**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).**

***Реакция агглютинации.*** 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 агглютининами, клетки микробов участвующих в РА – агглютиногенами.

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

**О- и H-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. Кастелляни (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 370C 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

**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 антигенамию. 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 (гемагглютининами) 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 несерологической 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 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 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.

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

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 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 раздельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу. В месте встречи компонентов реакции в эквива­лентных соотношениях образуется преципитат в виде белой полосы

**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).

**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.

**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 (PH) 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 флоккуляции.** *Реакция флоккуляции* (от лат. *floccus* — хлопья шерсти) — появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммунопреципитации) в пробирке (*in vitrо*) 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