

Занятие 23

Реакция преципитации и ее варианты (кольцепреципитация, иммунодиффузия в геле, иммуноэлектрофорез). Реакция нейтрализации токсина. Реакция радиальной иммунодиффузии

**dos. V.Nərimanov
prof. A.Qurbanov**

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.

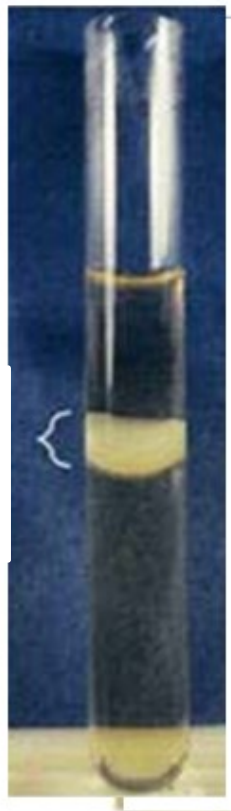
Реакция кольцепреципитации



Антиген

Видимый
преципитат

Иммунная
сыворотка



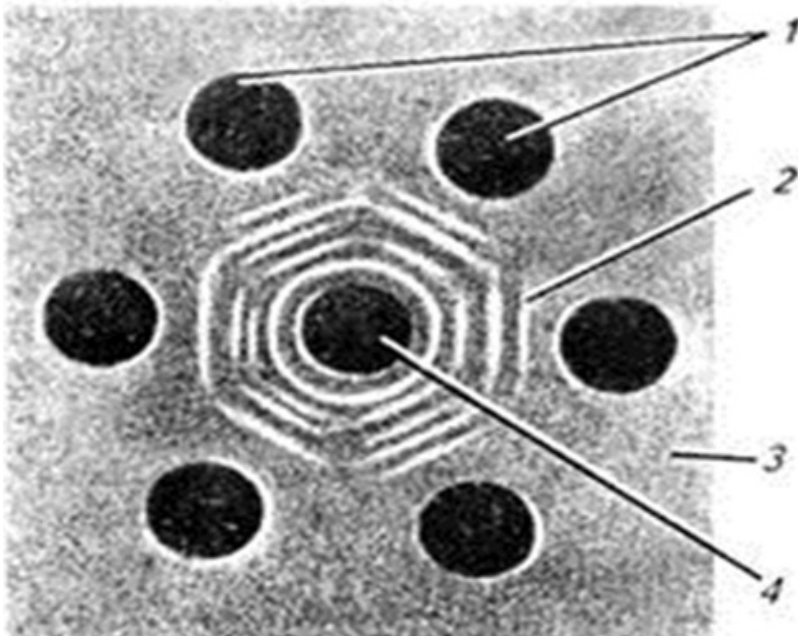
Реакция преципитации в агаре (геле)

- 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

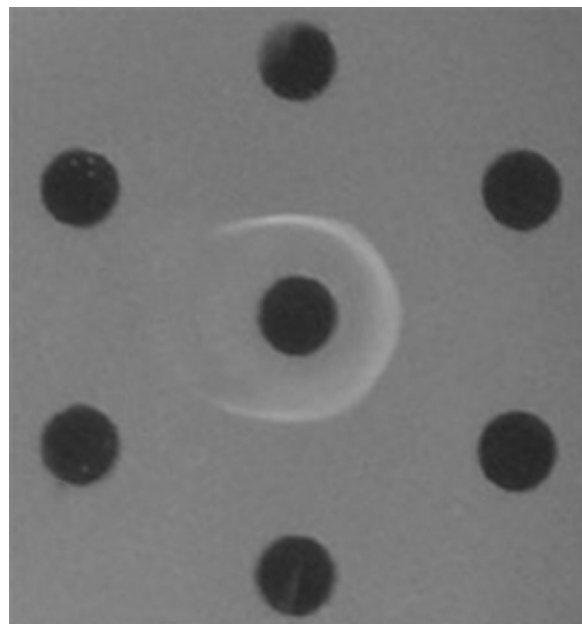
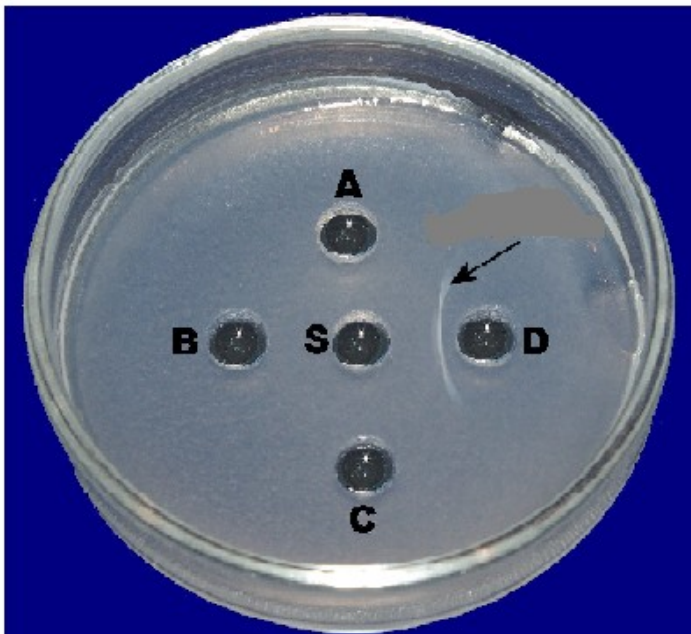
- Реакцию ставят в геле на стеклах или чашках Петри
- В слое геля вырезают лунки, в которые отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу.
- В месте встречи компонентов реакции в эквивалентных соотношениях образуется преципитат в виде белой полосы.

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



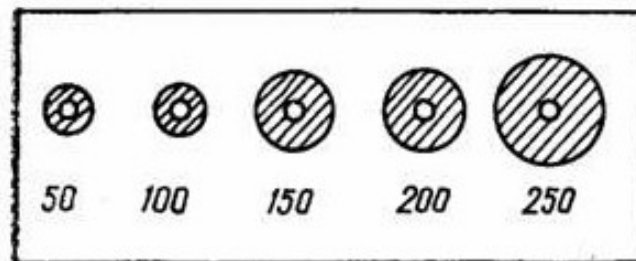
Определение токсигенности возбудителя дифтерии с помощью реакции преципитации в геле

- Токсигенность штаммов возбудителей дифтерии, выделенных от больных, определяют с помощью **метода Элека**.
- Для этого полосу стерильной фильтровальной бумаги, пропитанную противодифтерийной анитоксической 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

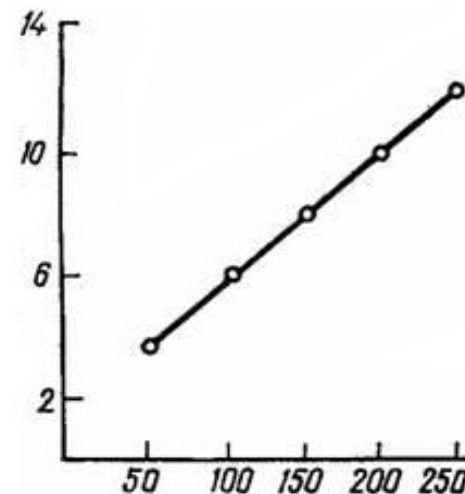


Реакция радиальной иммунодиффузии

- 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).



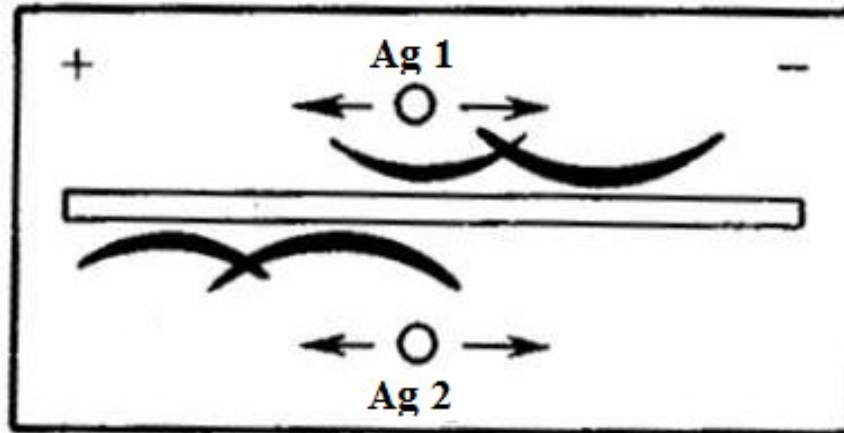
А



В

Иммуноэлектрофорез

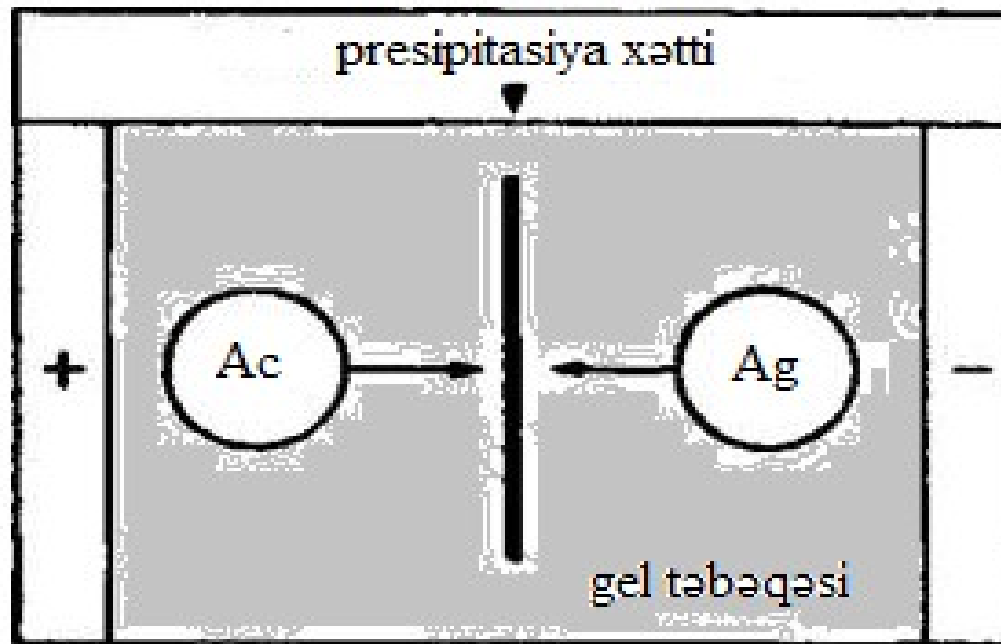
- **Иммуноэлектрофорез** – сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации; смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза.
- Затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой, диффундируя в гель, образуют в месте «встречи»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

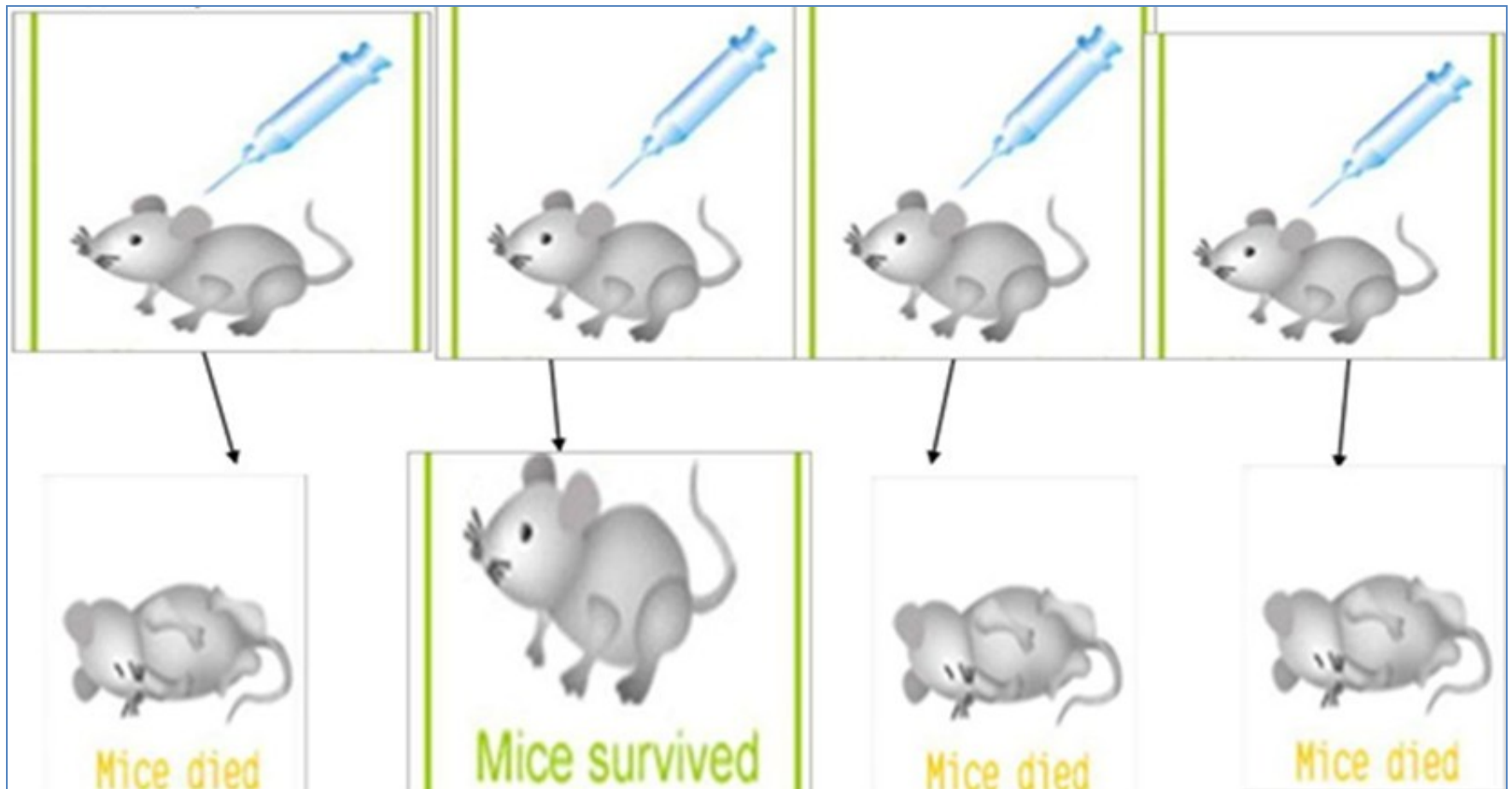
Встречный иммуноэлектрофорез



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. *floccus* — 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

