



Иммунологические серологические методы в лабораторной диагностике

План лекции

- Серологические методы исследований
- Реакции антиген-антитело
- Реакция преципитации
- Реакция агглютинации и ее различные варианты
- Реакция связывания комплемента
- Практическое выполнение и использование в практике

Серологические методы

Серологические реакции обозначают в соответствии с феноменами, сопровождающими образование комплекса «антиген-антитело» при взаимодействии различных по свойствам компонентов. Различают реакции агглютинации, преципитации и лизиса.

Реакция преципитации имеет 3 зоны

Зона избытка антител: количества антигена недостаточно для того, чтобы в реакцию вступили все антитела; в супернатанте определяются свободные антитела.

Зона эквивалентности: количества антигена достаточно для связывания и осаждения всех имеющихся антител; свободные антигены и антитела в супернатанте отсутствуют.

Зона избытка антигена: количество антигена превышает необходимое для связывания всех антител, что ведет к снижению содержания антител в преципитате. Это обусловлено солюбилизацией комплексов антиген–антитело вследствие избытка антигена. Выраженность этого феномена варьирует в зависимости от типа антител и вида организма, от которого получены антитела.

Количественная и качественная реакции преципитации. Реакция Манчини.

Методы, основанные на диффузии в геле, позволяют определять антигены и антитела лишь качественно, количественную же оценку реагирующих компонентов проводят разработанным позднее методом простой радиальной иммунодиффузии

Описанные методы используются для определения антигенов и антител в концентрации от 20 мкг/мл до 2 мг/мл.

Реакция Манчини. Принцип.

На ровную поверхность равномерным слоем наносят гель, содержащий антитела. В геле вырезают лунки и заполняют их раствором антигена. Молекулы антигена радиально диффундируют из лунки и, встретившись с антителами, образуют кольцо преципитации. До тех пор пока в лунке сохраняется избыток антигена, происходит постепенное увеличение диаметра кольца преципитации.

Метод радиальной иммунодиффузии был впервые предложен Манчини и сотр. в 1963 г. Два года спустя Фехей и Мак-Келви опубликовали его усовершенствованный вариант.

Микрореакция преципитации с кардиолипидным антигеном (экспресс метод)

- * Принцип.
- * При добавлении к плазме или сыворотке крови больного сифилисом эмульсии кардиолипидного антигена образуется преципитат (комплекс антиген - антитело), выпадающий в виде хлопьев белого цвета

Микрореакция преципитации с кардиолипидным антигеном. Оборудование.

- * - капиллярные пипетки аппарата Панченкова;
- * - градуированные пипетки 1, 2, 5 и 10 мл;
- * - автоматические пипетки на 20-200 мкл;
- * - наконечники для автоматических пипеток;
- * - пробирки длиной 8-10 см и 14-15 см, диаметром 1-1,5 см или центрифужные;
- * - пластинки из прозрачного материала с лунками диаметром 1-1,2 см, глубиной не менее 0,5 см;
- * - иглы для взятия крови из пальца и вены; шприцы;
- * - центрифуга, дающая не менее 1000 об/мин;
- * - аппарат для встряхивания;
- * - стерилизатор для кипячения игл, шприцов, инструментов.

Микрореакция преципитации с кардиолипидным антигеном. Реагенты.

- * - антиген кардиолипидный для микрореакции;
 - * - холин - хлорид (включается в упаковку с антигеном);
 - * - натрий хлорид х.ч.;
 - * - натрий лимоннокислый (цитрат натрия) трехзамещенный
 - * - мертиолат
-
- * Готовятся растворы:
 - * 0,9% раствор натрия хлорида
 - * 10% раствор холин-хлорида с мертиолом
 - * 5% раствор цитрата натрия

Приготовление кардиолипинового антигена

- * На 50 исследований требуется 1 мл кардиолипинового антигена).
- * В пробирку вносят сухой пипеткой не более 2 мл антигена, добавляя его к равному объему 0,9% изотонического раствора натрия хлорида, перемешивают, оставляют при комнатной температуре на 30 минут, затем центрифугируют при 1000 об/мин до получения прозрачной жидкости, которую удаляют, а к осадку добавляют 3,5 объема (по отношению к взятому антигену) 10% раствора холин - хлорида.
- * Пробирку плотно закрывают пробкой и содержимое перемешивают, опрокидывая пробирку, до полного ресуспендирования. Раствор готов.
- * При необходимости приготовления большого количества эмульсии, ее готовят в нескольких пробирках, внося в каждую из них по 2 мл антигена (лучшее перемешивание, защита от контаминации и солнечных лучей)

Хранение кардиолипинового антигена

- * Эмульсию антигена хранят в холодильнике при 4 град. не более недели, а при добавлении раствора мертиолата - в течение 2 недель.
- * В день постановки реакции нужное для данного рабочего дня количество эмульсии берут из холодильника, оставляют для согревания при комнатной температуре на 30 минут и перемешивают ее, опрокидывая пробирку, закрытую пробкой, не менее 30 раз, затем проверяют ее пригодность на контрольных сыворотках крови.
- * Применяемую эмульсию необходимо защищать от света, обернув пробирки с ней черной бумагой.

Контроль качества кардиолипидового антигена

- * О пригодности антигена судят по величине титров положительных сывороток крови с новой и проверенной сериями антигенов.
- * Серия пригодна - получение величин титров реагентов, отличающихся на ± 1 разведение и одинаковой выраженности хлопьев преципитата
- * Серию антигена бракуют, если одновременное титрование контрольной положительной сыворотки крови с новой серией антигена показывает:
 - * а) слабо выраженный преципитат ($2+/1+$) при минимальных разведениях сыворотки крови;
 - * б) более низкий (на 2-3 разведения) титр реагинов, чем с употреблявшейся проверенной серией;
 - * в) наличие преципитата в отрицательных сыворотках крови.

Микрореакция преципитации с кардиолипиновым антигеном. Контрольные материалы

- * **Положительный контроль.** Может использоваться пока дает положительный результат ++++ в разведении не менее 1:2 и ++ в разведении не менее 1:4
- * **Отрицательный контроль**
- * **Слабоположительный контроль** (готовится из положительной в лаборатории, используется разведение, давшее слабоположительный результат + или ++).
- * При отсутствии лиофилизированных материалов используют нативную сыворотку с титром не менее 1:8, которые хранят аликвотами по 0,5 мл в холодильнике.
Размораживание/оттаивание контролей не допускается!
- * В день постановки реакции титр сыворотки подтверждают
- * **Без контролей реакцию ставить нельзя!**

Материал для исследования

- * Кровь берут из пальца так же, как для исследования скорости оседания эритроцитов (СОЭ).
- * При взятии крови смачивают капилляр аппарата Панченкова 5% раствором цитрата натрия, набрав раствор до метки "25", а оставшийся цитрат натрия выливают в центрифужную пробирку, куда затем вносят три капилляра крови, взятой до метки "К", перемешивают.
- * Кровь отстаивают при комнатной температуре, а в экстренных случаях центрифугируют с целью получения плазмы крови, которую отсасывают автоматической пипеткой для проведения исследования.
- * Получение инактивированной сыворотки крови:
- * Кровь берут из вены, получают сыворотку крови и инактивируют ее так же, как для РСК.

Микрореакция преципитации с кардиолипидным антигеном. Качественная методика.

- * Забирают по 90 мкл плазмы или инактивированной сыворотки крови и вносят в лунки, куда затем добавляют по 30 мкл эмульсии кардиолипидного антигена.
- * В каждую лунку вносят плазму или сыворотку крови от одного обследуемого и нумеруют соответственно списку в регистрационном журнале.
- * Ингредиенты перемешивают встряхиванием пластины во встряхивателе (100 качаний в 1 минуту) в течение 5 минут, затем в каждую лунку добавляют по 90 мкл изотонического раствора натрия хлорида, перемешивают покачиванием пластины и оставляют при комнатной температуре на 5 минут (оптимальный температурный режим реакции 23-28 град.).
- * Результаты учитывают только после появления хлопьев в контрольной слабоположительной сыворотке крови

Микрореакция преципитации с кардиолипидным антигеном. Количественная методика.

- * В 9 лунок горизонтального ряда пластины, начиная со второй лунки, вносят по 90 мкл изотонического раствора натрия хлорида и добавляют в первую и вторую лунки по 90 мкл исследуемой плазмы или сыворотки крови. Делают серийные разведения
- * В первую лунку вносят только 90 мкл плазмы или сыворотки крови.
- * Во все лунки добавляют по 30 мкл эмульсии кардиолипидного антигена.
- * Пластину встряхивают 5 минут, после чего во все лунки добавляют по 90 мкл изотонического раствора натрия хлорида.
- * Через 5 минут регистрируют результаты так же, как при постановке качественной реакции.

Микрореакция преципитации с кардиолипидным антигеном. Количественная методика. Титр антител.

- * Титром преципитинов считают последнее разведение плазмы или сыворотки крови, где обнаружен преципитат.
- * Величина титра указывает на активность процесса, а его снижение во время лечения - на эффективность терапии.
- * Стабильность титров настораживает клиницистов в отношении эффективности терапии, увеличение же их требует пересмотра лечения.
- * Для получения достоверных результатов следует пользоваться одной и той же серией препарата при обследовании больного в процессе лечения, что относится ко всем реакциям на сифилис.

Ошибки при постановке микрореакции преципитации с кардиолипидным антигеном.

- * - неправильное взятие крови из пальца (наличие пузырей воздуха в капилляре пипеток);
- * - исключение из постановки реакции контрольных сывороток крови, в частности, слабopоложительных;
- * - неравномерная концентрация антигена в эмульсии вследствие недостаточного перемешивания ее перед использованием;
- * - бактериальное загрязнение эмульсии;
- * - нарушение сроков и условий хранения плазмы и сыворотки крови, антигена и его эмульсии, растворов;
- * - замена трехзамещенного цитрата натрия двухзамещенным;
- * - использование при постановке реакций загрязненных пробирок, пипеток, пластинок, растворов.

Реакция иммуноэлектрофореза.

Оценка метода.

- Использование в клинике – диагностика парапротеинемий, иммунодефициты
- Судебная медицина – исследование системы гаптоглобина, компоненты Gc
- Наука – идентификация белков в сложных смесях
- Метод последовательного наблюдения за процессом очистки белковых препаратов
- Контроль подлинности и чистоты препаратов

Встречный и ракетный электрофорез

Иммунодиффузию в электрическом поле можно производить с одновременным встречным движением антигенов и антител; этот способ назван встречным электрофорезом. Аналогичная модификация простой радиальной иммунодиффузии получила название ракетный электрофорез

Встречный иммуноэлектрофорез.

Оценка метода.

- Долго использовался для определения австралийского антигена, АФП
- Чувствительность в 10 раз выше метода Оухтерлони
- Результат можно учитывать через 2-3 часа
- Чувствительность для АФП – 3-5 мг белка на 1 литр
- Методика менее чувствительна, чем РСК, РПГА, ИФА, РИА

Реакции агглютинации

Если антитела присутствуют в столь низких концентрациях, что их не удастся обнаружить и количественно определить при помощи встречного и ракетного электрофореза, применяют реакцию гемагглютинации. Она основана на способности антител перекрестно связываться с эритроцитами, взаимодействуя с их поверхностными антигенами.

Реакция активной гемагглютинации

- Используют для выявления антител к антигенам эритроцитов
- Можно сенсibilизировать эритроциты другим антигеном (хлорид хрома, глутаровый альдегид, танниновая кислота и др)
- Серийно разводят сыворотку
- Вносят эритроциты, к которым добавлен белок, тормозящий неспецифическую агглютинацию
- Если антител достаточно, эритроциты оседают, образуя «пуговку»
- Для усиления реакции можно добавить вторые антитела (антиглобулиновый реагент, непрямая гемагглютинация)

Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации

- * Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации служит для выявления иммунных преципитатов, которые образуются в результате взаимодействия специфических антител с антигенами, фиксированными на поверхности эритроцитов.
- * Эритроциты оказываются вовлеченными в преципитацию и образуют агглютинаты.
- * Такой метод выявления первичного взаимодействия антиген-антитело обладает весьма высокой чувствительностью.
- * Чувствительность в пересчете на белковый азот 3-5 нг, приблизительно равна РСК и на порядок превосходит РА

Реакция латекс агглютинации

РЛА сходна с РНГА по принципу сорбции антител на поверхности более крупных частиц. В качестве носителя антител (иммуноглобулинов) используют нейтральный синтетический материал — частицы полистирольного латекса.

Реакция РЛА — экспресс-метод диагностики инфекционных болезней (время проведения — до 10 мин, возможно обнаружение антигена в небольшом объёме исследуемого материала). Для постановки РЛА используют стеклянные или темнопольные пластины.

РЛА применяют для индикации антигенов *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* типа b, *Neisseria meningitidis* в СМЖ, выявления стрептококков группы А в мазках из зева, в диагностике сальмонеллёзной инфекции, иерсиниозов и других заболеваний. Чувствительность метода — 1–10 нг/мл (10^3 – 10^6 бактериальных клеток в мл). Недостаток метода — возможность получения артефактов, особенно в присутствии ревматоидных факторов и продуктов фибринолиза.

Применение реакции агглютинации в лабораторной диагностике

- * Серологические реакции (в т.ч. на сифилис, бруцеллез, туляремия, лептоспироз, листериоз, шигеллез, иерсиниоз, псевдотуберкулез)
- * Определение аутоантител – ревматоидный фактор
- * Определение АСЛ-О
- * Определение С-реактивного протеина
- * Часто в качестве носителя используется латекс

Реакция связывания комплемента

Реакция антиген–антитело ведет к образованию иммунных комплексов, которые связывают комплемент при его активации по классическому пути, и на этом основан один из количественных методов определения антигенов и антител . С помощью реакций гемагглютинации и связывания комплемента удастся выявлять антитела, присутствующие в концентрации <1 мкг/мл.



Вопросы?