

# **СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ**

# Серологические реакции -

методы изучения **антител** и **антигенов** с помощью реакций антиген-антитело, определяемых в сыворотке крови и других жидкостях, а также тканях организма

Реакция **in vitro** между антигеном и антителом состоит из *специфической* и *неспецифической фазы*

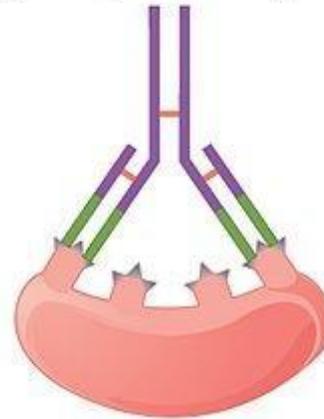
*Специфическая фаза* – это специфическое связывание активного центра антитела с детерминантой антигена

*Неспецифическая фаза* – проявляется видимыми физическими явлениями (образованием агглютината или преципитата). Эта фаза требует определенных условий (электролитов, pH среды)

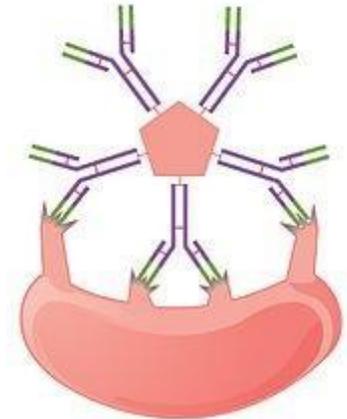
# Механизм реакции АГ + АТ

- 1-я фаза специфическая образование иммунного комплекса = АГ-АТ. Эта фаза связана со специфичностью эпитопа и паратопа (аффинность и авидность)
- Аффинность – это сила специфического взаимодействия АГ-АТ. Обусловлена степенью пространственного соответствия эпитопа и паратопа
- Авидность – это прочность связывания АГ-АТ. Определяется количеством паратопом у АТ

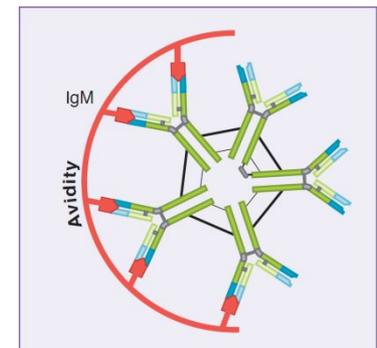
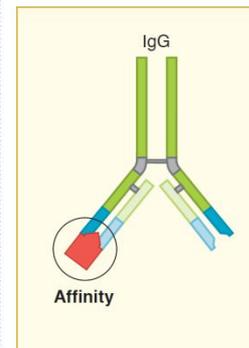
(a) Affinity versus avidity



Affinity refers to the strength of a single antibody–antigen interaction. Each IgG antigen binding site typically has high affinity for its target.



Avidity refers to the strength of all interactions combined. IgM typically has low affinity antigen binding sites, but there are ten of them, so avidity is high.



**Титр** – наибольшее разведение сыворотки или другой биологической жидкости, при котором обнаруживается активность антител с помощью какой-либо серологической реакции

# Агглютинирующие диагностические иммунные сыворотки

Получают иммунизацией животных (кроликов) п/к или в/в суспензией убитых нагреванием при 60° С в течение 1 ч взвеси бактерий. Иммунизацию проводят с интервалами между инъекциями в 5-8 дней. Затем у животных стерильно берут кровь, получают сыворотку, определяют ее титр, добавляют консерванты и расфасовывают в ампулы.

Иммунные сыворотки бывают:

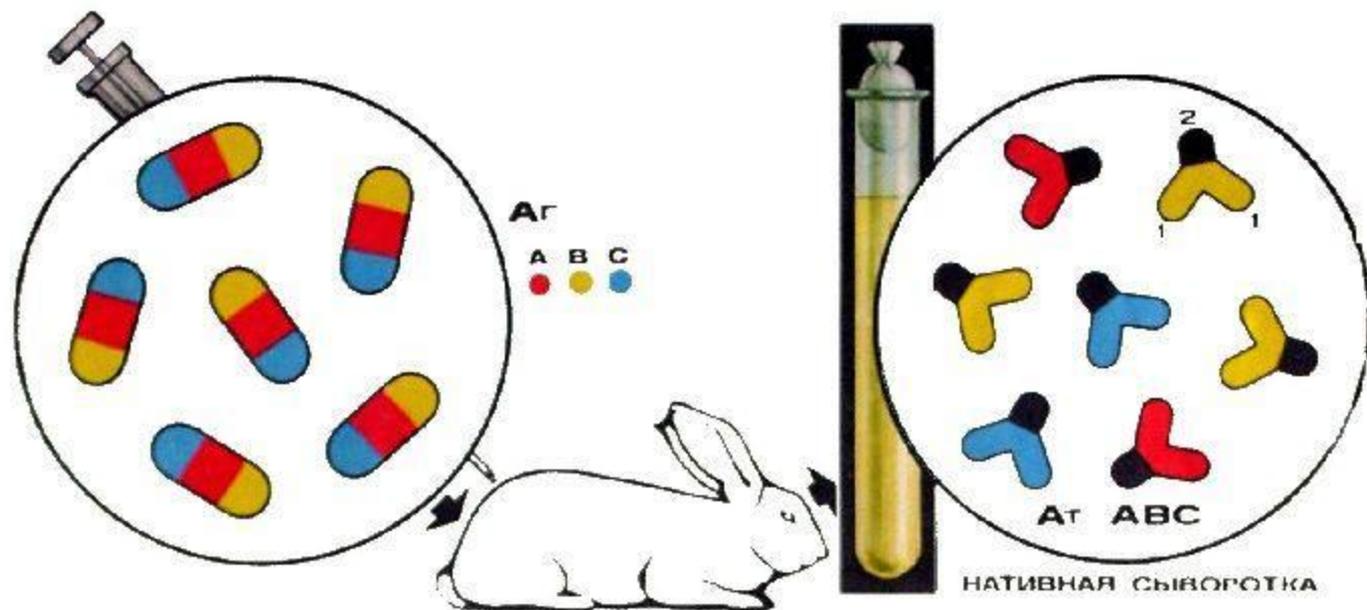
- видовыми (неадсорбированными) – их получают иммунизацией кроликов целыми бактериальными клетками
- адсорбированными и моновалентными – их получают в реакции адсорбции агглютининов по

**Кастеллани**

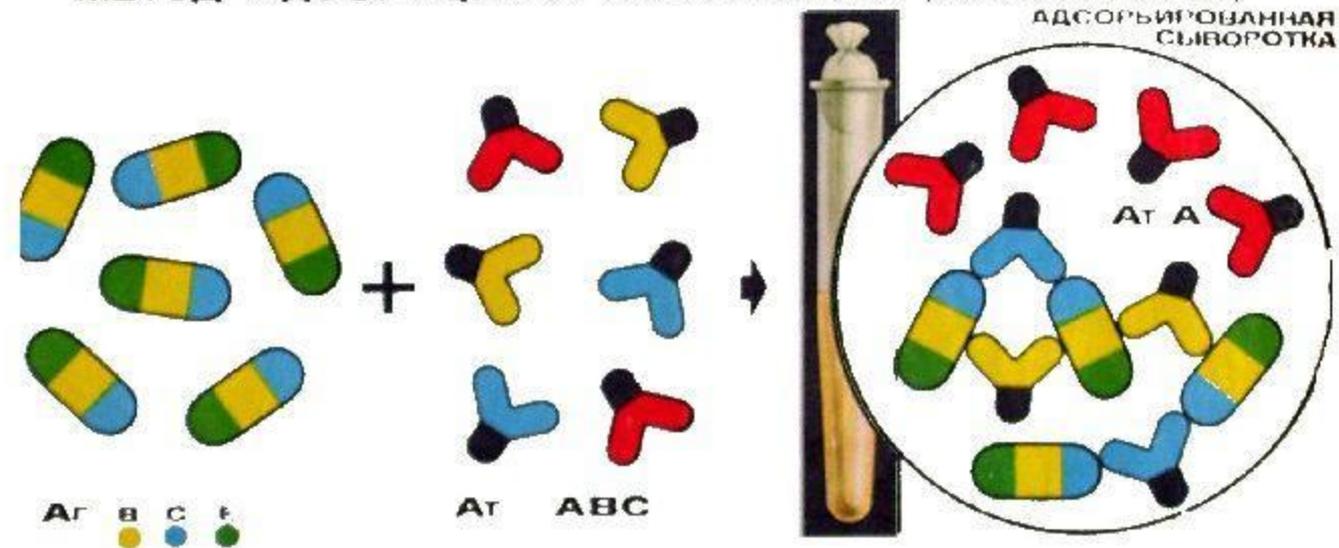
# Реакция адсорбции агглютининов по Кастеллани

- применяется для детального изучения антигенной структуры бактерии
- При наличии у разных бактерий одинаковых (групповых) антигенов они могут агглютинироваться одной и той же сывороткой, что затрудняет их идентификацию
- Реакция адсорбции агглютининов по Кастеллани основана на способности близкородственных бактерий адсорбировать из иммунной сыворотки только групповые антитела. Полученные сыворотки называются адсорбированными или монорецепторными, так как содержат антитела только к типовым или даже одному определенному антителу

# ПОЛУЧЕНИЕ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК



## МЕТОД АДСОРЕЦИИ АГГЛЮТИНИНОВ (КАСТЕЛЛАНИ)



# Реакция агглютинация (РА)

Agglutinatio (лат) – склеивание

**РА** – реакция склеивания **корпускулярных** антигенов и антител в присутствии **электролита**

РА проявляется образованием хлопьев или осадка

Различают развернутую, ориентировочную, непрямую реакцию гемагглютинации

РА используют для:

1. Определения антител в сыворотке крови больного (реакция Райта, Хеддельсона, Видаля)
2. Определения возбудителя, выделенного от больного (реакция Грубера)
3. Определение групп крови с использованием моноклональных антител против аллоантигенов эритроцитов

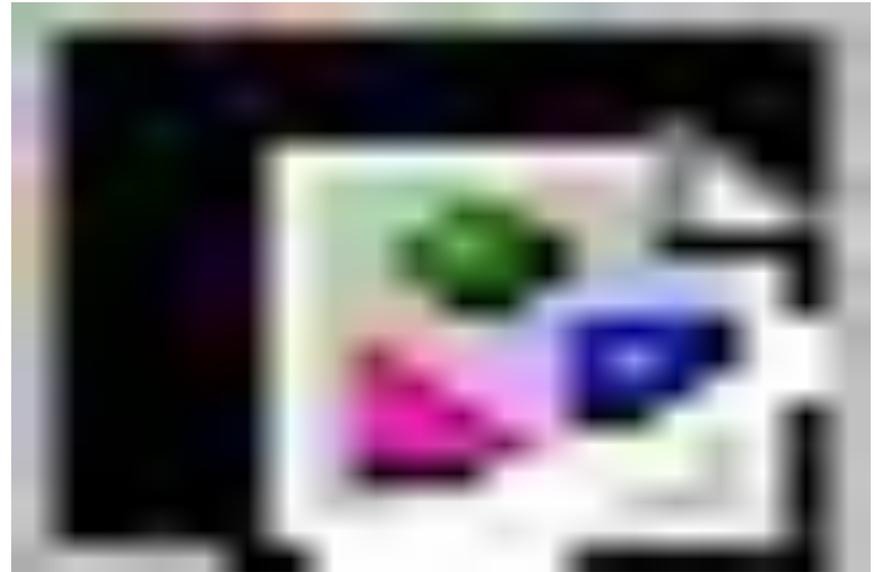
# Реакция агглютинации (РА)

Компоненты реакции:

1. Антиген  
(агглютиноген)
2. Антитело  
(агглютинин)
3. Электролит

В основе РА лежит феномен «решётки»

Комплекс АГ-АТ называется - **агглютинат**

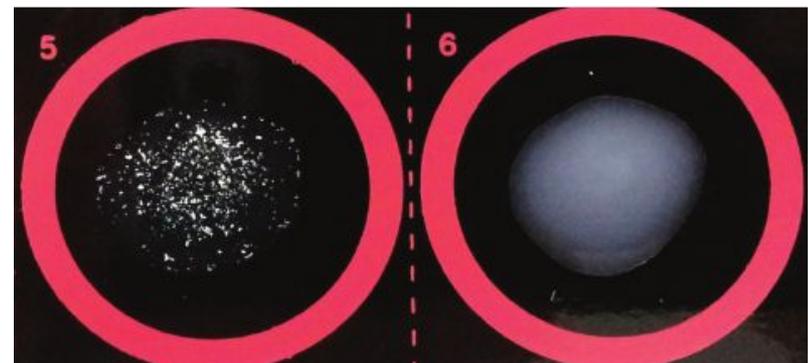
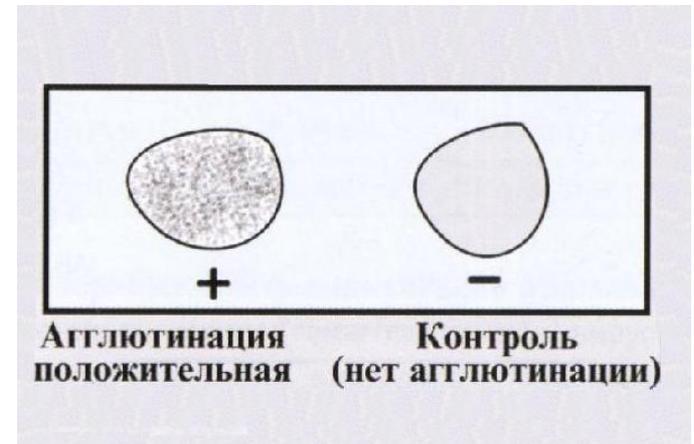


# РА ориентировочная (на стекле, пластинчатая)

При этом варианте РА испытуемыми могут быть как сыворотка, так и антиген, но чаще всего этот вариант используют для идентификации микроорганизмов.

1. Для идентификации микроорганизма (м/о) на обезжиренное предметное стекло наносят отдельно каплю известной агглютинирующей сыворотки, например сальмонелёзной, и каплю физиологического раствора (контроль). Затем бактериологической петлей берут бактериальную массу изучаемой культуры из колонии в чашке Петри или с поверхности скошенного МПА в пробирке и суспендируют отдельно в иммунной сыворотке и физиологическом растворе до получения гомогенной взвеси. Результат учитывают через 2- 4 мин.

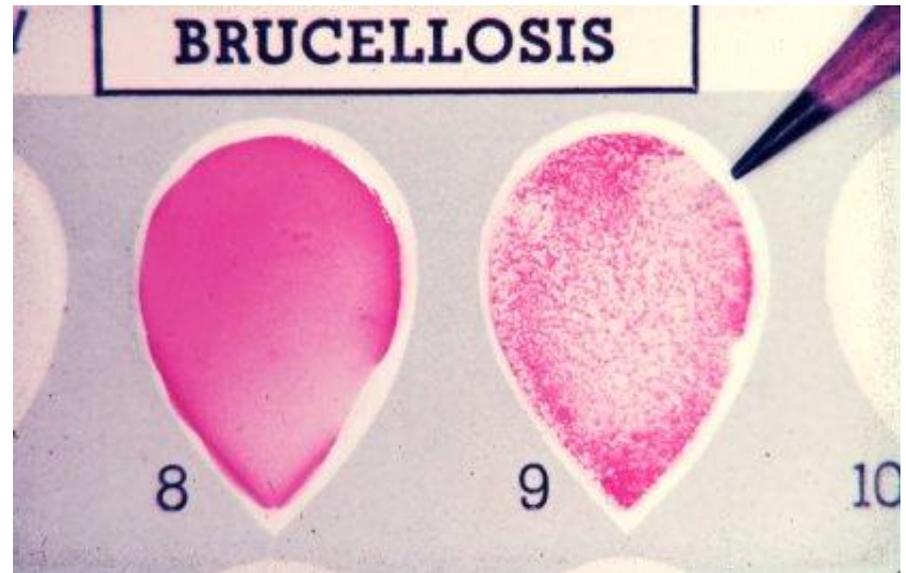
Учет результатов: в контрольной пробе изменения должны отсутствовать. При специфическом соответствии культуры бактерий иммунной сыворотке появляются хлопья агглютината (положительный результат), в случае отсутствия феномена агглютинации делают заключение о том, что исследуемая культура бактерий не соответствует иммунной сыворотке.



# РА ориентировочная (на стекле, пластинчатая)

2. Обнаружение антител в исследуемой сыворотке крови рассмотрим на примере **роз-бенгал пробы**, применяемой при серодиагностике бруцеллеза. На предметное стекло наносят 0,3 мл исследуемой сыворотки крови животного и 0,03 мл **бруцеллезного антигена (окрашенные розовым-бенгальским клетки бруцелл)**. Компоненты тщательно перемешивают покачиванием стекла и через 4 мин учитывают результат.

Учет результатов: при положительной реакции появляются розовые хлопья агглютината. Серологическую реакцию подобного типа относят к качественной, так как с ее помощью можно выявлять антитела к возбудителю в сыворотке крови животного, но невозможно оценить их количественное содержание.



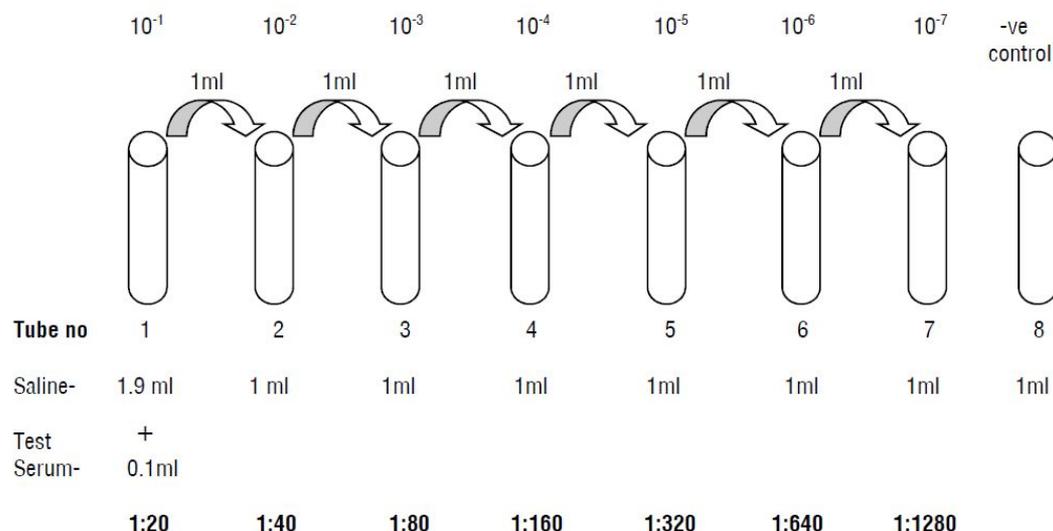
# РА развернутая (в пробирках) с целью идентификации чистой культуры (Грубера)

Компоненты:

1. Физиологический раствор
2. Сыворотка диагностическая
3. Чистая культура возбудителя

Оборудование:

1. Пробирки
2. Пипетки
3. Штатив



# РА развернутая (в пробирках) с целью идентификации чистой культуры (Грубера)

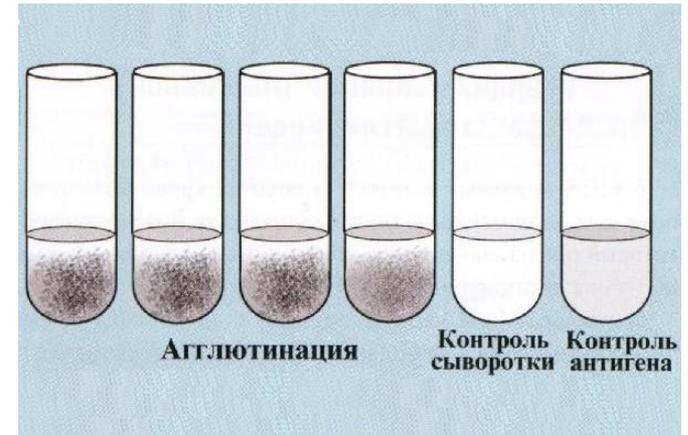
## Постановка реакции:

в пробирках производят разведение диагностической сыворотки, затем в каждую пробирку вносят одинаковое количество АГ

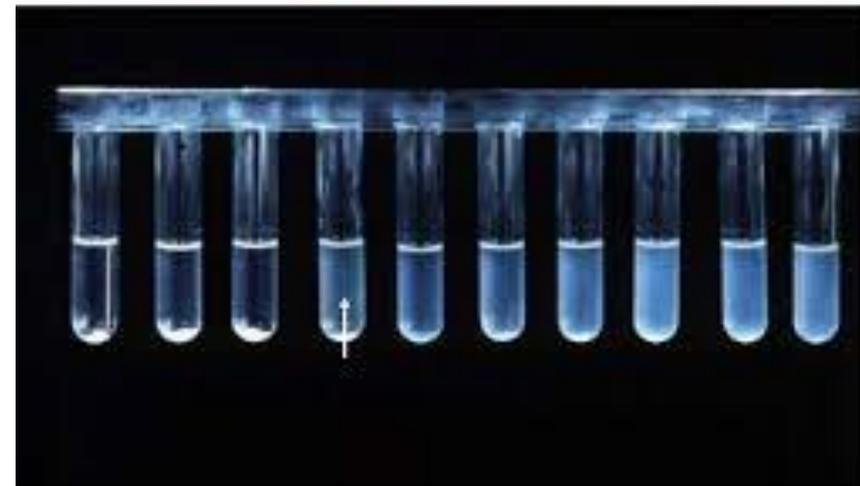
Реакцию учитывают в крестах

Диагностический титр

1:12 800



## Tube Agglutination Test



# РА развернутая (в пробирках) с целью определения титра антител (Видаля) -

диагностическая реакция агглютинации при брюшном тифе и других сальмонеллезах

В качестве антигенов используют стандартные тифо-паратифозные диагностикумы

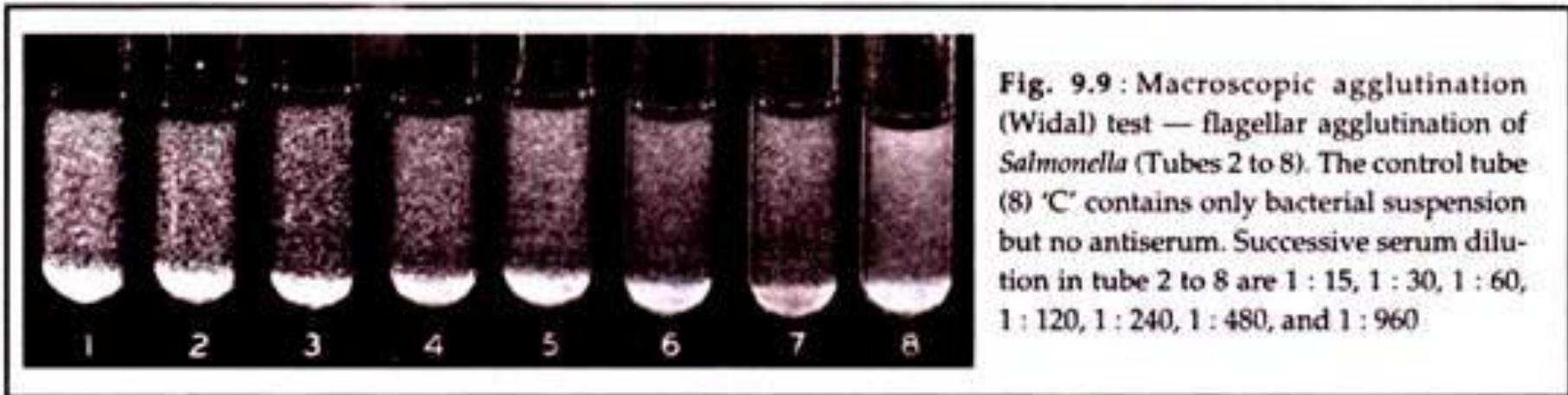
Соответственно АГ структуре возбудителя брюшного тифа в сыворотке больного могут присутствовать О-, Н-, Vi- агглютинины. Диагностическое значение имеют О-, Н-агглютинины

Для их обнаружения используют соответствующие диагностикумы (Н-диагностикум - культура, убитая формалином; О-диагностикум - культура, убитая спиртом или кипячением)

Результаты Н-агглютинации учитывают после 2-часового пребывания в термостате; О-агглютинация учитывается после 2-часового пребывания в термостате и 18-20 часов при комнатной температуре

О-антитела появляются первыми и исчезают быстро

Н-антитела сохраняются долго



# Оценка РА в крестах

- ++++ — полное просветление жидкости при наличии явно выраженного осадка (при встряхивании осадок разбивается на хлопья, комочки, в крупинки)
- +++ — те же явления, которые отмечаются для четырёх крестов, но жидкость слегка опалесцирует (недостаточно полное просветление)
- ++ — просветление жидкости выражено слабо. Имеется осадок, который при встряхивании разбивается на хлопья, комочки и крупинки
- + — отсутствие или весьма незначительное просветление при наличии слабо выраженного осадка или его следов. При встряхивании жидкости заметны комочки и крупинки
- — отрицательная реакция агглютинации. Отсутствие просветления и осадка

# Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации РНГА=РПГА (Indirect hemagglutination test)

Компоненты реакции:

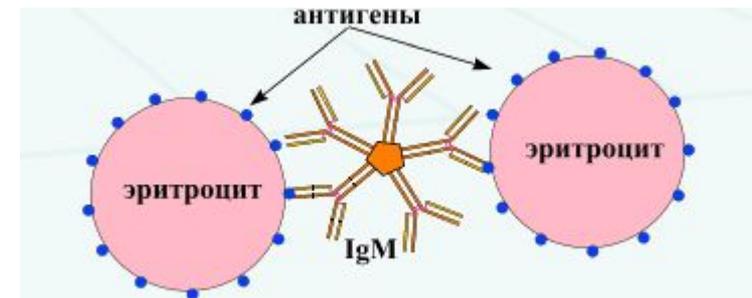
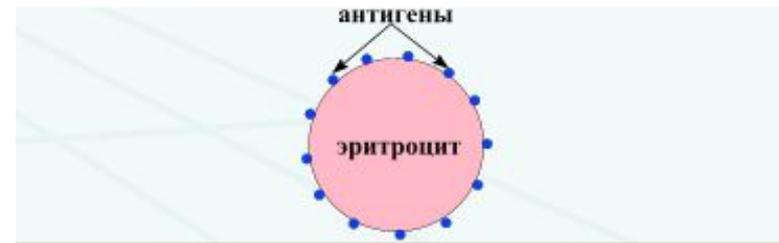
1. **Диагностикум** (антигенный или антительный)
2. Антитело или антиген
3. Электролит

**Диагностикум** - эритроциты, на поверхности которых предварительно адсорбированы антигены или антитела

# Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА=РПГА) (Indirect hemagglutination test)

Компоненты реакции:

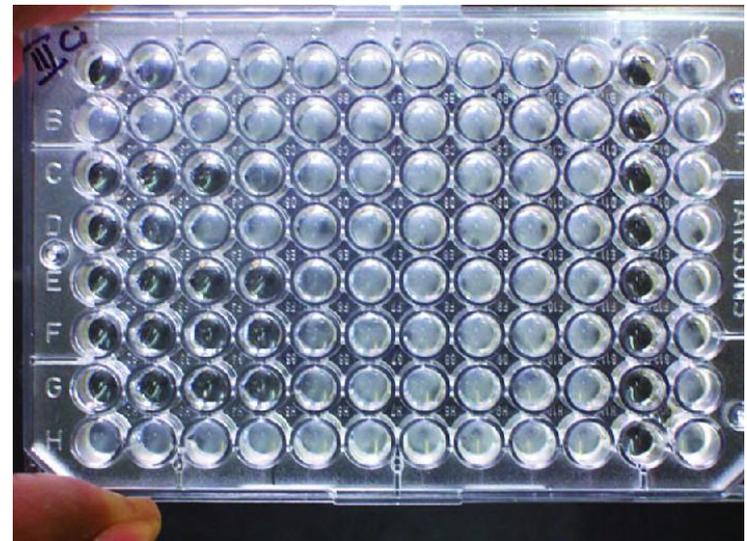
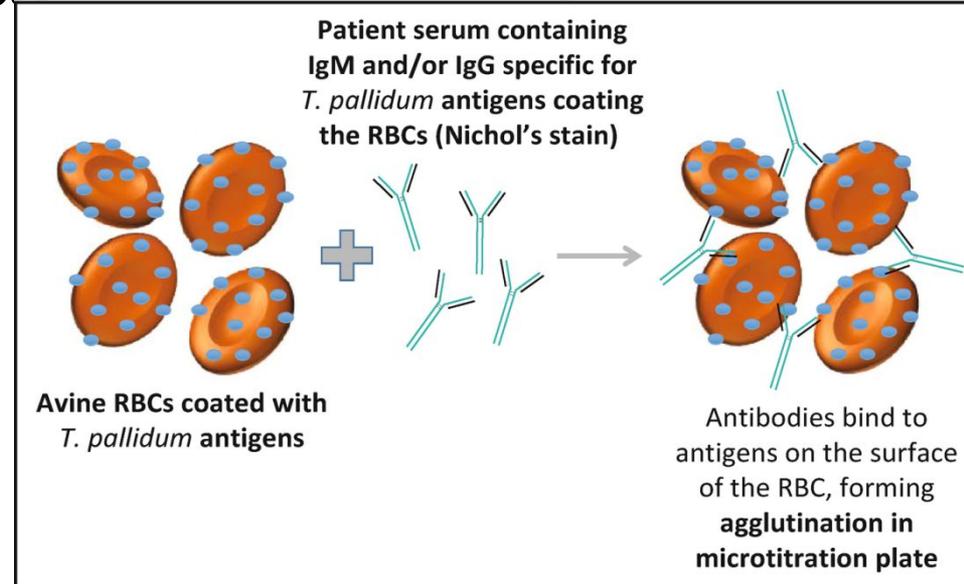
1. **Диагностикум**
2. Антитела или антигены
3. Электролит

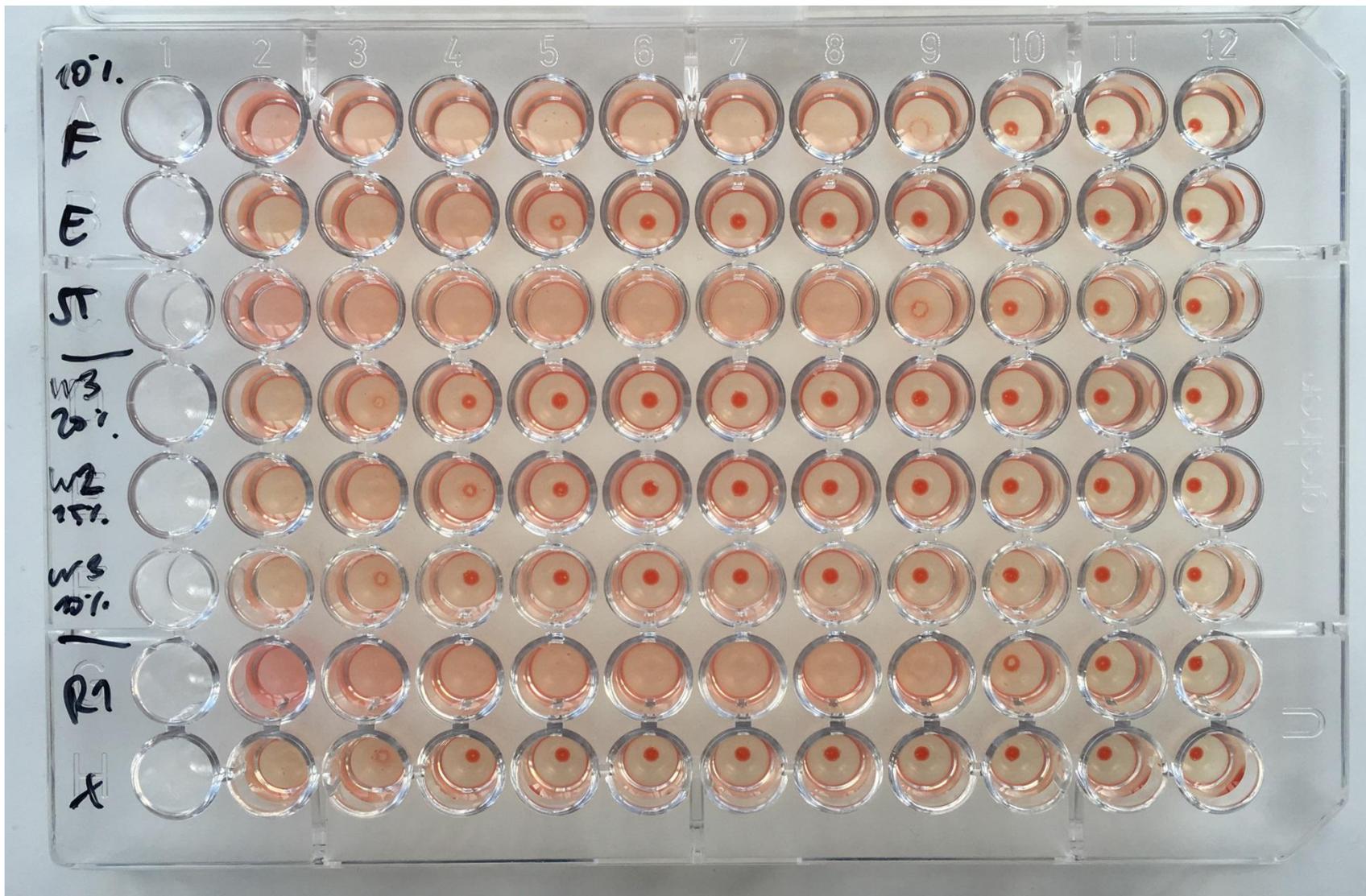


**Диагностикум** - эритроциты, на поверхности которых предварительно адсорбированы антигены или антитела (реакция обратной не прямой гемагглютинации)

# Реакция непрямой агглютинации (Indirect hemagglutination test)

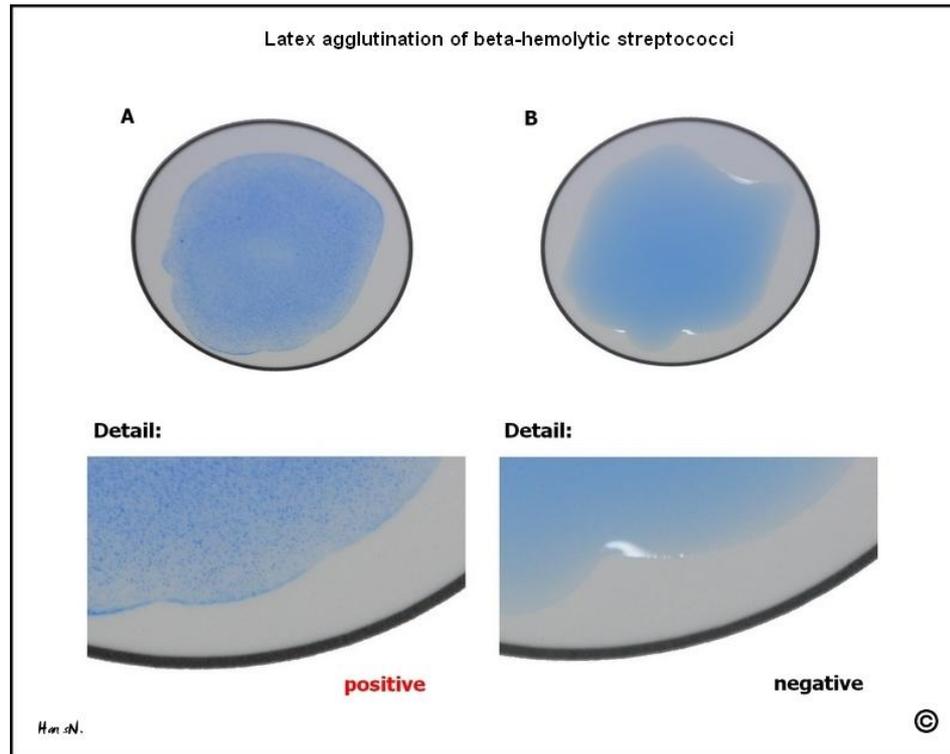
- РНГА проводится в планшетах для микротитрования, в которых предварительно готовятся разведения исследуемой сыворотки и контрольных образцов
- После внесения эритроцитарного диагностикума и инкубации проводится учет результатов реакции
- Положительными считают образцы, в которых происходит агглютинация эритроцитов, имеющая вид перевернутого “зонтика”
- При отрицательной реакции — эритроциты оседают на дно лунки в виде кольца или диска
- Для подтверждения специфичности полученных результатов реакция ставится как с “опытным” эритроцитарным диагностикумом (т. е. эритроциты, сенсibilизированные антигеном или антителами), так и с “контрольным” диагностикумом (т. е. эритроциты не сенсibilизированы антигеном или антителами). Наличие позитивной реакции с “контрольным” диагностическим препаратом свидетельствует о ложнопозитивной реакции.





# Реакция латекс агглютинации -

вариант РПГА, в которой частицы латекса с адсорбированными на них молекулами АГ/АТ агглютинируются соответствующими АТ/АГ



# Реакции преципитации

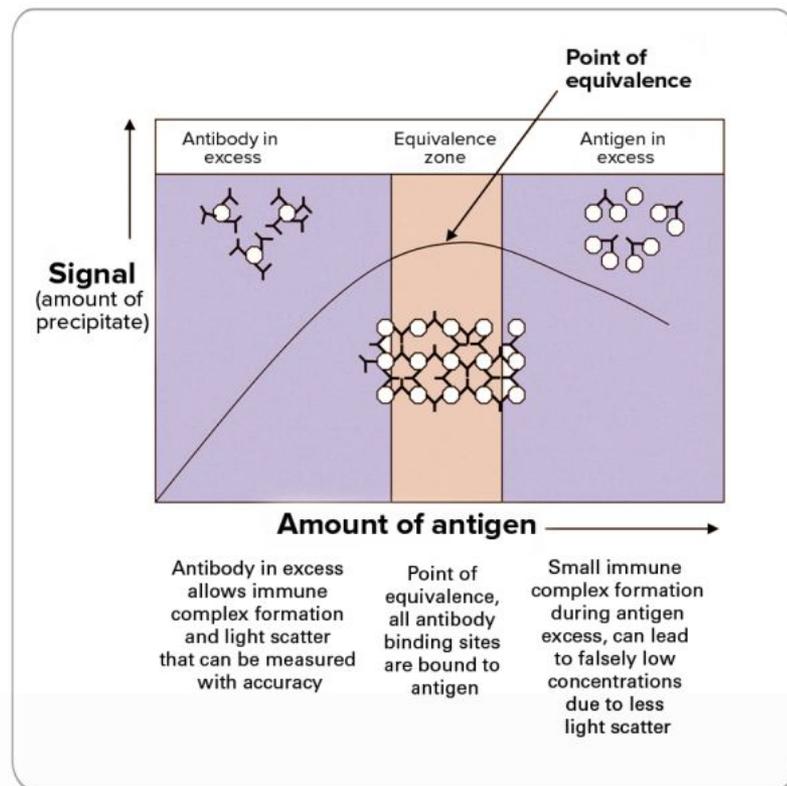
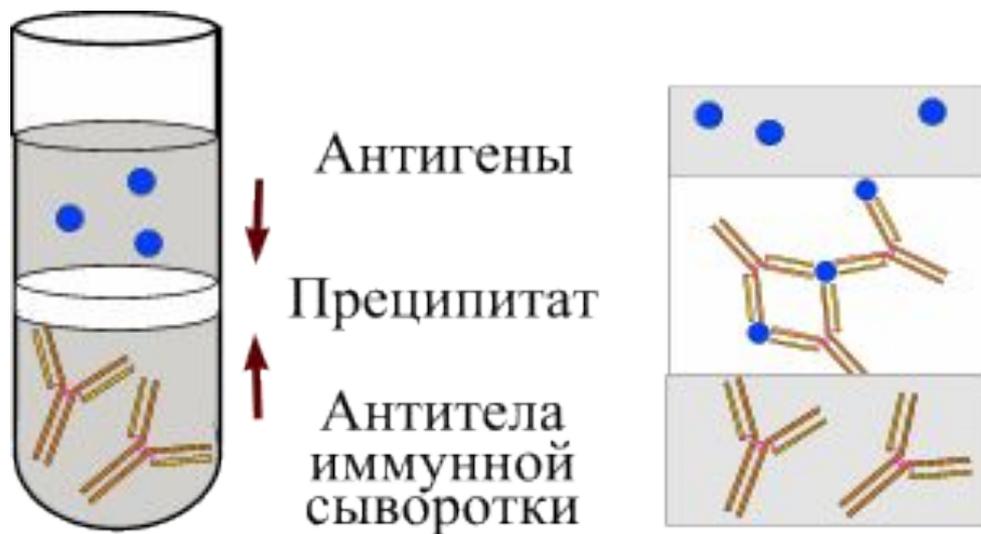
- от лат. praecipilo – осаждать
- это формирование и **осаждение** комплекса растворимого **молекулярного антигена** с антителами в виде помутнения, называемого *преципитатом*. Он образуется при смешивании антигенов (*преципитиногенов*) и антител (*преципитинов*) в эквивалентных количествах

Виды реакции преципитации:

1. **Кольцепреципитации (термопреципитации)**
2. **Двойной иммунодиффузии по Оухтерлони**
3. Радиальной иммунодиффузии (реакция Манчини)
4. Иммуноэлектрофорез
5. Флоккуляции (по Рамону)
6. **Реакция преципитации в геле (тест Элека)**

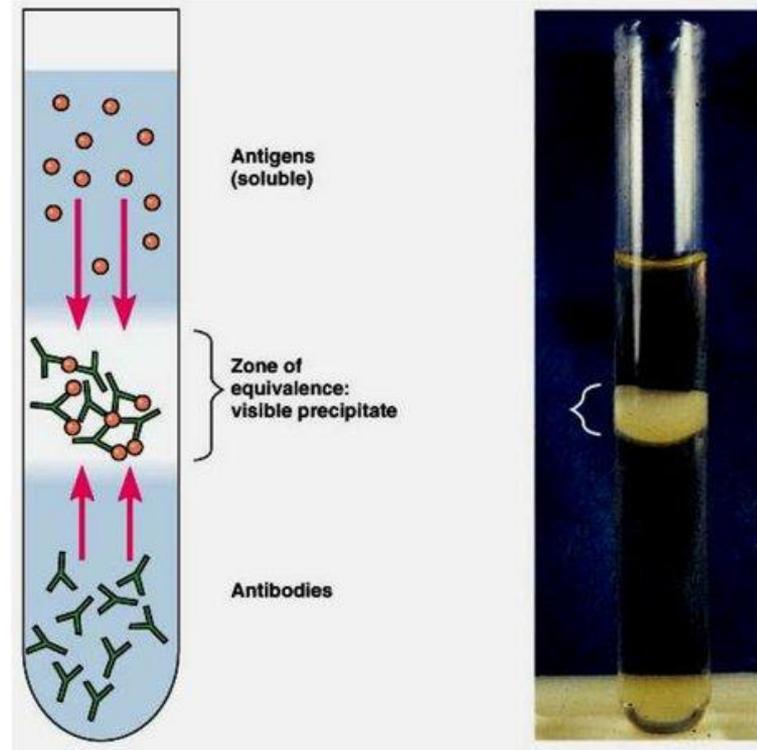
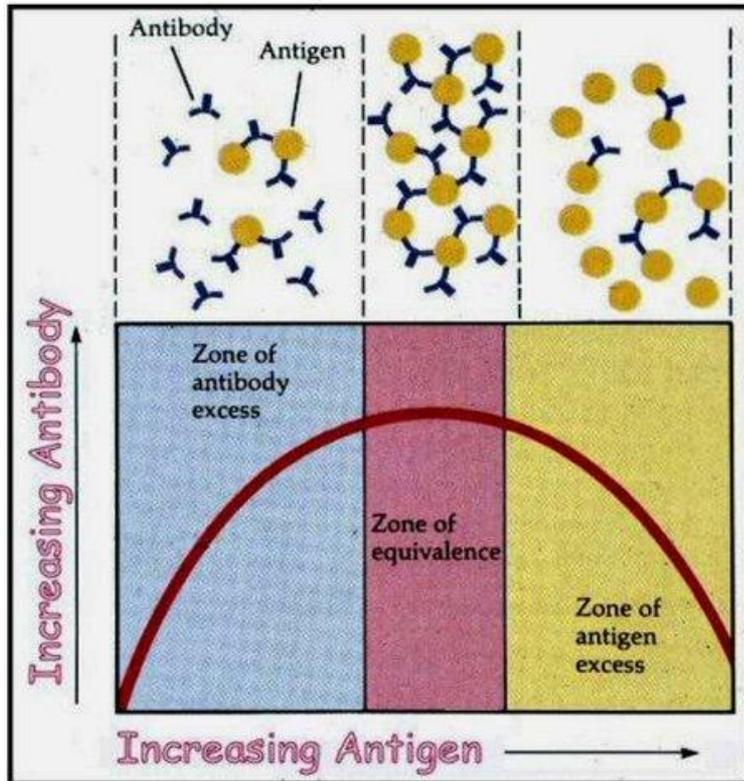
# Реакция термореципитации по Асколи

- Реакция для обнаружения АГ возбудителя сибирской язвы (*B.anthraxis*)



# Precipitation in solution.

## Ring precipitation test

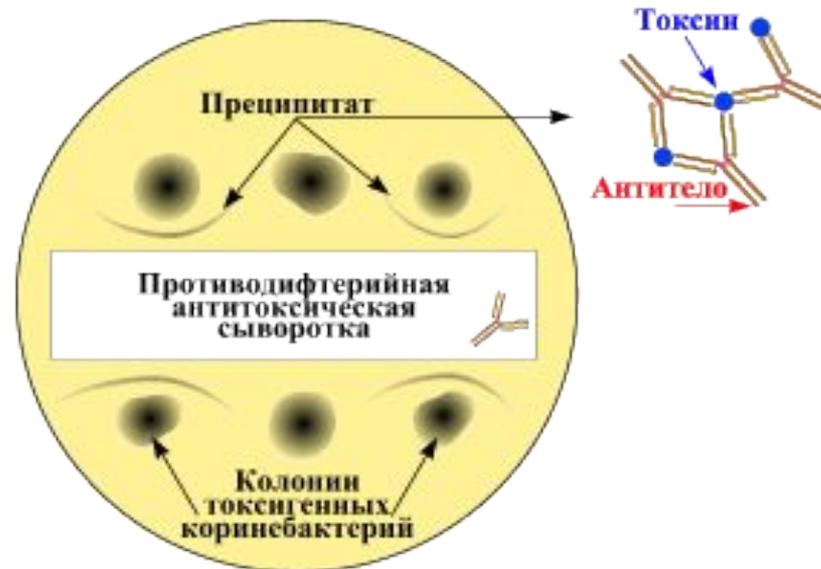


The precise "Zone of Equivalence"

# Реакция преципитации в геле (Элек тест) для определения токсигенности *C.diphtheriae*

Компоненты реакции:

1. Чашка Петри со средой
2. Токсигенная культура *C.diphtheriae* (контроль «+»)
3. Нетоксигенная культура *C.diphtheriae* (контроль «-»)
4. Исследуемая культура
5. Антитоксическая сыворотка (нанесена на фильтровальную бумагу)



Определение токсигенности дифтерийной палочки (преципитация в агаре).  
В центре - колонии нетоксигенного штамма.

**МИКРО**  **ГЕН**

ФГУП «НПО «Микроген» Моздрава России  
Россия, 115068, г. Москва, ул. Тим Дубровская, д. 15  
тел. (495) 710-37-07

Адрес производства:  
Россия, 614089, Пермский край, с. Пермь, ул. Братская, д. 177  
тел. (342) 281-94-86

Набор реагентов  
**Антитоксин диагностический дифтерийный  
очищенный ферментализом  
и специфической сорбцией сухой**

Стерильно

10 ампул по 1 мл

С 33

Дата изг. 1216

Годен до 0120

Для диагностики in vitro

Для лечебно-профилактических учреждений

Хранить при температуре от 2 до 8 °С

ТУ 9386-140-14237183-2009

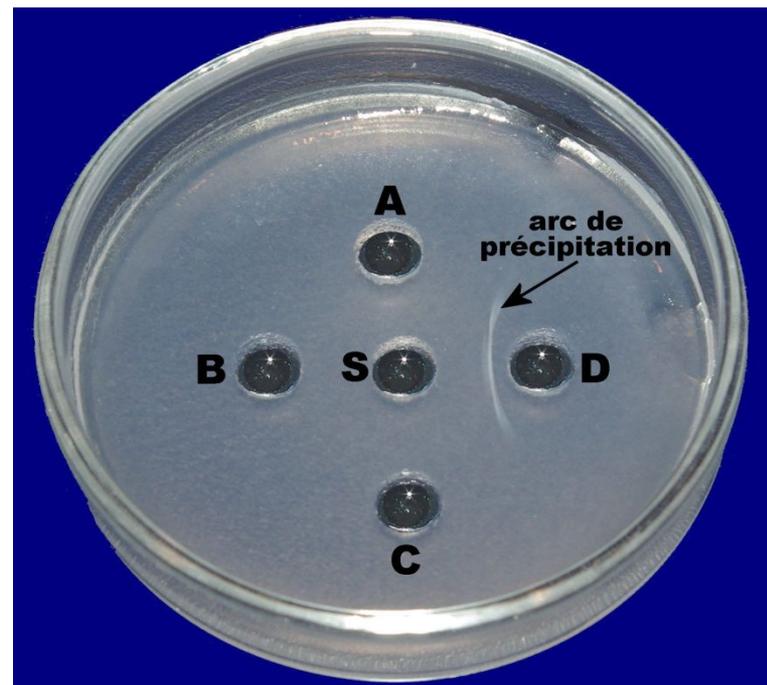
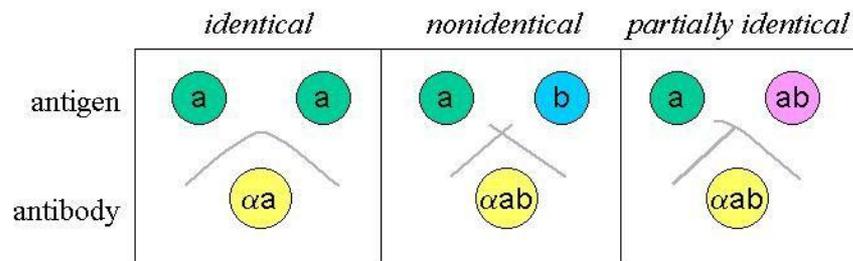
Р № ФСР 2009/06255 Дата регистрации 07.05.2013 г.



4602784000854

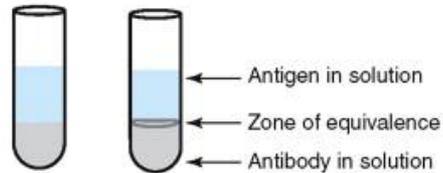
# Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони

- В основе реакции лежит реакция преципитация
- Для постановки реакции растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку
- После затвердевания в нем вырезают лунки
- В лунки геля отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу
- В месте встречи в эквивалентных соотношениях они образуют преципитат в виде белой полосы
- В многокомпонентных системах между лунками с антигенами и антителами появляется несколько линий преципитата
  - ✓ у идентичных АГ линии преципитата сливаются
  - ✓ у неидентичных АГ - пересекаются.

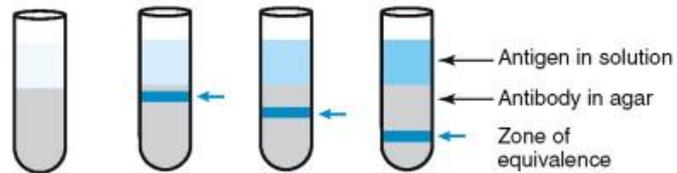


# Реакции преципитации

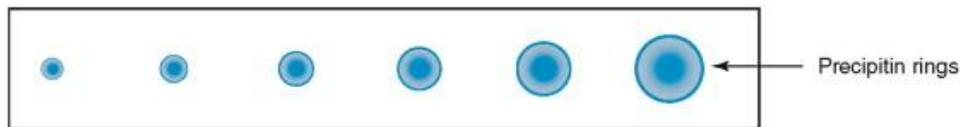
## A. Ring test (liquid medium)



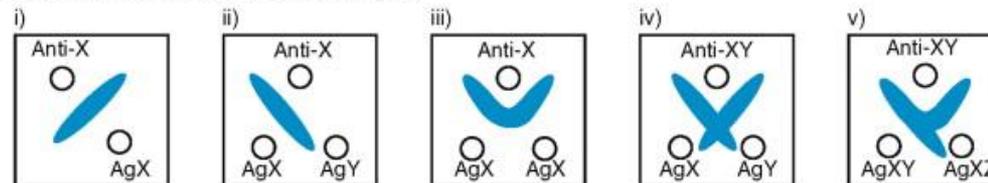
## B. One dimensional immunodiffusion (Oudin)



## C. Radial immunodiffusion (Mancini)



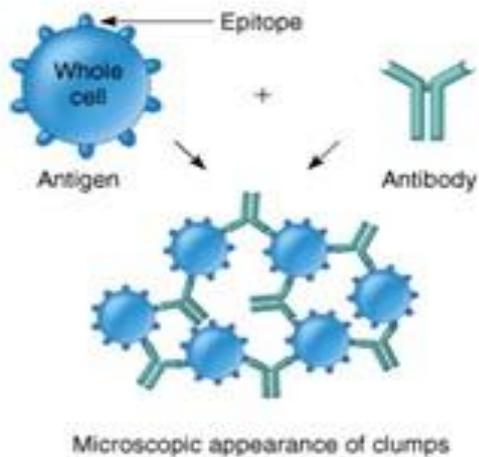
## D. Double immunodiffusion (Ouchterlony)



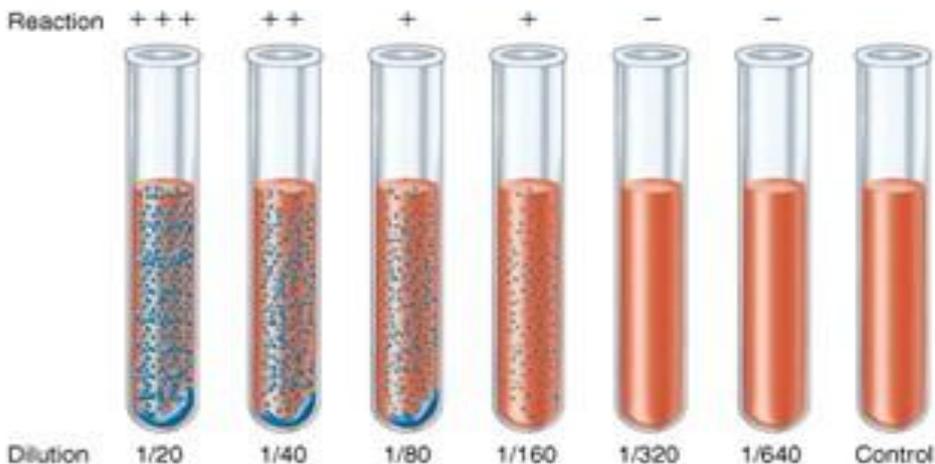
# Разница между реакцией агглютинации и реакцией преципитации

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

## Agglutination

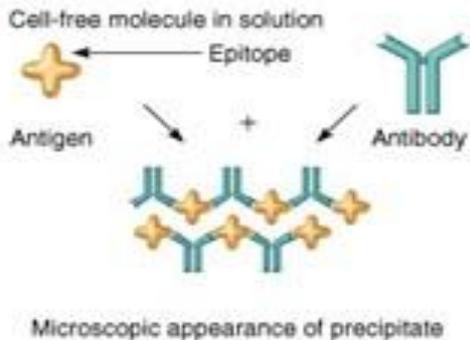


## The Tube Agglutination Test



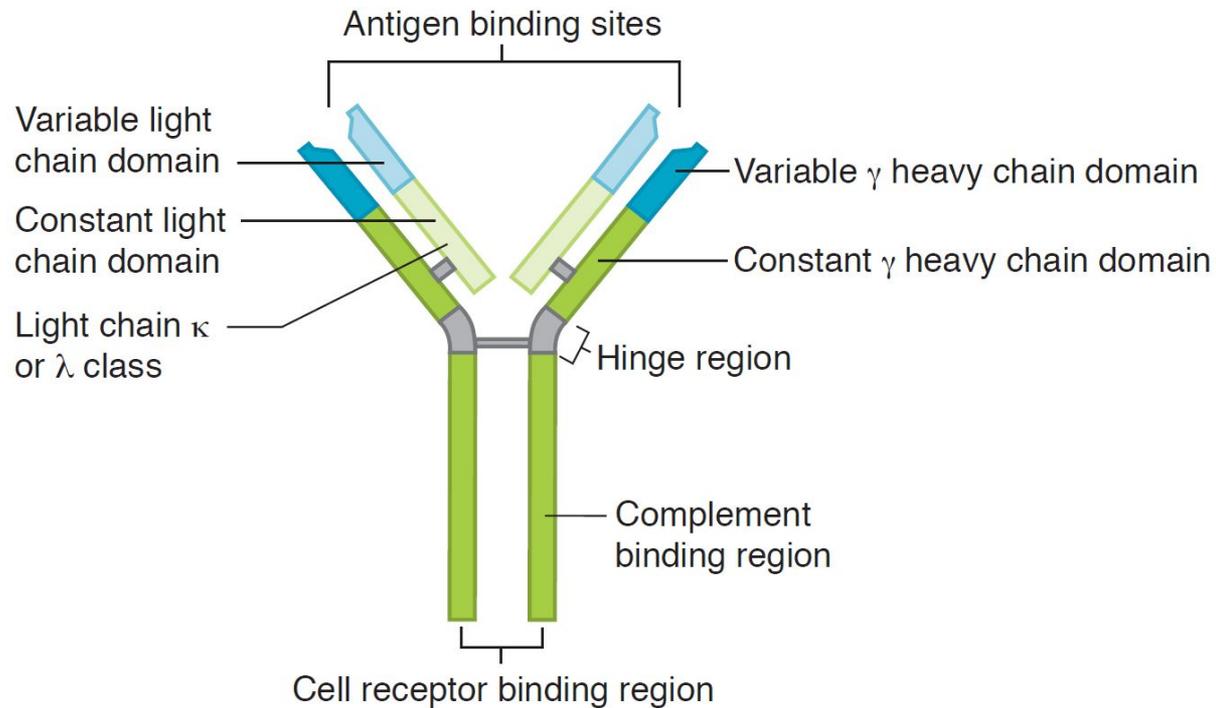
(b)

## Precipitation



(a)

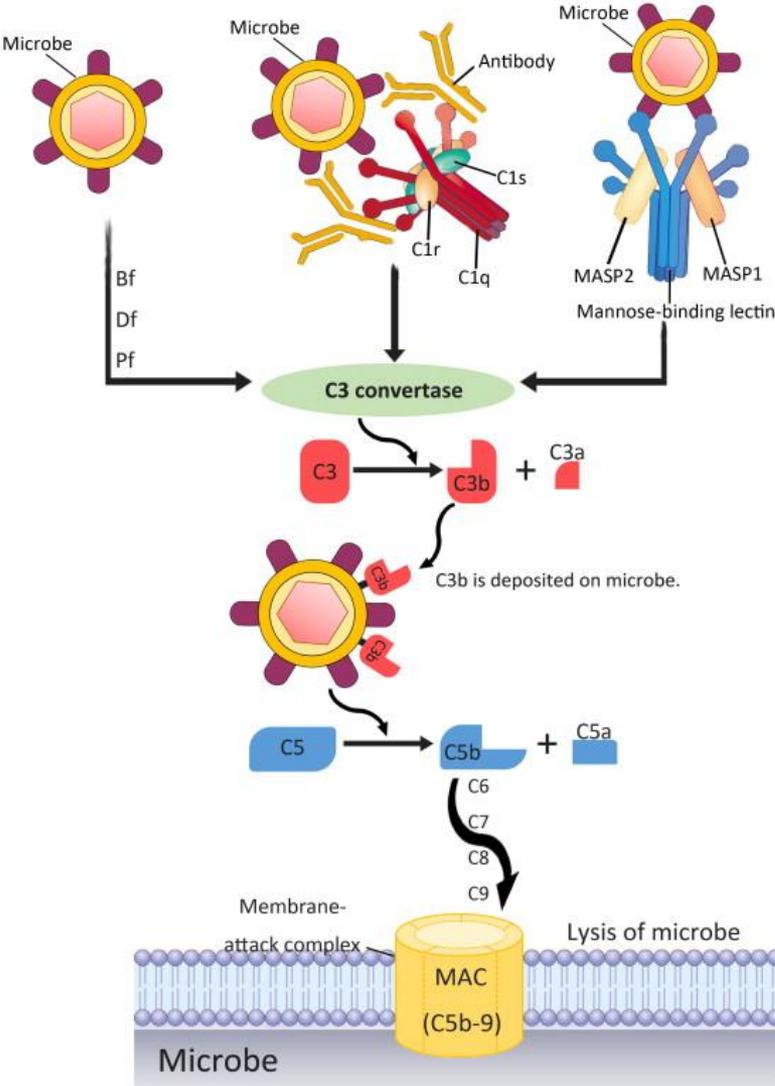
# Строение Ig



**Figure I-7-3.** Basic Structure of IgG

# Система комплемента

Alternative pathway      Classical pathway      Lectin pathway



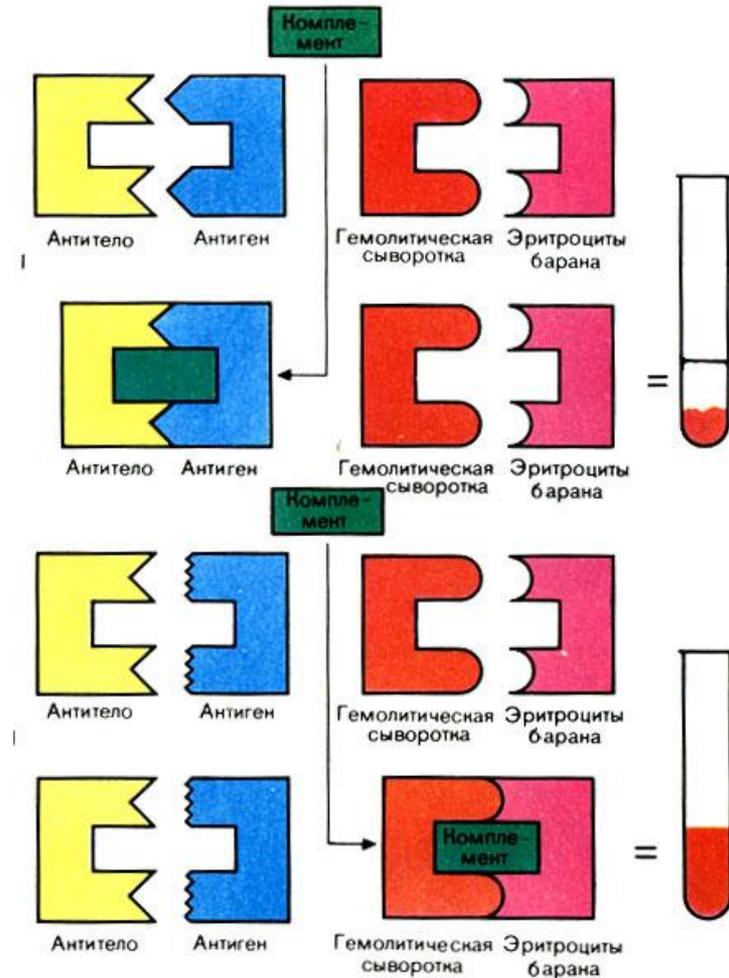
# Реакция связывания комплемента (РСК)

Компоненты реакции:

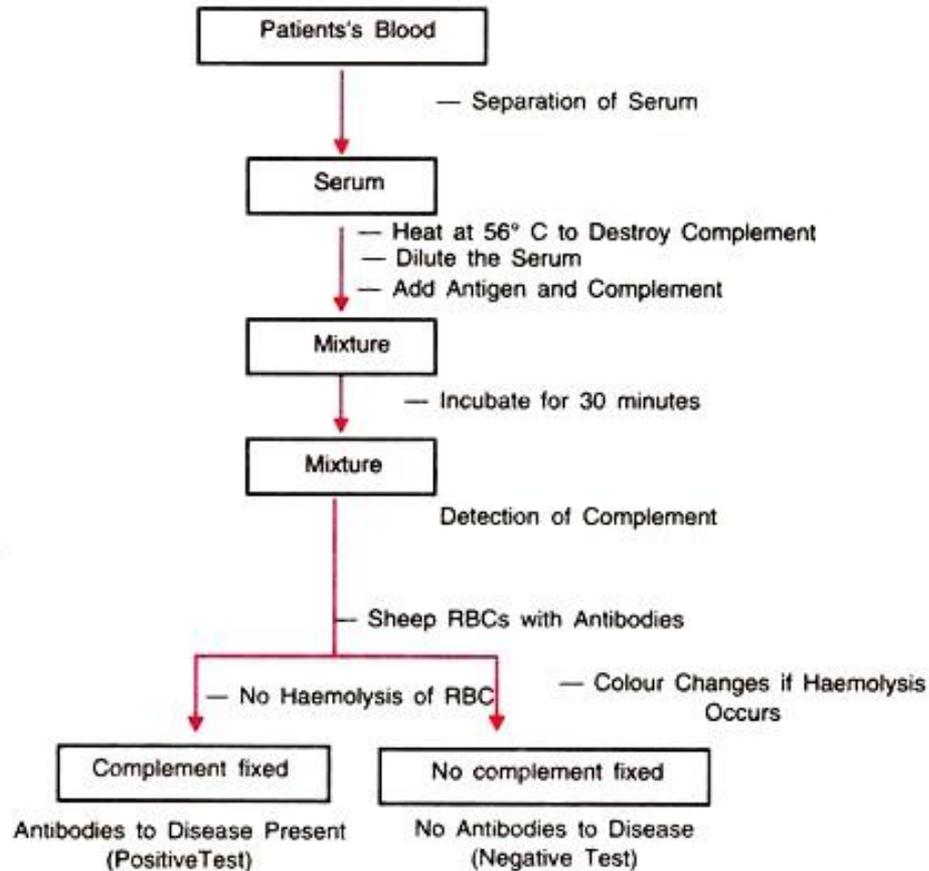
1. диагностическая система (АТ-?, АГ известный)
2. Индикаторная система (эритроциты барана (АГ), АТ к эритроцитам барана)
3. Комплемент

Особенности постановки:

1. Исследуемую сыворотку необходимо прогреть при температуре 56°C 30 мин-декомплементировать
2. Определить титр комплемента

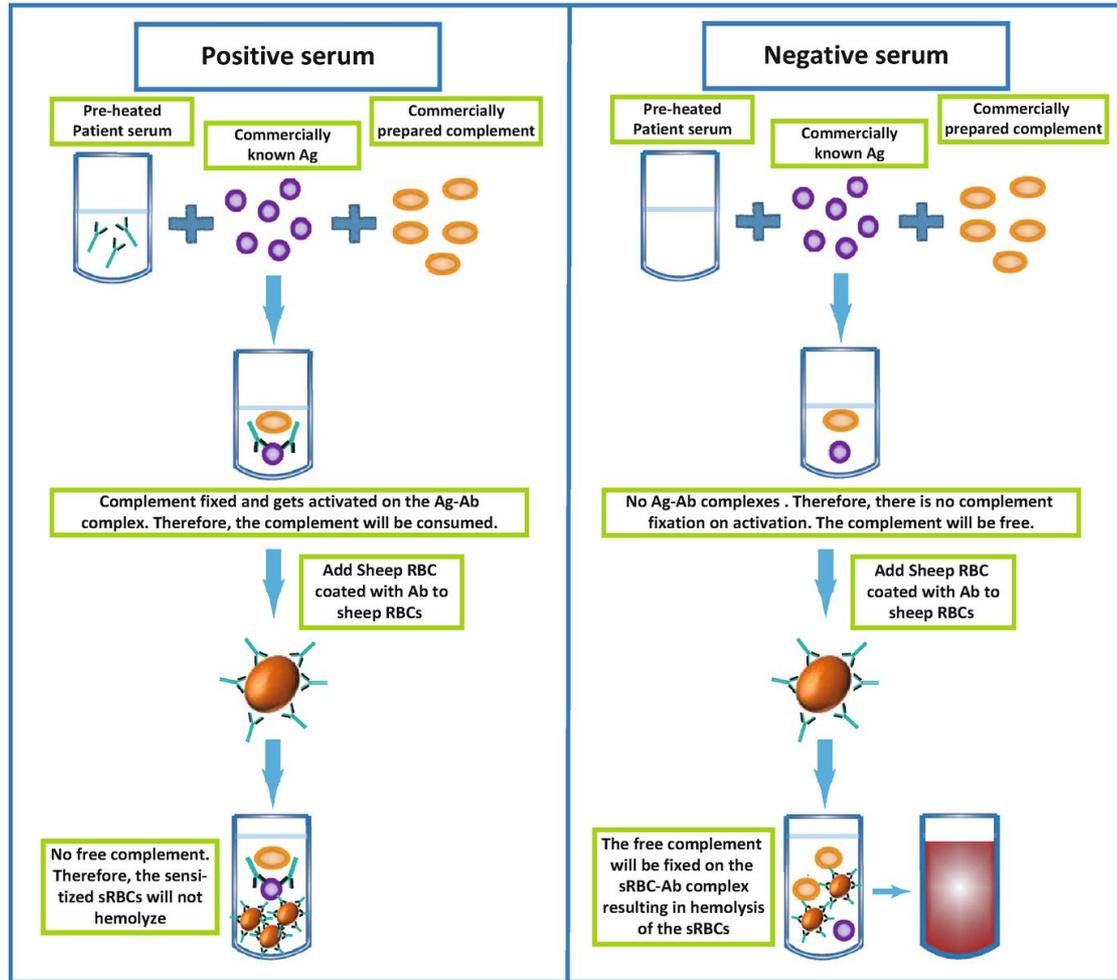


# Постановка РСК



**Fig. 22.25:** Procedure for complement fixation test.

# Схема РСК



КОМПЛЕМЕНТ СУХОЙ

Complementum siccum  
(для реакции связывания комплемента)

10 ампул по 1 мл  
Содержимое ампулы развести в 1 мл 0,85%  
хлористого натрия

# Реакции лизиса

## Реакция бактериолиза

Компоненты реакции:

- Бактерии
- Сыворотка, гомологичная бактериям
- Комплемент

Эту смесь инкубируют, затем производят посев на чашки Петри

## Реакция гемолиза

Компоненты реакции:

- Эритроциты барана
- АТ к эритроцитам барана
- Комплемент

# РЕАКЦИИ ЛИЗИСА

РЕАКЦИЯ БАКТЕРИОЛИЗА РЕАКЦИЯ СПИРОХЕТОЛИЗА	РЕАКЦИЯ ГЕМОЛИЗА
Используется с целью диагностики инфекционного заболевания - холеры	Используется при титровании комплемента и в качестве индикаторной системы в РСК

## Схема постановки реакции бактериолиза с целью определения роли комплемента

Компоненты реакции	Количество (в мл)	
	пробирка опытная	пробирка контрольная
1. Холерный вибрион (Ag)	0,1	0,1
2. Иммунная сыворотка (At)	0,2	0,2
3. Комплемент	0,3	-
4. Физиологический раствор	1,4	1,7

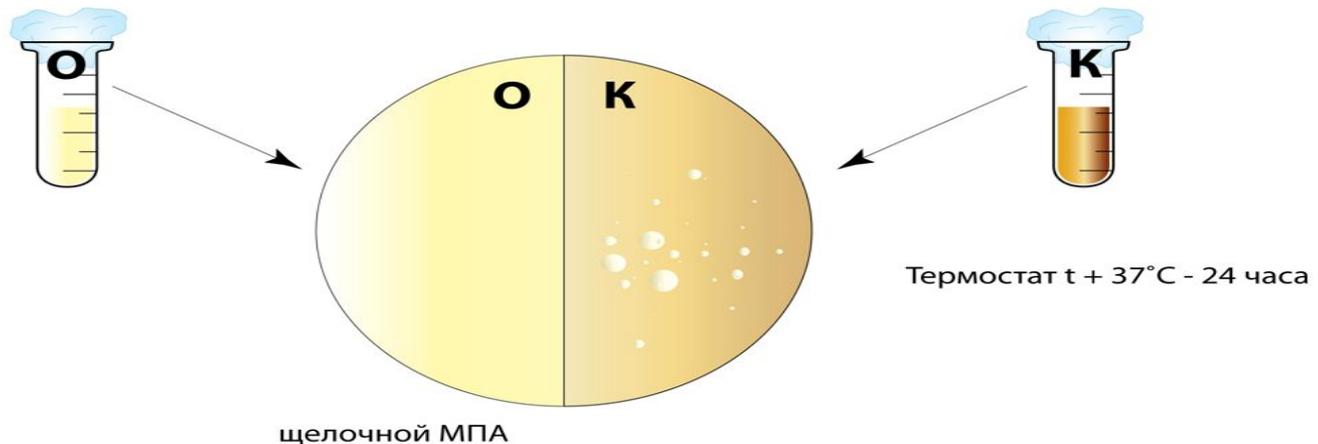
Пробирки выдерживают в течение 1 часа в термостате при  $t + 37^{\circ}\text{C}$ .

Контроль проводят через 1 час:

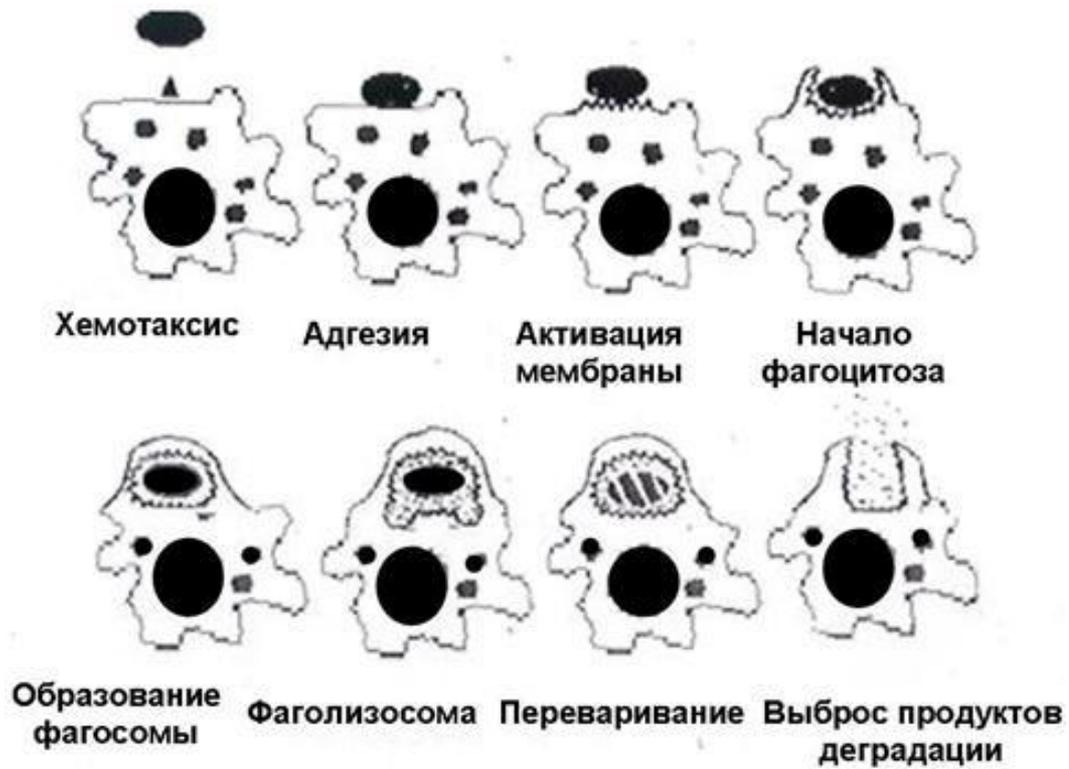
1. Микроскопия препаратов "раздавленная капля".



2. Посеве из пробирок на чашки Петри со щелочной МПА



# Фагоцитоз



по Ройту А., 1991

# Опсонофагоцитарная реакция

## Компоненты реакции

- АГ (взвесь живых или убитых микроорганизмов)
- АТ (опсонины) – исследуемая сыворотка
- Фагоциты (обычно нейтрофилы исследуемой крови)

## Постановка реакции

- Компоненты реакции смешивают, затем инкубируют 30 мин температура 37°С
- после чего вновь перемешивают и готовят мазки
- Окрашивают по Романовскому-Гимзе
- В мазках подсчитывают 25 нейтрофилов, учитывая в каждом из них количество захваченных микроорганизмов