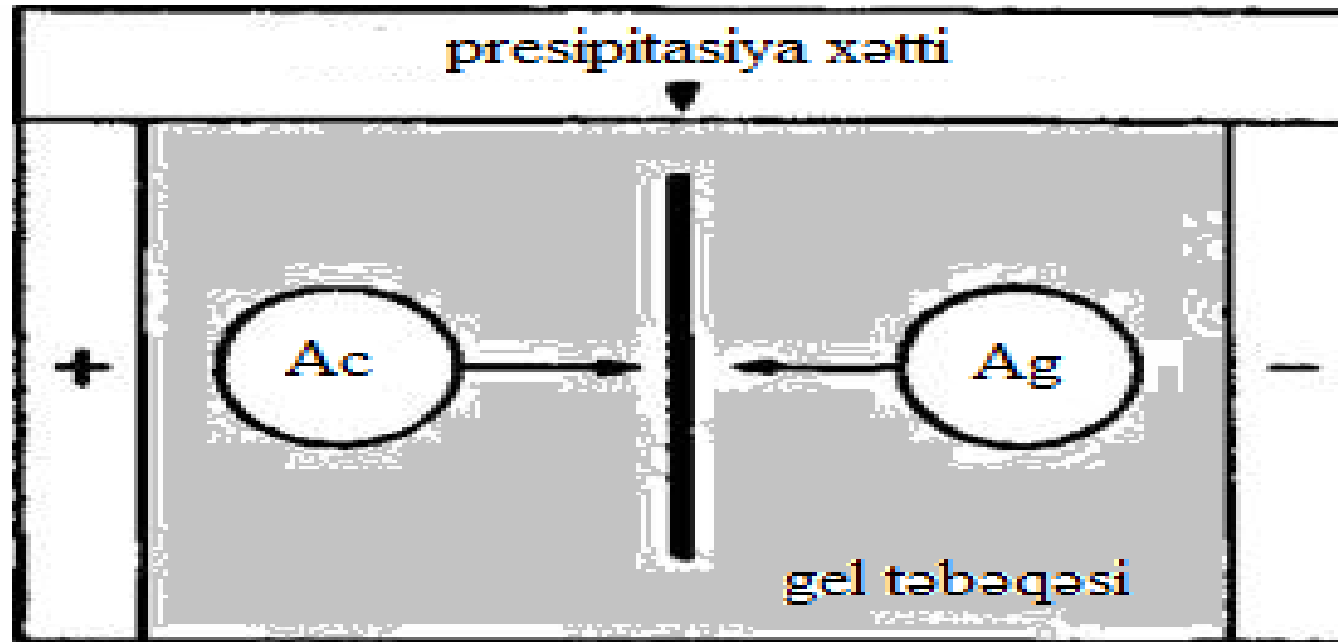
- **Иммуноэлектрофорез** – сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации; смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза.
- Затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой, диффундируя в гель, образуют в месте «встречи»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

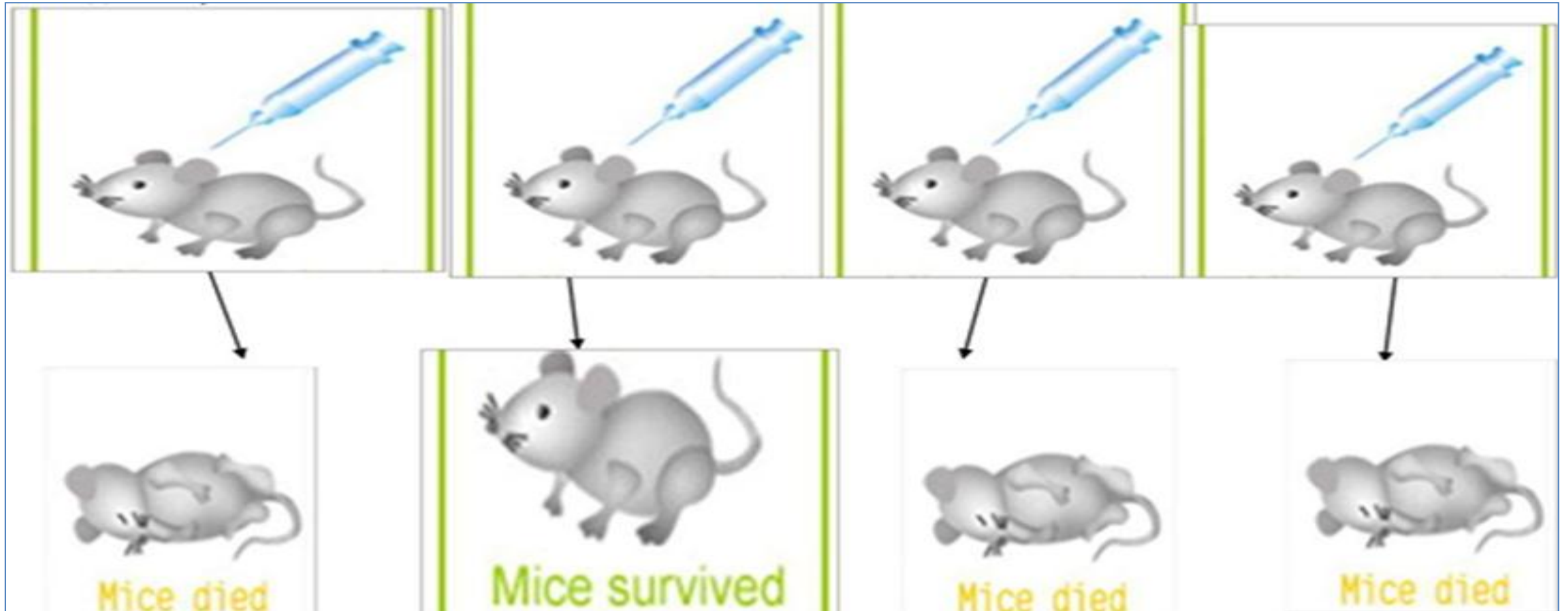
Встречный иммуноэлектрофорез



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 эквивалентном соотношении, наблюдают помутнение. Таким образом, зная концентрацию антитоксической сыворотки, можно рассчитать концентрацию анатоксина

