

**ПРИНЦИП ПОСТАНОВКИ РСК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИТРА АНТИТЕЛ
К АНТИГЕНАМ ИЗ ПОЧЕЧНЫХ ТКАНЕЙ**

Ингредиенты	1	2	3	4	5	6	7
Исследуемая сыворотка в объеме 0,5 мл	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	— Контроль сыворотки
Контрольная сыворотка (без ат к почечному аг) в разведении 1/5	—	—	—	—	—	—	0,5
Антиген в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Инкубация в термостате 1 час.							
Гемолитическая система	1	1	1	1	1	1	1
Учет реакции через 1 час инкубирования в термостате							Гемолиз

В таблице приведен только 1 контроль, следует поставить также контроль антигена, комплемента, гемолитической системы.

ТЕМА 6: ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ. ФЕНОМЕНЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИГЕНА И АНТИТЕЛА ИН ВИТРО. РЕАКЦИИ III ПОКОЛЕНИЯ.

К иммунологическим реакциям III поколения, широко применяемым в настоящее время в иммунологии, относятся иммунофлюоресцентный, радиоиммунный и иммуноферментный методы. Реакции последнего поколения основаны на использовании меченых антигенов или антител. В качестве метки применяют флюоресцентную, изотопную или ферментную технику соответственно, что значительно повышает чувствительность реакции. Принцип реакции во всех случаях является общим. Если ставят прямой вариант реакции, то метку вводят непосредственно в аг или антитело, схема реакции дана на рисунке 9. Если ставят непрямой вариант, то используют сначала немеченые антигены и (диагностическую) сыворотку, а затем добавляют для выявления происшедшей специфической реакции антиген + антитело вторую, меченую сыворотку против глобулинов первой сыворотки. Схема реакции дана на рисунке 10.

Имунофлюоресцентный метод (ИФМ) основан на качественной

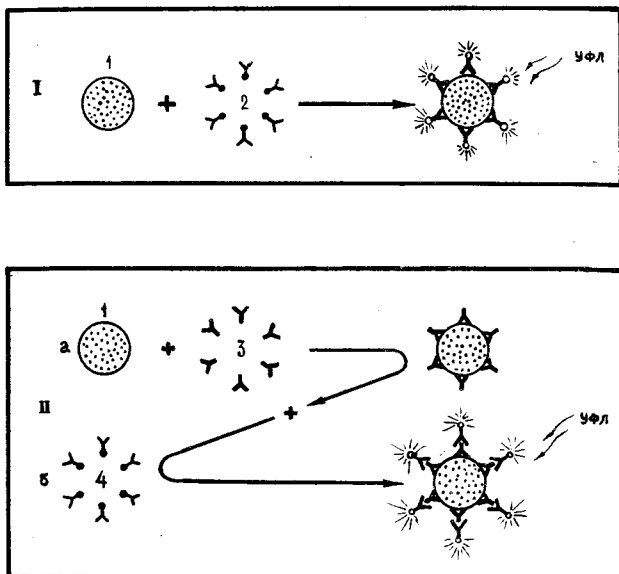


Рис. 10. Схема иммунофлуоресцентного метода

I. прямой ИФМ

II. непрямой ИФМ

1. корпускулярный антиген

2. люминесцентная диагностическая сыворотка

3. немеченная диагностическая сыворотка

4. антиглобулиновая сыворотка, меченная флюорохро-
мом

оценке флуоресценции при взаимодействии меченных флюорохромом антител с гомологичным антигеном, локализованным на поверхности клеток или срезов тканей.

Подробная характеристика реакции представлена в таблице 9. В ИФМ чаще используют меченые антитела, которые получают путем конъюгации с флюорохромом. В качестве флюорохрома применяют сине-зеленый краситель (флуоресцеин изотиоцианат), красно-оранжевый (родамин). Объектом исследования обычно бывают срезы из тканей, клеточный материал от больного; препараты после соответствующей обработки изучают в люминесцентном микроскопе, отмечая наличие свечения или отсутствие его.

Схема прямой реакции представлена на рисунке 10. При постановке этого варианта ИФМ на препарат наносят с целью обнаружения какого-либо антигена (возбудителя заболевания, иммуноглобулинов) меченную флюорохромом диагностическую сыворотку. Если антиген и антитело соответствуют друг другу, то наблюдается интенсивное свечение в области образования специфического комплекса. Конкретные примеры применения прямого метода представлены в таблице 9.

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД

Антиген	Антигена	Метка	Учет реакции	Технические варианты постановки	Примеры
Локализован на тканевых срезах, изолированных клетках	Иммуноглобулины классов А, М, G	Флюоресцирующий краситель (флюоресценцианат, родамин)	В люминесцентном микроскопе: флюоресценция образующегося комплекса антиген-меченое анти-тело	<p>Качественная реакция Прямой вариант: на препарат, срез на-носят диагностическую сыворотку, меченую флюорохромом</p> <p>Непрямой вариант: 1 этап: на препарат на-носят диагностическую немеченую сыворотку 2 этап: наносят мече-ную диагностическую сыворотку (против соответствующего ви-да глобулинов первой сыворотки).</p>	<p>— В инфекционной иммунологии для обнаружения возбудителя в мате-риале от больного</p> <p>— В клинической иммунологии для выявления иммуноглобулинов на кле-точной мембране</p> <p>— Для обнаружения аутоантител фик-сированных на ткани почек, легких</p> <p>— Для доказательства иммунопато-логических реакций, протекающих в организме, путем обнаружения фиксиро-ванных иммунных комплексов, ком-понентов комплемента</p> <p>— Обнаружение возбудителей в ма-териале от больного</p> <p>— Обнаружение антиядерных анти-тел при системной красной волчанке (на срез печени животного наносят сыворотку больного, затем обрабаты-вают препарат меченой сывороткой против глобулинов человека)</p>

Схема непрямого варианта ИФМ приведена на рисунке 10. В этом случае определяемый антиген на первом этапе обрабатывают обычной (немеченой) диагностической сывороткой. Несвязавшиеся компоненты реакции удаляют путем промывания, затем на II этапе наносят флюоресцирующую сыворотку против глобулинов немеченой сыворотки, избыток ее также удаляют путем промывания препарата. В результате меченые антитела локализуются только в тех участках, где в I фазе реакции произошло связывание специфических антител и антигена. Непрямые методы более удобны, т. к. позволяют использовать одну и ту же флюоресцирующую сыворотку, на II этапе реакции, а в первом этапе применять обычные наборы диагностических (немеченых) сывороток. Конкретные примеры применения реакции приведены в таблице 9.

Радиоиммунологический метод (РИМ) — количественное исследование взаимодействия антигенов и антител, при котором в один из компонентов реакции вводят радиоактивную метку. РИМ удачно сочетает высокую специфичность иммунологических реакций, обеспечиваемую взаимодействием Ag и At с высокой чувствительностью определения радиоактивности изотопов, входящих в виде метки в один из компонентов реакции.

Метод впервые предложен в 1960 году для определения инсулина в плазме крови человека. В настоящее время широко применяется в медицине не только в эндокринологии, но и в фармакологии, в онкологии, в вирусологии, клинической иммунологии. Это количественная реакция, ее общая характеристика и конкретные примеры использования приведены в таблице 10.

Исторически первой формой постановки реакции является РИМ в жидкой фазе (конкурентный метод). Принцип реакции основан на способности искомого (немеченого) Ag конкурировать со своим меченым аналогом (стандартным Ag^x) за связь с определенным количеством соответствующих стандартных антител. В упрощенном виде это взаимодействие искомого Ag , меченого стандартного Ag^x с определенным количеством гомологичных антител можно описать следующей формулой: $(Ag^x + Ag) + at = Ag^x At + AgAt + \text{свободный } Ag^x$, из которой следует, что чем больше искомого Ag в реакционной смеси, тем меньше меченого Ag^x находится в связи с At , тем больше остается свободного меченого Ag^x .

Если отделить комплексы $Ag^x At$ и $AgAt$ от свободного Ag^x , что можно достигнуть разными способами, а затем измерить уровень радиоактивности каждой из фаз, то соотношение свободного и связанного Ag^x позволит определить содержание искомого Ag по стандартному графику, отражающему зависимость отношения связанного Ag^x и свободного Ag^x от концентрации стандартного Ag . Отделить свободный и связанный меченый Ag^x можно с помощью осаждения этиловым спиртом, сульфатом аммония, с помощью

РАДИОИММУННЫЙ МЕТОД (РИМ)

Антиген	Антигена	Метка	Учет реакции	Технические варианты постановки	Примеры
Вещество, гаптен: (вирусы, гормоны, лекарственные препараты, иммуноглобулины классов А, М, G, Е, опухолевые антигены и др.).	Иммуноглобулины классов А, М, G	Радиоактивный ^{125}I , ^{131}I , ^3H , ^{14}C	Измерение радиоактивности на гамма- или бета-счетчике	<p>1. В жидкой фазе (конкурентный метод). Искомый антиген к его стандартный меченый аналог (антиген) konkurрируют за связь со строго определенным количеством соответствующих (гомологических) стандартных антигел. Подробное описание приведено в тексте</p> <p>2. В твердой фазе (неконкурентные методы)</p> <p>2.1. Прямой метод (обнаружение антигена) срез ткани обрабатывают меченой радиоактивным изотопом диагностической сывороткой</p> <p>2.2. На твердом носителе фиксируют стандартные немеченые антигел до-бавляют исследуемую пробу (антиген). Обрабатывают препарат меченой изотопом диагностической сывороткой против искомого антигена</p> <p>2.3. Непрямой метод (обнаружение антигел)</p> <p>На бумажном диске, др. твердом носителе:</p> <ul style="list-style-type: none"> — фиксируют стандартный антиген, — на него наносят исследуемую пробу предположительно содержащую искомые антигел. Добавляют меченую изотопом антисыворотку против человеческого глобулина — Измеряют радиоактивность образовавшегося комплекса антиген-антитело-антиглобулин, меченный изотопом 	<p>Определение концентрации гормонов: инсулина, АКГГ, СТГ, гормоны щитовидной железы, лекарственных препаратов в биологических средах, антител к ДНК при системной красной волчанке</p> <p>Радиоавтография</p> <p>Обнаружение вирусных, других антигенов</p> <p>Радиоаллергосорбентный тест (РАСТ) для определения иммуноглобулинов класса E</p>

адсорбции свободного Ag^x на активированном угле, с помощью хроматографического или электрофоретического разделения.

Вариант постановки РИМ в твердой фазе является последующим этапом усовершенствования метода, упрощающего разделение свободного и связанного компонентов реакции. Для этого фиксируют антиген или антитело на твердом носителе (шарики полистирола, лунки планшета), но принцип реакции при этом не меняется, РИМ ставится, как видно из таблицы 10, в прямом варианте и непрямом (рисунок 11). Если изобразить при этом вертикальный разрез лунки, то схема расположения компонентов РИМ при прямом и непрямом методах будет выглядеть так, как это показано на рисунке 11.

Иммуоферментный анализ предложен в конце 70-х годов. Принцип реакции основан на том, что при взаимодействии Ag и At , один из которых имеет ферментную метку, ферментативная активность образовавшегося специфического комплекса пропорциональна количеству связанного меченого энзимом компонента (Ag или At), вступившего в иммунную реакцию. Количественную оценку реакции проводят добавлением в испытуемую иммунную систему биохимического субстрата того фермента, который входит в метку, и индикатора, выявляющего ферментативную реакцию. Учет проводят фотометрически, по изменению окраски индикатора. Метод нашел в настоящее время самое широкое применение, особенно в диагностике СПИД. Характеристика реакции представлена в таблице 11. Как видно при сравнении таблиц 10 и 11, принципиально иммуоферментный анализ идентичен РИА. Различают, как и в РИА, конкурентный метод, позволяющий определить количественное содержание антигена в исследуемом биологическом материале на основе предварительного построения калибровочной кривой, отражающей взаимосвязь между количеством связанного (меченого) и немеченого антигена. Метод применяется в тех же случаях, что и РИА: для определения количества гормонов, лекарственных препаратов и т. д.

Неконкурентные методы сегодня применяются гораздо шире. Прямой неконкурентный метод идентичен прямому методу РИА (2.2 в таблице 10). В этом случае (таблица 11) на поверхности твердой фазы (на стенках лунки планшета) фиксируют антитела к искомому антигену (рисунок 11). Затем наносят исследуемый антиген, промывают лунку для удаления избытка ag , добавляют избыток меченых ферментов антител к искомому антигену, удаляют промыванием избыток меченых антител, добавляют энзиматический субстрат и индикатор. Результат реакции учитывают на фотометре с вертикальным лучом. Прибор печатает данные о поглощении света с точностью до третьего знака после запятой. Метод используется для обнаружения антигенов (вирусных, лекарственных, гормональных и т. д.).

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Антиген	Антитела	Метка	Учет реакции	Технические варианты постановки	Примеры
<p>Вещества, гаптены: (вирусы, гормоны, иммуноглобулины, лекарственные вещества).</p>	<p>Иммуноглобулины классов А, М, G</p>	<p>Фермент (пероксидаза, щелочная фосфатаза, лизоцим, Г-6-ФДГ)</p>	<p>После добавления специфического для данного фермента субстрата и индикатора результаты учитывают с помощью фотометра.</p>	<p>1. Конкурентный метод. — Присоединяют к твердому носителю ат — Инкубируют со стандартным антигеном, меченым ферментом в присутствии и в отсутствии исследуемой пробы — Инкубируют с субстрат-индикаторной смесью — Проводят фотометрию результата реакции — По калибровочной кривой (на вертикальной оси — оптическая плотность системы, по горизонтальной — концентрация искомого антигена) определяют количество искомого антигена. 2. Неконкурентные методы 2.1. Прямой метод — Фиксируют на твердой фазе ат — Инкубируют с исследуемым антигеном — Инкубируют с антителами против искомого антигена, мечеными ферментом — Инкубируют с субстрат-индикаторной смесью — Учет фотометрический 2.2. Непрямой метод — Фиксируют на твердой фазе антиген — Инкубируют с пробой, содержащей искомые антитела — Инкубируют с меченой АГС и субстрат-индикаторной смесью — Учет фотометрический.</p>	<p>Определение количества гормонов (инсулина, хорионического гонадотропина и т. д.), лекарственных препаратов (пенициллина, наркотиков и т. д.)</p> <p>Определение вирусных антигенов (вирус гепатита), онкоантигенов (альфафетопротени).</p> <p>Серологическая диагностика СПИД Определение IgE Иммуноблоттинг для диагностики СПИД</p>

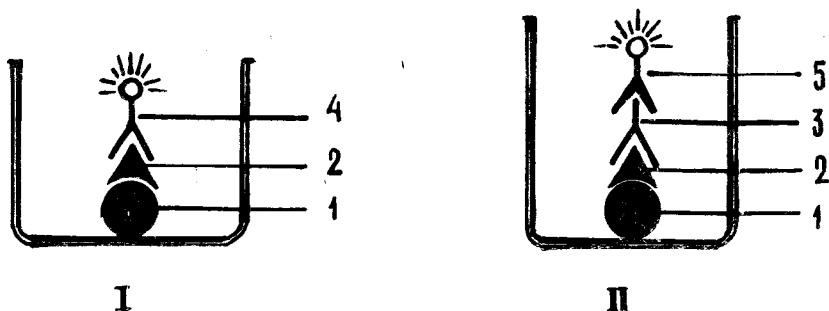


Рис. 11. Схема постановки радиоиммунного метода

I. прямой РИМ

II. непрямого РИМ

1. специфические антитела, фиксированные на пластиковой лунке

2. исследуемый антиген

3. немеченая диагностическая сыворотка

4. диагностическая сыворотка, меченная изотопом

5. антиглобулиновая сыворотка, меченная изотопом

Неконкурентный непрямо́й метод (2—2 в таблице 11) идентичен таковому в РИА (таблица 10, рис. 12). Используется для серодиагностики СПИД.

Выпускают промышленным способом готовые к употреблению панели, на лунках которых осажден вирусный (или иной) антиген. В лунки вносят исследуемую сыворотку. После инкубации и промывания добавляют меченную пероксидазой антиглобулиновую сыворотку, вновь инкубируют и промывают несвязавшуюся меченую сыворотку. Добавляют субстрат и индикатор. Реакция учитывается фотометрически.

Дальнейшее усовершенствование техники иммуноферментного анализа привело к созданию иммуноблотинга, который в настоящее время используется как подтверждающий тест при серодиагностике ВИЧ-инфекции и позволяет исключить ложноположительные результаты, получаемые при постановке обычного варианта ИФА. Метод состоит из трех этапов.

1. Электрофоретическое фракционирование белков ВИЧ в полиакриламидном геле. Смесь белков ВИЧ помещают вместе с маркерным красителем бромфеноловым голубым на поверхность полиакриламидного геля в специальную камеру для вертикального электрофореза. При электрофорезе белки вируса располагаются в геле в соответствии с молекулярной массой; чем меньше масса, тем дальше от катода будет находиться белок, зоны белков окрашиваются маркерным красителем.

2. Электрофоретический перенос вирусных белков с полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ). Окрашенные зоны полиакриламидного геля помещают в буфер, отмывают и

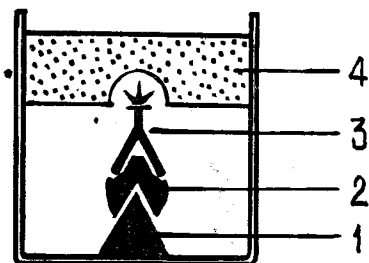


Рис. 12. Схема серодиагностики СПИД непрямым иммуноферментным методом

1. антигены вируса, сорбированные на поверхности пластиковой лунки
2. искомые антитела
3. антиглобулиновая сыворотка, меченная пероксидазой (АГС).
4. хромоген (перекись водорода + индикатор)

в аппарате для горизонтального электрофореза переносят структурные вирусные белки с помощью электрического тока на нитроцеллюлозную мембрану. НЦМ отмывают в буфере, подсушивают, разрезают на узкие полоски-стрипы. Стрип представляет собой полоски НЦМ $0,5 \times 10$ см, на поверхности которой находятся структурные вирусные белки с различной молекулярной массой.

3. Выявление антител к белкам ВИЧ в исследуемой сыворотке с помощью ИФА. Стрип помещают в микропланочку, наносят на него исследуемую сыворотку, инкубируют, а затем добавляют антиглобулиновую сыворотку, меченную ферментом, против глобулинов человека. Для визуализации реакции добавляют хромоген: перекись водорода + бетанитрохлорбензол. Между операциями содержимое микропланочки каждый раз промывают буфером. При наличии в исследуемой сыворотке антител к структурным белкам ВИЧ происходит адсорбция их на соответствующих участках стрипа. Антиглобулиновая сыворотка, меченная пероксидазой, фиксируется на гомологичных антителах, пероксидаза расщепляет перекись водорода, входящую в состав хромогена, в результате чего цвет индикатора изменяется. Наличие голубых полос на стрипе свидетельствует о присутствии антител в сыворотке крови обследуемого к соответствующим белкам ВИЧ. Опытный стрип сравнивают с контрольным, анализируют, к каким структурным белкам ВИЧ имеются антитела в сыворотке пациента, и делают заключение о наличии или отсутствии антител к этому вирусу.

СОДЕРЖАНИЕ ЗАНЯТИЯ

1. Общая характеристика реакций третьего поколения. Принцип прямой и непрямой реакции.
2. Реакция иммунофлюоресценции, характеристика, техника постановки, примеры.
3. Радиоиммунологический анализ, характеристика, техника, примеры.
4. Иммуноферментный метод, характеристика, техника постановки, примеры.

ДЕМОНСТРАЦИЯ

1. Демонстрация иммуноферментного метода для определения антиядерных антител в сыворотке крови больного СКВ.