

Рис. 6. Выделение клеток крови на градиенте плотности

1. плазма + среда 199
2. мононуклеары (лимфоциты, моноциты)
3. градиент плотности 1.077 г/мл
4. гранулоциты
5. эритроциты

Доставленную в лабораторию кровь осторожно наслаивают на градиент плотности (смесь фиколла и уротраста) 1,077, который в количестве 3 мл помещают в центрифужную пробирку, пробу центрифугируют 30 минут при 1500 об/мин. В типичном варианте получают картину, изображенную на рисунке 6.

С помощью иглы и шприца отсасывают кольцо мононуклеаров, клетки промывают средой 199, центрифугируют 10 минут при 1500 об/мин. Готовят взвесь клеток в концентрации $3-10^6$ клеток в 1 мл.

В пробирке соединяют 0,1 мл суспензии лимфоцитов, 0,1 мл 1% взвеси эритроцитов барана, 0,1 мл зимозан-комплементарного комплекса, инкубируют смесь при 37°C 5 минут, центрифугируют 1 минуту при 1000 об/мин, далее инкубируют 1 час при 4°C .

Готовят мазок на предметном стекле, наносят клетки равномерным слоем с помощью пипетки. Мазок высушивают, фиксируют этиловым спиртом 10 минут, окрашивают метиленовой синькой 10 минут. Микроскопируют мазки с иммерсией, просчитывают 100 лейкоцитов и отмечают число розеток для выявления Т, В, Д, О лимфоцитов.

Т-лимфоциты: образуют розетки из 3 и более эритроцитов барана.

В-лимфоциты: образуют розетки из 3 и более частиц зимозана.

Д-лимфоциты: образуют розетки из 3 и более эритроцитов барана и одновременно из 3 и более частиц зимозана.

О-клетки — все прочие, не вошедшие в предыдущие типы розеток.

ТЕМА 3. ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ. АНТИГЕНЫ, АНТИТЕЛА, ОБЩИЕ ПОНЯТИЯ. ФЕНОМЕНЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИГЕНА И АНТИТЕЛА ИН ВИТРО. РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ.

Понятие об антигене является основополагающим в иммунологии, ибо без антигена нет иммунного ответа. Антигены — вещества, которые несут на себе признаки генетической специфичности, распознаваемой иммунной системой, и которые при введении в орга-

низм вызывают развитие специфического иммунного ответа (клеточного или гуморального характера). Типичной формой гуморального иммунного ответа, осуществляемого В-лимфоцитами, плазматическими клетками, является выработка и накопление антител в сыворотке крови.

Антитела-белки, относящиеся к разряду иммуноглобулинов, (классов А, М, G, E, D), образующиеся в организме в ответ на поступление антигена и обладающие способностью к специфическому взаимодействию с ним как в условиях организма (ин vivo), что обеспечивает различные эффекторные проявления гуморального иммунного ответа, так и в пробирке (ин vitro), что широко используется в иммунологии и смежных специальностях для определения неизвестного антигена или антитела.

Феномены взаимодействия антигенов и антител ин vitro разнообразны, но при всем многообразии специфичны, что и позволяет их использовать для идентификации антигенов или антител. Принцип идентификации искомого компонента иммунной реакции напоминает решение уравнения с одним неизвестным: для того, чтобы найти неизвестный член уравнения, необходимо, чтобы второй член был известным.

Если известен антиген, (в этом случае его называют диагностикумом, т. к. он позволяет установить диагноз), то можно найти в исследуемой сыворотке антитела, их количество. Поскольку метод основан на изучении сыворотки он называется серологическим, серодиагностикой.

Серодиагностика широко используется в инфекционной иммунологии. Высокая специфичность, исключая возможность перекрестных (неспецифических) реакций, достигается с помощью разных приемов. В серодиагностике — это нахождение так называемого диагностического титра, т. е. диагностически значимого разведения сыворотки, выше которого реакция принимается положительной (например, для брюшного тифа, бруцеллеза и др. — это титр 1/200), т. к. для специфических реакций типичны высокие уровни антител, для неспецифической — низкие.

Используется также прием двукратной постановки серологической реакции в динамике заболевания (с интервалом в 1—2 недели) для выявления нарастания титра специфических антител, значимым является нарастание четырехкратное и более. Определение титра антител в парных сыворотках часто применяется в вирусологии.

Серологические приемы используются также и в неинфекционной патологии для диагностики иммунопатологических реакций, для обнаружения противоорганных антител в аутоиммунной патологии. Конкретные примеры применения представлены в таблицах 4, 5, 6.

Кроме серодиагностики (поисков антител с помощью известных антигенов-диагностикумов) в инфекционной и неинфекционной

иммунологии широко применяется второй вариант реакции, когда с помощью известных антител (в этом случае препарат, содержащий известные антитела, позволяющие поставить диагноз, называются диагностическими сыворотками) определяют в реакции специфического взаимодействия неизвестный антиген. Для этого берут несколько диагностических сывороток, та из них, которая дает положительную реакцию, позволяет определить название искомого антигена, который специфически соответствует известной сыворотке.

Диагностические сыворотки получают путем иммунизации мелких животных (чаще всего кроликов, иногда овец, коз и др.) определенными антигенами, по которым и дается название сыворотке (дизентерийная, антиглобулиновая и т. д.). В отдельных случаях, например, при типировании лейкоцитарных антигенов HLA в качестве диагностических используют сыворотки многорожавших женщин, в крови которых содержатся антитела к антигенам плода.

При идентификации неизвестного антигена с помощью диагностических сывороток специфичность достигается либо за счет разведения сыворотки до диагностического титра, указанного на этикетке, либо за счет улучшения качества, специфичности самой диагностической сыворотки, для чего прибегают к удалению всех неспецифических антител с помощью приема адсорбции, истощения сыворотки неспецифическими антигенами. Для этого к сыворотке добавляют неспецифические антигены, которые соединяются с антителами, подлежащими удалению. Сыворотку освобождают от ненужных антител в комплексе с добавленными антигенами, путем центрифугирования, в надосадочной жидкости остаются только специфические антитела. При этом в истощенной сыворотке могут остаться специфические антитела к нескольким специфическим антигенам (специфическая адсорбированная поливалентная сыворотка), либо только к одному антигену (высоко специфическая, моновалентная сыворотка).

Высочайшей степени специфичности моноклональные сыворотки (антитела) получают с помощью гибридом специальной технологии, разработанной в 1975 Коллером и Милштейном, удостоенных за это открытие Нобелевской премии. Гибридная биотехнология основана на получении гибридной клетки из нормального лимфоцита, (благодаря которому она обладает способностью к продукции антител) и злокачественной миеломной клетки (благодаря которой она обладает способностью к неограниченному размножению). Моноклональные антитела представляют собой иммуноглобулины, синтезируемые одним клоном клеток. Клон — потомство одной клетки. Если обычные диагностические сыворотки (поликлональные антитела) даже самой высокой степени очистки представляют собой смесь молекул разных классов иммуноглобулинов, то моноклональные имеют абсолютную идентичность, а следовательно и специ-

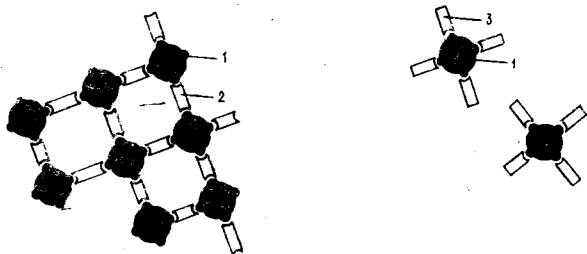


Рис. 7. Схема взаимодействия антигена с полными и неполными антителами

1. антиген
2. двухвалентное (полное) антитело
3. одновалентное (неполное) антитело

фичность, т. е. взаимодействуют лишь с одним антигеном.

Хотя специфическая фаза реакции во всех случаях сводится к комплементарному взаимодействию антигена и антитела, феноменология проявления в пробирке зависит также и от неспецифических условий реакции: наличие электролита (необходимого для реакции агглютинации и преципитации), комплемента (для реакции цитолиза и связывания комплемента), фагоцитов (для реакции опсонизации).

Принцип реакций первого поколения (агглютинация и преципитация) является общим и состоит в образовании крупных конгломератов при взаимодействии специфических антигенов и антител в присутствии электролита, их различие состоит в том, что в реакции агглютинации, как это видно из таблицы 4, антиген корпускулярный (клеточный), а в реакции преципитации (таблица 5) — растворимое вещество. Антитела в обеих реакциях относятся к категории полных, т. е. имеют минимум две валентности, каждая из которых может реагировать с антигеном. На рисунке 7 изображены схематически полные и неполные антитела, которые в отличие от полных имеют только одну валентность и поэтому не могут давать реакций агглютинации или преципитации, т. к. соединяются своей единственной валентностью только с одной антигенной детерминантой, крупных конгломератов не образуют.

Напротив, полные антитела, благодаря своим двум или более валентностям, образуют многочисленные перекрестные связи с многовалентными антигенами, что хорошо видно на схеме. На первом, специфическом этапе реакции происходит соединение антигена и антитела, эта реакция особенно интенсивно происходит в зоне эквивалентных соотношений антигена и антител, образуются первичные комплексы аг-ат. На последующих этапах реакции, в присутствии электролита происходит увеличение размеров агрегатов за счет полимеризации, соединения друг с другом первичных комплексов.

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

Антиген	Антитела	Неспецифические условия	Феномен	Технические варианты постановки реакции	Примеры
Корпускулярный (клеточный)	Иммуноглобулины классов А, М, С (агглютинины)	Наличие электролита (физиологический раствор)	Выпадение осадка	Вариант прямой агглютинации Качественная реакция, реакция на плоскости	Определение групп крови по системе АВО с диагностическими сыворотками Определение вида неизвестной культуры с диагностическими сыворотками
Носителем антигена (антитела) является клетка-члестница (эритроциты, латекс)	Иммуноглобулины классов А, М, С (агглютинины)	Наличие электролита (физиологический раствор)	Укрупнение частиц, характерный осадок в виде «зонтика».	Вариант не прямой (пассивной агглютинации) Качественная реакция: реакция на плоскости Количественная обратная реакция: в лунках планшета или в пробирке	Обнаружение антител и их количества в сыворотке — Изоантител к антигенам эритроцитов АВО — Антител к возбудителю инфекции для серодиагностики заболеваний (брюшной тиф, бруцеллез и т. д.). Определение ревматоидного фактора с эритроцитарным диагностиком (обнаружение антител) Обнаружение антител для серодиагностики вирусных заболеваний Обнаружение антител к изоантигенам для диагностики аутоиммунных заболеваний (II тип иммунопатологии) Обнаружение ревматоидного фактора с латексным диагностиком Обнаружение вирусных антигенов в исследуемом материале (культуральная жидкость, смыв из носоглотки) с помощью сорбированных на эритроцитах антител. Выявление неполных антител в реакции Кумбса для диагностики Rh-конфликта

Подробная характеристика реакции агглютинации приведена в таблице 4, в ней указан характер антигена, антител, неспецифические условия реакции, феномен, технические варианты постановки и примеры. Говоря о технических вариантах реакции, следует отметить, во-первых, что качественная реакция, позволяющая альтернативно ответить есть или нет соответствие антигена и антитела друг другу, всегда ставится на плоскости, количественная, позволяющая определить титр, максимальное разведение, в котором происходит реакция, проводится либо в пробирках, либо в лунках планшетов. Во-вторых, в варианте прямой реакции агглютинации в качестве антигена выступает клетка (это может быть бактерия, эритроцит и т. д.). В варианте пассивной агглютинации корпускула служит лишь носителем, к которому прикрепляется растворимый антиген, (вирусы, вещества, неполные антитела), при этом корпускула не проявляет своей собственной иммунологической специфичности, она механически участвует в реакции, ею приобретает специфичность того антигена, который к ней прикреплен. В качестве носителя используют частицы латекса, особенно часто — эритроциты.

СОДЕРЖАНИЕ ЗАНЯТИЯ

1. Общие понятия об антигене и антителах, гуморальном иммунитете.
2. Принципы серодиагностики, компоненты реакции, понятие о титре, нарастании титра антител в динамике заболевания, примеры применения.
3. Идентификация антигена с помощью диагностических сывороток, принципы повышения специфичности диагностических сывороток, примеры применения.
4. Реакция агглютинации, специфические и неспецифические компоненты реакции, феномен, варианты постановки, примеры применения.
5. Полные и неполные антитела, принцип их определения.

ДЕМОНСТРАЦИЯ

1. Развернутая реакция агглютинации в пробирках для определения количества антител в сыворотке больного с бактериальным диагностикумом.
2. Наборы диагностикумов, диагностических сывороток.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

1. Поставить прямую качественную реакцию агглютинации для определения гетерофильных антител (к ЭБ) в сыворотке крови человека.
2. Поставить прямую количественную реакцию агглютинации для определения титра гетерофильных антител (к ЭБ) в сыворотке крови человека. Схематически изобразить в протоколе принцип прямой реакции агглютинации в данном случае, когда антигеном является сам эритроцит.
3. Поставить пассивную качественную реакцию для обнаружения неполных антител на эритроцитах новорожденного с гемолитической бо-

ТЕМА 4: ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИГЕНОВ И АНТИТЕЛ ИН ВИТРО. РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ.

Реакция преципитации относится к реакциям I поколения. Принцип ее аналогичен реакции агглютинации и изложен в предыдущей теме. Реакция преципитации феноменологически проявляется выпадением осадка в зоне эквивалентных количественных соотношений специфического растворимого антигена и антитела в присутствии электролита. Таким образом, отличием реакции преципитации от агглютинации является некорпускулярный характер антигена. В связи с малыми размерами антигена чувствительность реакции преципитации уступает приблизительно на порядок реакции агглютинации и на 3 порядка пассивной агглютинации. Подробная характеристика реакции представлена в таблице 5.

Постановка реакции преципитации требует предварительного подбора оптимальных доз антигена и антител, т. к. максимальное количество преципитата образуется в зоне эквивалентных соотношений этих компонентов, что было показано классическими исследованиями Гейдельберга и Кэнделла. Если взять постоянную дозу антител и постепенно добавлять к ним возрастающие дозы антигена, то сначала, в избытке антител количество преципитата увеличивается, достигая максимума в зоне эквивалентности антигена и антител, а в зоне избытка антигена количество преципитата вновь падает, т. к. концентрация антител оказывается недостаточной для полного осаждения антигена, образуются небольшие растворимые комплексы.

Техника постановки реакции преципитации различна. Как видно из таблицы 5, возможен вариант постановки качественной реакции кольцепреципитации, когда на границе соприкосновения двух жидких реагентов (антигена и антител) образуется видимое на глаз кольцо помутнения.

Возможен вариант полуколичественной постановки реакции в пробирках, позволяющий определить титр реакции: готовят ряд двукратных разведений исследуемой сыворотки (или антигена) и добавляют одинаковый объем известного антигена (или антител). За титр реакции принимают максимальное разведение сыворотки (или антигена), которое дает еще реакцию преципитации.

Используют количественный вариант реакции: смешивают в пробирке оптимальные разведения антигена и антитела, инкубируют 30 минут при комнатной температуре, проводят фотометрию (при 450 нм) раствора. На основе калибровочной кривой оценивают реакцию количественно. Калибровочную кривую строят для растворов с известным содержанием антигена и антител. Одной и той же кривой можно пользоваться только при использовании одних и тех же реагентов.

РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Антиген	Антитела	Неспецифические условия	Феномен	Технические варианты постановки реакции	Примеры
Вещество (растворимый)	Иммуноглобулины классов М, G, A (преципитины)	Наличие электролита	Выпадение осадка в зоне эквивалентных соотношений антигена и антитела	<p>Реакция кольцепреципитации (на границе двух жидких сред)</p> <p>Реакция преципитации в жидкой фазе</p>	<p>Качественная реакция</p> <ul style="list-style-type: none"> — В судебной медицине для определения видовой принадлежности крови — В микробиологии реакция Асколи <p>Полуколичественный метод в иммунологии:</p> <ul style="list-style-type: none"> — Определение титра антител с помощью постоянной дозы антигена — Определение титра антигена с помощью постоянной дозы сыворотки <p>Количественный метод в иммунологии</p> <ul style="list-style-type: none"> — Фотометрическое определение количества антигена или антитела с помощью стандартной калибровочной кривой — В микробиологии для определения токсигенности дифтерийных бактерий — В иммунологии для определения идентичности антигенов — В иммунологии для определения количества иммуноглобулинов классов А, М, G — Выявление дефицита сывороточных белков, определение чистоты белковых препаратов, идентификация неизвестных антигенов

В настоящее время широко применяется реакция преципитации в геле. Метод двойной диффузии, предложенный в 1947 году Ухтерлони в Швеции, заключается в том, что антиген и антитела одновременно диффундируют навстречу друг другу и образуют в зоне их эквивалентных соотношений преципитат.

Метод радиальной иммунодиффузии был разработан Манчини в 1963 году.

Метод основан на диффузии только одного (исследуемого) реагента, второй (известный) помещен в толщину агара. Для этого берут стеклянную пластину, наносят на нее слой агара, смешанный с известной диагностической сывороткой, в лунки вырезанные в агаре, вносят определяемый антиген. Исследуемый реагент (антиген) при диффузии в зоне эквивалентных соотношений с антителами образует зоны преципитации, измерив диаметр которых можно судить о количестве антигена. Метод широко применяется в иммунологии для количественного определения антител в сыворотке крови.

Иммуноэлектрофорез предложен в 1953 году Грабаром и Уильямсом. Принцип метода основан на сочетании электрофоретического разделения антигена в агаровом слое с последующей преципитацией. Для этого наносят на стекло агаровый гель, в котором вырезают лунки для антигена и канавки для диагностических сывороток. Вносят в лунки антиген, проводят электрофорез (2 часа), вносят в канавки, вырезанные параллельно движению антигена, диагностические сыворотки (или исследуемые сыворотки, тогда берут известный антиген). В течение 24 часов проходит взаимная диффузия антигенов и антител. Учитывают реакцию по появлению дугообразных линий преципитации.

На рисунке 8 приводим пример идентификации неизвестного антигена с помощью сопоставления его с известным контрольным антигеном.

СОДЕРЖАНИЕ ЗАНЯТИЯ

1. Реакция преципитации, определение, компоненты, условия, феномен.
2. Технические варианты постановки, примеры.

ДЕМОНСТРАЦИЯ

1. Метод двойной диффузии в агаре для определения токсигенности дифтерийных бактерий.
2. Демонстрация этапов метода иммуноэлектрофореза.
3. Иммуноэлектрофореграмма для определения чистоты белкового препарата.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

1. Поставить реакцию кольцепреципитации для определения видовой принадлежности крови.