

Тема 12

Реакция агглютинации и ее варианты (ориентировочная и развернутая). Реакция гемагглютинации (РГА). Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Реакция пассивной гемагглютинации (РНГА). Реакция Кумбса, реакция иммобилизации. Реакция преципитации (РП) и ее варианты (кольцепреципитация, иммунодиффузия в геле, иммуноэлектрофорез). Реакция нейтрализации токсина. Реакция радиальной иммунодиффузии.

План занятия:

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

Реакция агглютинации — РА (от лат. agglutinatio — склеивание) — простая по постановке реакция, при которой происходит связывание антителами корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов, различных частиц с адсорбированными на них антигенами, а также макромолекулярных агрегатов). Она протекает при наличии электролитов, например при добавлении изотонического раствора натрия хлорида, и проявляется образованием хлопьев или осадка (клетки и частицы, «склеенные» антителами). Применяются различные варианты РА: развернутая, ориентировочная, непрямая и др. Их используют для определения противомикробных антител в сыворотке крови больных; возбудителя, выделенного от больного; групп крови с использованием моноклональных антител против аллоантигенов эритроцитов.

1. Определение антител в сыворотке крови больного проводят с помощью развернутой реакции агглютинации: к разведениям сыворотки крови больного добавляют диагностикум (взвесь убитых микробов) и через несколько часов инкубации при 37°C отмечают наибольшее разведение сыворотки (титр сыворотки), при котором произошла агглютинация, т.е. образовался осадок.

Реакция с О-диагностикумом (бактерии, убитые нагреванием, сохранившие термостабильный О-антиген) происходит в виде мелкозернистой агглютинации. Реакция агглютинации с Н-диагностикумом (бактерии, убитые формалином, сохранившие термолабильный жгутиковый Н-антиген) — крупнохлопчатая и протекает быстрее.

2. Для определения возбудителя, выделенного от больного, ставят ориентировочную реакцию агглютинации, применяя диагностические антитела (агглютинирующую сыворотку, полученную гипериммунизацией кролика убитыми микробами), т.е. проводят серотипирование возбудителя.

Ориентировочную реакцию проводят на предметном стекле: к капле диагностической агглютинирующей сыворотки в разведении 1:10 или 1:20 добавляют чистую культуру возбудителя, выделенного от больного. Рядом ставят контроль — вместо сыворотки наносят каплю раствора натрия хлорида. При появлении в капле с сывороткой и микробами хлопьевидного осадка (положительная реакция) ставят *развернутую* реакцию агглютинации в пробирках с увеличивающимися разведениями этой же агглютинирующей сыворотки, добавляя в каждую пробирку по 2–3 капли взвеси возбудителя. Агглютинацию учитывают по количеству осадка и степени просветления жидкости. Реакцию считают положительной, если агглютинация отмечается в разведении, близком к титру диагностической сыворотки. Одновременно учитывают контроли: сыворотка, разведенная изотоническим раствором натрия хлорида, должна быть прозрачной, взвесь микробов в том же растворе — равномерно мутной, без осадка.

Разные родственные бактерии могут агглютинироваться одной и той же диагностической агглютинирующей сывороткой за счет перекрестно реагирующих антител, что затрудняет идентификацию возбудителя. 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 моноклеточных диагностических агглютинирующих сывороток было предложено А. Кастелляни (1902 г.).

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, или РПГА) основана на использовании эритроцитов или латекса с адсорбированными на их поверхности антигенами или антителами, взаимодействие которых с соответствующими антителами или антигенами сыворотки крови больных вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка («зонтика»). При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговики». Обычно в РНГА выявляют антитела с помощью антигенного эритроцитарного диагностикума, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами. Иногда применяют антительные эритроцитарные диагностикумы, на которых адсорбированы антитела. Например, можно обнаружить ботулинический токсин, добавляя к нему эритроцитарный антительный ботулинический диагностикум (такую реакцию называют реакцией обратной непрямой гемагглютинации — РОНГА). РНГА применяют для диагностики инфекционных болезней, определения гонадотропного гормона в моче при установлении беременности, для выявления

повышенной чувствительности к лекарственным препаратам, гормонам и в некоторых других случаях.

Реакция коаггутинации. Клетки возбудителя определяют с помощью стафилококков, предварительно обработанных иммунной диагностической сывороткой. Стафилококки, содержащие белок А, имеющий сродство к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, неспецифически адсорбируют антимикробные антитела, которые затем взаимодействуют активными центрами с соответствующими микробами, выделенными от больных. В результате коаггутинации образуются хлопья, состоящие из стафилококков, антител диагностической сыворотки и определяемого микроба.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) основана на блокаде, т.е. подавлении антигенов вирусов антителами иммунной сыворотки, в результате чего гемагглютининовые шипы вирусов теряют свойство агглютинировать эритроциты. РТГА применяют для диагностики вирусных болезней, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи и др.) могут агглютинировать эритроциты.

Реакцию агглютинации для определения групп крови применяют для установления системы АВ0 с помощью агглютинации эритроцитов антителами иммунной сыворотки против антигенов групп крови А(II), В(III). Контролем служат: сыворотка, не содержащая антител, т.е. сыворотка АВ(IV) группы крови; антигены, содержащиеся в эритроцитах групп А(II), В(III). Отрицательный контроль не содержит антигенов, т.е. используют эритроциты группы 0(I).

В реакции агглютинации для определения резус-фактора используют антирезусные сыворотки (не менее двух различных серий). При наличии на мембране исследуемых эритроцитов резус-антигена происходит агглютинация этих клеток. Контролем служат стандартные резус-положительные и резус-отрицательные эритроциты всех групп крови.

Реакцию агглютинации для определения антирезусных антител (*непрямую реакцию Кумбса*) применяют у больных при внутрисосудистом гемолизе. У некоторых таких больных обнаруживают антирезусные антитела, которые являются неполными, одновалентными. Они специфически взаимодействуют с резус-положительными эритроцитами, но не вызывают их агглютинации. Наличие таких неполных антител определяют в непрямой реакции Кумбса. Для этого в систему антирезусные антитела + резус-положительные эритроциты добавляют антиглобулиновую сыворотку (антитела против иммуноглобулинов человека), что вызывает агглютинацию эритроцитов. С помощью реакции Кумбса диагностируют патологические состояния, например гемолитическую болезнь новорожденных: эритроциты резус-положительного плода соединяются с циркулирующими в крови неполными антителами к резус-фактору, которые перешли через плаценту от резус-отрицательной матери. Можно также выявлять неполные антитела против микробов.

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 ставят в пробирках (реакция кольцепреципитации), в гелях, питательных средах и др. К вариантам реакции преципитации в полужидком геле агара или агарозы относят двойную иммунодиффузию по Оухтерлони, радиальную иммунодиффузию, иммуноэлектрофорез и др.

Реакцию кольцепреципитации ставят в узких преципитационных пробирках с иммунной сывороткой, на которую наслаивают растворимый антиген. При оптимальном соотношении антигена и антител на границе этих двух растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата. Избыток антигена не влияет на результат реакции кольцепреципитации вследствие постепенной диффузии реагентов к границе жидкости. Если в качестве антигенов в реакции кольцепреципитации используют прокипяченные и профильтрованные водные экстракты органов или тканей, то такая реакция называется реакцией термопреципитации (реакция Асколи при сибирской язве).

Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони. Растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку и после его затвердевания в нем вырезают лунки размером 2–3 мм. В эти лунки отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу. В месте встречи в эквивалентных соотношениях они образуют преципитат в виде белой полосы. У многокомпонентных систем между лунками с разными антигенами и антителами сыворотки появляется несколько линий преципитата; у идентичных антигенов линии преципитата сливаются; у неидентичных — пересекаются.

Реакция радиальной иммунодиффузии. Иммунную сыворотку с расплавленным агаровым гелем равномерно наливают на стекло. После застывания в геле делают лунки, в которые помещают антиген в различных разведениях. Антиген, диффундируя в гель, образует с антителами кольцевые зоны преципитации вокруг лунок. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена. По показателям диаметра колец и концентрации искомого вещества (антигенов или антител) составляют калибровочную кривую, по которой определяют концентрацию антигена (или антител) в исследуемом образце. Реакцию используют для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента и др.

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.

Реакция флоккуляции по Рамону (от лат. *floccus* — хлопья шерсти) — появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммунопреципитации) в пробирке при реакции токсин–антитоксин или анатоксин–антитоксин. Ее применяют для определения активности антитоксической сыворотки или анатоксина.

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). При отсутствии у животных и тест-объектов повреждающего действия микроорганизмов или их антигенов, токсинов говорят о нейтрализующем действии иммунной сыворотки и, следовательно, о специфичности взаимодействия комплекса антиген–антитело.