

ТЕМА 3. РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ ТА АГЛЮТИНАЦІЇ

Реакції преципітації й методи, засновані на реакції преципітації

При взаємодії розчинних антигенів з антитілами утворюються високомолекулярні комплекси антиген-антитіло, які випадають у вигляді осаду в розчині, або обумовлюють загальне помутніння середовища, або знаходяться в колоїдному дисперсному стані, або відкладаються у вигляді смуг преципітації в гелі. Використання очищених антигенів дозволяє визначити концентрацію антитіл класів IgM і IgG в досліджуваній пробі. Реакції преципітації ставлять у спеціальних вузьких пробірках. В якості реагентів використовують гіперімунні сироватки, що преципітують, з високими титрами антитіл до гомологічних антигенів. Реакції преципітації дозволяють швидко (протягом кількох секунд) виявляти незначні кількості антигенів (можна виявити антиген у таких малих кількостях, які не виявляються хімічним шляхом). Чутливість реакцій преципітації дорівнює 0,5 – 1 мкг/мл.

Реакції преципітації в розчині

При додаванні антигену, концентрація якого збільшується, до одній і тій же кількості антитіл, утворюється різна кількість преципітату. Можна побудувати графік, криву преципітації, яка відображає залежність між концентрацією антигену і кількістю преципітату: кількість преципітату зростає із збільшенням концентрації антигену, у зоні еквівалентності (кількість антигену приблизно дорівнює кількості місць зв'язування на антитілах) утворюється максимальна кількість преципітату, при надлишку антигену кількість преципітату зменшується.

Класична реакція преципітації відображена на рис. 6.

У ряді преципітаційних пробірок готують дворазове розведення антитіл, у кожен пробірку додають одну й ту ж кількість антигену. Інкують 3 години. Після інкубації осад у пробірках відділяють центрифугуванням і зважують; у надосадовій рідині визначають зміст антитіл і антигену; їхня наявність або відсутність відзначають відповідно знаком "+" або "-".



Рис. 6. – Крива преципітації реакції антиген-антитіло.

Згідно рис.6 преципітат утворився той пробірці, у якій не виявляється присутність ні антитіл, ні антигену.

Принципово важливо, що преципітат не утвориться ні в умовах надлишку антитіл, ні надлишку антигену, тобто як надлишок антитіл, так і надлишок антигену розчиняють преципітат.

Теорія решітки. Зони утворення решітки

Утворення комплексами антиген-антитіло преципітатів та аглютинатів пов'язано з формуванням ними решітки.

Решітки – агрегати, антиген-антитіло, які утворюються в умовах якщо

-антиген полівалентний (містить мінімум два ідентичних епітопа);

-перехресно реагує зі специфічними антитілами, які містять два й більше антигензв'язуючих сайтів; -молярне відношення епітопів та антигензв'язуючих сайтів оптимальне (зона еквівалентності).

Зони утворення решітки. Пост зона. Значний надлишок антигену обумовлює наявність вільного антигену в супернатанті. При високому вмісті антигену антитіл недостатньо для зв'язування двох сусідніх молекул антигену з утворенням містків. При наявності тільки феномену сенсibiliзації решітки не утворюються.

Надлишок антигену у досліджуваній тест-системі визначає помилково негативну реакцію преципітації. При розведенні антигену реакція стає позитивною.

Незначний надлишок антигену, наявність вільного антигену у супернатанті, визначає можливість утворення субоптимального утворення преципітату.

Зона еквівалентності. Максимальне утворення преципітату здійснюється при еквівалентному співвідношенні специфічних антитіл та антигенів. У супернатанті відсутні антитіла й антиген.

Незначний надлишок антитіл у супернатанті визначає можливість утворення субоптимального преципітату. Прозона. Значний надлишок антитіл при низькій концентрації антигену виключає можливість утворення містків полівалентними антитілами між сусідніми полівалентними антигенами, тобто утворення решіток та випадання комплексу антиген-антитіло у вигляді преципітату. У супернатанті високий вміст антитіл, антиген відсутній. У практиці визначення антигенів або антитіл цей феномен визначає помилково негативну реакцію преципітації. При розведенні антитіл реакція стає позитивною.

Схема умов формування решітки відображена на рис.7.

3.1.2 Основні фактори, що впливають на утворення імуопреципітата

Утворення специфічного преципітату залежить від абсолютного вмісту антигену й антитіл; концентрації антигену й антитіл (об'єм реакційної суміші: чим нижче концентрація, тим менше преципітату); при низькій концентрації комплекси антиген-антитіло утворюються, але не преципітують.

Комплекси що
преципітували
 $Ab/Ag = 2$

Розчинні комплекси
Надлишок антигену

Розчинні комплекси
Надлишок антитіл

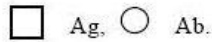
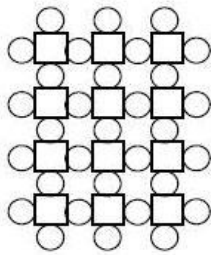


Рис.7. - Схема утворення решіток полівалентним антигеном і двохвалентними антитілами

Для кожної конкретної системи антиген-антитіла експериментальним шляхом визначають зону еквівалентності, у межах якої практично весь антиген зв'язаний антитілом; щоб зв'язати весь антиген концентрація антитіла повинна бути більше, ніж у зоні еквівалентності.

Кількість преципітату залежить від тривалості реакції й температури. При 37°C 90 – 95 % преципітація досягається за 1,5 – 3,0 години. Повна преципітація досягається при додатковій інкубації реагентів при 4°C протягом 10 – 20 годин.

Висока концентрація NaCl і інших солей перешкоджає преципітації, а 10% NaCl сприяє розчиненню преципітатів.

Іонний детергент натрію додецил сульфат (ДДС) в концентрації 0,2% гальмує імунопреципітацію на 90%, а у концентрації 0,05% – зменшує копреципітацію.

Неіонні детергенти – тритон x100, твін-20 у концентраціях 0,1 – 1% не впливають на реакції антиген-антитіло, але застосування тритона x100 зменшує ефект ДДС.

Поліетіленгліколь (ПЕГ, м.м.6000) у концентрації 3-4% сприяє преципітації.

Зона рН, оптимальна для утворення імунопреципітата – 6,5 – 8,6, переважніше слабо лужне середовище. Зниження рН за межі 5 приводить до поступового розчинення імунопреципітатів, що раніше утворилися, а підвищення за межі 8,6 – підсилює неспецифічну копреципітацію.

Не специфічні фактори антисироваток і антигенних розчинів впливають на утворення імунопреципітата. Тому варто використати не антисироватки, а виділену з них гама фракцію, а ще краще афінно очищені моноспецифічні сироватки, а антиген необхідно піддати найпростішому очищенню: посвітління, фракціонування.

Копреципітація

Копреципітація – явище залучення в преципітат розчинних антигенів, вихідна концентрація яких є недостатньою для утворення преципітату, при додаванні в середовище антигену у високій концентрації. Наприклад, у середовищі є мічений антиген в низькій концентрації й преципітат не утворить, додають немічений, холодний носій, у концентрації

достатньої для утворення імунопреципітату. Мічений антигену утягується в преципітат, копреципітує.

Методи преципітації у розчинах

Кільцепреципітація. Швидкий метод оцінки ефективності імунізації тварин (1902 рік, Ascoli).

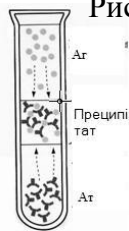


Рис. 8. – Кільцепреципітація

У вузьку пробірку діаметром 0,5 см з нерозведеною сироваткою, що преципітує, в кількості 0,3 - 0,5 мл, тримаючи пробірку в нахиленому положенні, пастерівської піпеткою повільно по стінці нашаровується такий же обсяг антигену. Пробірку обережно, щоб не змішати рідини, ставлять вертикально. При позитивній реакції через декілька хвилин на межі дотику двох рідин з'явиться кільце преципітації. При малих кількостях реагентів реакцію можна проводити в капілярах (мікропреципітація). Постановка реакції обов'язково супроводжується контролюми сироватки та антигену.

Облік. Результати реакції враховують у залежності від виду антигену і антитіл через 5 - 10 хв, через 1 - 2 або 20 - 24 години.

Метод преципітації в розчинах широко використовують для визначення концентрації антитіл основних класів.

Вимірювання преципітації за розсіюванням світла. Нефелометрія та турбодиметрія

Оцінку реакції преципітації у розчинах здійснюють:

- 1) візуально або за допомогою лупи, ступінь мутності відзначають кількістю знаків "+";
- 2) за допомогою оптичних методів – нефелометрії або турбодиметрії.

Нефелометрія – вимір інтенсивності світла, розсіяного зваженими частками мутного середовища. Спостереження ведуть збоку, перпендикулярно напрямку основного світлового потоку. Інтенсивність світлорозсіювання визначають за допомогою фотоелемента. Кількість розсіяного світла залежить від кількості та розміру частинок в пучку світла. Вимірюють світло, розсіяне під кутом 90°; лазерні промені є найбільш точними, оскільки вони дозволяють виявити відхилення світла на кілька градусів від початкового шляху. У кінцевій точці нефелометрії реакція завершується, але частки, як правило, випадають з розчину і зменшують розсіювання світла. Кінетична нефелометрія – вимірювання темпу зростання розсіювання відразу після змішування реагентів, цей показник зміни прямо пропорційний концентрації антигену або антитіл.

Нефелометрія дозволяє з високою точністю визначити концентрацію IgG, IgA, IgM, підкласів IgG, С3, С4, фактору В, С-реактивного білка і деяких інших сироваткових білків. Цей метод підходить для визначення білків у низькій концентрації, наприклад IgE, рівень якого в сироватці не перевищує 1 мкг / мл.

В даний час багато лабораторій використовують нефелометрію як стандартний метод кількісного визначення імуноглобулінів.

Турбодиметрія – визначення каламутності або непрозорості розчину. При турбодиметрії здійснюють вимір ослаблення інтенсивності світлового потоку при його проходженні через середовище, що розсіює. Спостереження ведуть по ходу основного потоку світла. Інтенсивність світлового потоку визначають за допомогою фотоелемента. Вимірюють або інтенсивність світлорозсіювання, або ослаблення інтенсивності основного світлового потоку. Мутність водного розчину викликана утворенням комплексів антиген-антитіло, призводять до утворення осаду, чим більше антигену або антитіл в системі, тим вище каламутність. Кількість антигену або антитіл розраховують на основі результатів, отриманих відносно стандартів і контролю.

Принцип постановки тестів. У пробірках, у яких будуть ураховувати результати, готують розведення антигену. Додають гомологічну антисироватку, перемішують, інкубують 30 – 40 хв. Вимірюють каламутність. Використається для визначення концентрації імуноглобулінів (IgM, IgG, IgA), С3, ЦРБ і ін.

Достоїнства методів преципітації в розчинах. Простота, недороге встаткування, експресність аналізу.

Недоліки методів прямої преципітації в розчинах. Висока ймовірність неспецифічного включення в преципітат чужорідних компонентів, особливо при низькій концентрації антигену й антитіла, тобто можливість неспецифічної копреципітації.

Метод непридатний для визначення антитіл, що не преципітують: IgA, IgE. Метод не придатний для дослідження гаптенів – вони не утворюють преципітат.

Ці недоліки значною мірою вдається компенсувати, якщо розчинні комплекси антиген-антитіла преципітувати за допомогою так званих вторинних реагентів. Вторинні реагенти, як правило, це сироватки проти гама-глобулінової фракції (вторинні антитіла) або протеїн А – білок клітинної стінки *St. aureus*. Цей білок зв'язується із глікопротеїдами, у тому числі й з імуноглобулінами декількох видів тварин; 1 молекула білка А зв'язує дві молекули імуноглобулінів. У зв'язуванні з білком А беруть участь Fc-фрагменти імуноглобулінів; антиген зв'язуючи області антитіл у процес зв'язування не утягуються.

Чутливість: 0,5 – 1 мкг/мл.

Імунопреципітація в гелі

Імунопреципітація в гелі – варіант імунопреципітації в розчинах, у яких гель виконує функцію підтримуючого середовища.

Імунопреципітація в гелі заснована на дуже простому принципі. У товщі гелю існує водна фаза, через яку легко дифундує більшість макромолекул (м.м. може перевищувати 10⁶). Коли полідетермінантний складний антиген переміщується в зону, яка містить антитіла, то при

оптимальному співвідношенні концентрацій антигену і антитіл утворюються видимі лінії преципітації. Реакцію зазвичай проводять на розташованих горизонтально тонких пластинах агарового гелю на скляних підложках. Для реакцій простий і подвійний дифузії антигени і антитіла вносять у лунки, вирізані в гелі навпроти один одного.

Головне достоїнство методів імунопреципітації в гелях – висока розв'язувальна здатність виявлення комплексів антиген – антитіла, дуже просте устаткування, тобто доступність.

Основний принцип імунопреципітації у гелі

У товщі гелю, через його осередки у водній фазі легко дифундують молекули антигенів й антитіл з м.м. до 10^6 , зустрічаються один з одним і утворюють імунопреципітат у зоні еквівалентності. Імунопреципітати проявляються як видимі оком білі смуги. Швидкість дифузії залежить від:

-розміру часток; -температури; -концентрації гелю; -гідратації гелю; -взаємодії реагентів з гелем.

Кожна індивідуальна система антиген-антитіло утворить свою смугу преципітації. Реакцію проводять у горизонтально розташованих 1,5 мм пластинках 1 % розчину агарового гелю на скляних підложках. Залежно від принципів створення градієнтів концентрації антигену й антитіл у гелі розрізняють два основних варіанти імунодифузії:

-проста дифузія – коли концентраційний градієнт створюється тільки для одного з реагентів, а зміст іншого постійний, він вноситься в гель при його готуванні;

-подвійна дифузія – коли обидва реагенти дифундують у чистий гель.

Залежно від можливих напрямків дифузії реагентів обидва варіанти підрозділяються на одновимірні, двовимірні, комбіновані.

Феномен, який полягає в тому, що при одночасній дифузії в гелі розчинних антигенів і антитіл утворюються смуги преципітації в зоні їх оптимального співвідношення *звуть імунодифузія.*

Фактори, що впливають на утворення імунопреципітатів у гелі

Фактори, що впливають на утворення імунопреципітата в гелі ті ж, що й у водно-сольових розчинах, але ця реакція має ряд специфічних особливостей. Перш за все, немає необхідності емпірично визначати зону еквівалентності послідовно змішуючи різні розведення антигену й антитіл, тому що в гелі титрування здійснюється мимовільно за рахунок дифузії реагуючих речовин назустріч один з одним у підтримуючому середовищі. У гелі формуються градієнти концентрації антигенів і антитіл, з'являється можливість перехреста градієнтів і формування смуги преципітації там, де концентрації пари антиген-антитіла еквівалентні.

= суміші антигенів і антитіл смуги преципітації утворюються кожною парою. Якщо в системі концентрація антигену = концентрації антитіл, то при інкубації лінія преципітації не міняє положення й згодом її інтенсивність наростає. Якщо концентрація антигену \gg концентрації антитіл або навпаки, то первинна смуга преципітації, утворена в зоні перехреста градієнтів концентрацій, буде зміщатися в напрямку дифузії реагенту, концентрація якого

більше. Якщо імунопреципітат розчинний у надлишку реагенту, то первинний преципітат буде повністю розчинятися: формується мігруюча смуга преципітації із щільним фронтом і пухким хвостом.

На формування смуги преципітації в гелі впливають:

- локальна концентрація, концентрація у місці нанесення антигену й антитіл; - напрямок та швидкість дифузії антигену та антитіл; - відстань між точками нанесення реагентів;
- форма й площа стартових лунок визначають як вихідну конфігурацію фронту дифузії, так характер формування концентраційних градієнтів у гелі.

Підтримуюче середовище повинне відповідати наступним вимогам. Гель повинен бути прозорим і однорідним.

Структура гелю не повинна перешкоджати дифузії молекул антигену й антитіл.

Гель повинен бути імунохімічно інертним і не містити домішок, що зв'язують антиген або антитіла. Гель повинен бути стабільним протягом тривалого часу в широкому діапазоні рН і температур.

Всім цим вимогам відповідає 1% гель агарози, що до всього характеризують легкість і швидкість готування гелів будь – якої товщини й розміру осередків. Через осередки такого гелю можуть проходити молекули з м. м. 200 кДа.

Агароза – препарат агару, очищений від мукополісахаридів (агаропектини), які екранують антигенні детермінанти й послабляють взаємодію антиген-антитіла. У порівнянні з агаром, гель агарози більше прозорий, але й більше тендітний.

Оптимальна температура стабільності гелю – кімнатна, припустимий діапазон рН 7,0 – 9,0; нижче 6,5 преципітати розчиняються, а вище 8,6 спостерігається неспецифічна копреципітація.

Кількість смуг преципітації відображує мінімальне число різних систем антиген-антитіла.

Подвоєння смуг, розщеплення смуг може бути пов'язане з:

- надлишком антигену, що переміщається за лінію преципітації;
- низькими концентраціями антигену;
- гетерогенністю молекулярних форм антигену;
- різкими коливаннями температур;
- невідповідністю за сольовим складом, іонній силі й рН між гелем, розчинами антигену або антитіл; повторне внесення у лунки гелю розчинів антигену або антитіл.

Методи імунодифузії в гелі

Одновимірна дифузія за Уоденом

Антитіла додаються в гель агарози, що поміщений в пробірку, розчин антигену нашаровується поверх шару гелю, антиген дифундує вниз в гель. Якщо антитіла в гелі вступають в реакцію з антигеном, що додається, в гелі утворюється преципітат. Реакція якісна, дозволяє виявити наявність антитіл, як що антиген відомий, або антигену, як що відома специфічність антитіл.

Метод радіальної імунодифузії за Манчінні

Агар містить моноспецифічні антитіла, а радіально в гель дифундує антиген, зустрічаючись із антитілами формує імунний комплекс; комплекси антиген-антитіла утворюють преципітат. У міру віддалення від лунки концентрація антигену поступово падає, поки не стає еквівалентної концентрації антитіл у агарі. При цьому утворюється добре помітне кільце преципітації. Чим вище концентрація внесеного антигену, тим більше діаметр кільця. Якщо у реакції використовується декілька стандартів з відомою концентрацією антигену, то шляхом порівняння або споруди калібрувальної кривої можна проводити кількісне визначення антигену в зразках. Реакція може перебігати протягом декількох днів. Кількісна оцінка: розмір кільця пропорційний кількості антигену при рівних обсягах препаратів у лунці.

Для побудови каліброваної кривої використовують стандартні розчини розведення антигену, концентрація розведень може відрізнятись в 10 - 20 разів і досягати 5 мкг/мл. Облік ведуть у вологих гелях. Схема постановки РІД відрізняється на рис.9.

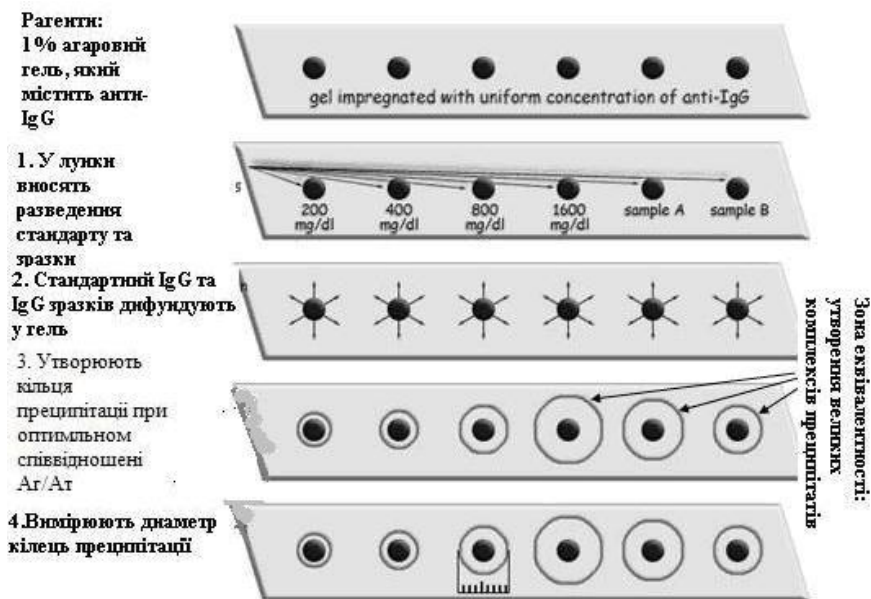


Рис. 9 Схема визначення вмісту IgG за Манчінні

При постановці РІД необхідно досягти стаціонарності преципітату, тобто стану, коли при подальшій експозиції розмір кільця не змінюється. Саме на цій стадії має місце лінійна залежність між концентрацією антигену й діаметром кільця (квадратом діаметра) преципітату. Стаціонарність преципітату може сформуватися за 1 – 10 діб (білкові антигени). Час досягнення стаціонарності преципітату залежить від м.м. антигену, розміру лунки, концентрації антигену, концентрації антитіл у гелі, афінності антигену й антитіл, температури. При 37°C стаціонарність преципітату досягається швидше, але границя преципітату менш чітка, розпливчата, підсилюється неспецифічна "помилкова" преципітація.

Калібрований графік для кожного імуноглобуліну, що визначається, будується щораз при постановці реакції. Його можна будувати у двох варіантах: на ординаті – концентрація антигену, що визначається, у мкг/мл, на абсцисі – квадрат діаметра кільця в мм; або на

ординаті квадрат діаметру кільця в мм, на абсцисі – концентрація стандартного імуноглобуліну в мг/мл (рис.10).

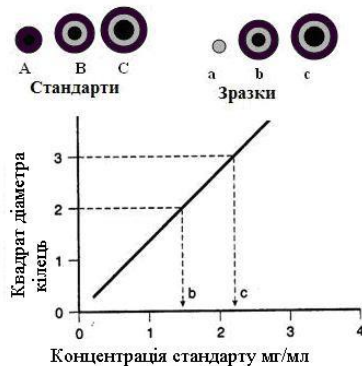


Рис. 10. – Принцип побудови каліброваного графіка в РІД при визначення концентрації антигену

Як що в гель вносять антиген, то говорять про зворотну РІД – ЗРІД. Застосування РІД. Визначення концентрації індивідуальних антигенів у розчині – будь яких антигенів при наявності специфічних антитіл.

Це простий і надійний метод кількісної оцінки імуноглобулінів (включаючи підкласів IgG), компонентів комплементу (наприклад, С3, С4, фактора В) та інших білків сироватки. Існують готові набори, що дозволяють визначити антиген в низькій концентрації - не більше 3 мкг / мл. Визначаючи зміст імуноглобулінів, необхідно враховувати, що зміна їх властивостей може спотворювати результати дослідження.

Так, якщо в сироватці містяться мономірні IgM (наприклад, при макро-глобулінемії Вальденстрема, атаксії-телеангіектазії), рівень буде штучно завищений, оскільки мономірний IgM дифундує швидше, ніж пентамірний. Присутність ревматоїдного фактора в досліджуваній пробі, навпаки, штучно знижує рівень IgG оскільки імунні комплекси, що складаються з IgG і ревматоїдного фактора, дифундують повільніше, ніж незв'язаний IgG. Сироватка багатьох хворих з дефіцитом IgA містить антитіла до білків тваринного походження, наприклад, до козячих імуноглобулінів, тому при використуванні козячих антитіл для визначення рівня IgA в цьому випадку виходять завищені результати.

Метод подвійній імунодифузії за Оухтерлоні

Принцип: у лунки, вирізані у чистому 1% агаровому або агарозному гелі, поміщають антиген і антисироватки, які дифундують назустріч один одному. У тій ділянці гелю, де їх співвідношення еквівалентні, утворюється видимий преципітат. Якщо аналізу піддається суміш антигенів, то утворюється кілька ліній преципітації. Якщо сусідні лунки містять один і той же антиген, то лінії преципітації зливаються. Якщо антигени різні, то утвориться або так звана шпора, що свідчить про часткове спорідненість антигенів, або, у разі неспоріднених

антигенів, лінії преципітації будуть перетинатися.. Варіанти смуг преципітації у гелі за методом подвійної імунодифузії відображені на рис. 11 – 13.

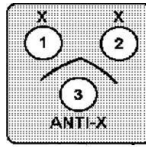


Рис. 11. – Схема смуг преципітації при ідентичності антигенів у 1 та 2 лунках.

Преципітація має вигляд безперервної лінії у куті між двома лунками. Відсутня шпора, цей тип реакції називають смуга ідентичності.

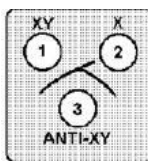


Рис. 12. – Схема смуг преципітації при частковій ідентичності антигенів у 1 та 2 лунках.

Якщо розчин з антигенами X і Y поміщений у лунку 1, розчин тільки з антигеном X поміщений в лунку 2, антисироватка, що містить антитіла, специфічні як до X, так і до Y, поміщена в лунку 3, формується реакція шпори. Це вказує, що два антигени в лунках 1 і 2 однакові, але вміст лунки 1 має антигенну специфічність, що відсутній у лунці

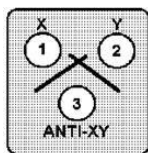


Рис. 13. – Схема смуг преципітації при не ідентичності антигенів у 1 та 2 лунках

Якщо антигени в лунках 1 і 2 різні, а антисироватка в лунці 3 специфічна для кожного з них, то формуються перехресні лінії преципітації, як відображення не ідентичності досліджуваних антигенів.

Застосування методу подвійної радіальної імунодифузії.

Метод подвійної імунодифузії – важливий тест для визначення преципітуючих властивостей,

приблизного титру й специфічності антисироваток до розчинних антигенів.

1.Стандартний спосіб визначення специфічності антисироваток.

2.Тест на ідентичність антигенів, визначення чистоти антигену й антигенних взаємозалежностей між молекулами.

3.Для приблизного визначення концентрації антигену.

4. Для якісного аналізу спектра антигенів у біологічних об'єктах.
5. Для контролю ефективності імунізації тварин.
6. Для орієнтовного визначення титру моносцифічних сироваток.

Якщо використовуються антисироватки з гарними преципітуючими властивостями, то можна визначити антиген у концентрації 5 мкг/мл.

Переваги методу. Це єдиний унікальний простий метод вивчення взаємодії антигену зі специфічними антитілами. Недоліки методу подвійної імунодифузії у гелі. Відносно низька чутливість у порівнянні з методом аглютинації та ІФА, значна тривалість.

При дослідженні сумішей антигенів утворюються лінії преципітації які перекриваються й накладаються один на одного, що утрудняє аналіз.

В клініці метод застосовується в діагностиці автоімунних захворювань для виявлення автоантитіл до ядерних антигенів, що екстрагуються. Хоча по чутливості метод подвійної радіальної імунодифузії поступається багатьом кількісним методам, технічно він простий, не вимагає високо очищених антитіл, специфічний і може використовуватися при проведенні масових досліджень.

Методи аглютинації. Активна та пасивна аглютинація

Реакції аглютинації, як й реакції преципітації, підпорядковуються положенням теорії решіток.

Фактори, що впливають на прояви аглютинації:

співвідношення антиген/антитіла;

температура;

pH;

час інкубації;

концентрація іонів.

Розрізняють активну й пасивну аглютинацію.

Активна (пряма): у реакції бере участь частка з власними епітопами поверхневого антигену. Наприклад, еритроцити – антигенні детермінанти антигенів системи АВ0, бактерії – антигенні детермінанти їхніх поверхневих антигенів. Реакції прямої аглютинації використовують для ідентифікації збудника. У суспензію культури невідомого збудника вносять сироватку, що містить антитіла до відомого збудника. Специфічні до збудника антитіла аглютинують бактерії. Реакцію аглютинації проводять або на предметному склі або в пробірці

Пасивна аглютинація: молекула антигену «пришивається» до поверхні частки – латексу, еритроцитів. Реакції пасивної аглютинації – аглютинують частки, клітини, з поверхнею яких зв'язаний антиген або антитіло. Ці частки називають діагностиком. При використанні в якості діагностикума еритроцитів кажуть про реакції гемаглютинації, розрізняють реакції пасивної гемаглютинації (РПГА), непрямой гемаглютинації (РНГА), гальмування гемаглютинації (РГГА), коаглютинації (до еритроцитів пришивають білок А золотавого стафілокока, що здатний зв'язуватися з Fc-фрагментами IgG).

Окремі фірми готують діагностикуми з використанням часток бентоніту, желатинових капсул, часток сефарози. *Клінічні застосування реакції аглютинації.* Виявлення автоантитіл (автоімунна гемолітична анемія, ревматоїдний артрит (РА), системний червоний вовчак (СЧВ); С – реактивний білок (ЦРБ); людський хоріонічний гонадотропін (ЛХГ) – тест на наявність вагітності; у серології: визначення груп крові, виявлення бактеріального антигену (коклюш, лептоспіра, бліда трепонема).

Якісні тести. Пряма аглютинація

Використаються для виявлення наявності антигену або антитіла – при змішуванні корпускулярного антигену (бактерії) й антитіл виявляється аглютинація. Як що антигени еритроцити – кажуть про пряму реакцію гемаглютинації – РПГА (рис.18). Приклад: визначення груп крові. Якщо у сироватці містяться

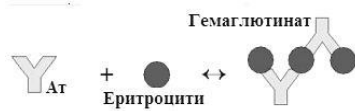


Рис. 18 – Схема прямої реакції гемаглютинації (РПГА)

Діагностика збудника інфекційного захворювання: при змішуванні сироватки хворого, що містить антигенспецифічні антитіла з відомим антигеном – збудником; спостерігається аглютинація відповідних бактерій. Захворювання може бути діагностовано при підвищенні титру антитіл (парні проби) або при сероконверсії – появі антитіл при їхньої відсутності при попередньому визначенні.

Реакція аглютинації бактерій з використанням відповідної антибактеріальної сироватки відноситься до найбільш простих серологічних реакцій (рис.19).

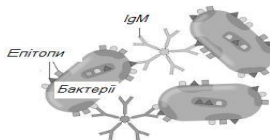


Рис.19. – Схема прямої аглютинації бактерій IgM.

Завись бактерій додають до різних розведень випробуваної сироватки крові і через певний час контакту при 37° С реєструють, при якому найвищому розведенні сироватки крові відбувається аглютинація. Це розведення сироватки крові звать титр антигенспецифічних антитіл. Реакцію аглютинації бактерій використовують для діагностики багатьох інфекційних хвороб: бруцельозу, туляремії, черевного тифу та паратифів, бацилярної дизентерії, висипного тифу.

Кількісні аглютинаційні тести. Пасивна гемаглютинація

Принцип:

- 1) в лунках планшетів для мікротитрування готують розведення сироватки (антитіл);
- 2) додають стандартну кількість еритроцитів, бактерій або іншого корпускулярного антигену й визначають найбільше розведення, що дає видиму аглютинацію. Це розведення називають аглютинаційний титр антитіл.

Показником реакції аглютинації є утворення на дні *плоскодонної лунки* фігури, що зображує перевернену парасольку, відсутність аглютинації – гудзик.

При поставці реакції аглютинації варто мати на увазі можливість прояву ефекту прозони: при надлишку антитіл аглютинація відсутня, а при розведенні сироватки – з'являється; надлишок антитіл виключає утворення аглютинатів (рис.20, ряд 6, розведення $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$).

Пацієнт	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	K+	K-	Титр
1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	64
2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	8
3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	512
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	<2
5	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	32
6	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	128
7	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	32
8	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	4

Рис. 20 – Схема кількісного тесту гемаглютинації

Застосування методу прямої аглютинації. Визначення груп крові або антитіл до груп крові; діагностика бактеріальних інфекцій. Підвищення титру антитіл у парних пробах: чотириразове підвищення титру розцінюють як значне підвищення.

Парні проби. На початку захворювання у пацієнта відбирають кров (перша проба), одержують сироватку й заморожують. Через 12 днів знову відбирають кров (друга проба), одержують сироватку й ставлять реакцію аглютинації.

Зауваження: хоча тест легкий у виконанні, він є напівкількісним.

Антиглобуліновий тест Кумбса (прямий)

Антитіла, що зв'язалися з еритроцитами, не завжди приводять до аглютинації. Це може бути пов'язане з відношенням антиген/антитіла, надлишком або антитіл, або антигену, електричного заряду на еритроцитах, що запобігає ефективної аглютинації клітин.

Раніше антитіла, які зв'язуються з клітинами, але не викликають їхню аглютинацію, називали неповними. Думали, що вони відмінні за структурою, але це не так. Скоріше це тільки функціональне визначення. Щоб виявляти наявність неаглютинуючих антитіл на еритроцитах додають вторинні антитіла, спрямовані проти Fc-фрагментів IgG, які сенсibilізували еритроцити. Вторинні антитіла приводять до аглютинації. Здатність анти – IgG антисироваток аглютинувати еритроцити хворого називають прямий тест Кумбса.

Для одержання антитіл до людських імуноглобулінів (антиглобулінової сироватки) або С3 – компоненту комплементу (антикомплементарної сироватки) тварину імунізують сироваткою, імуноглобулінами або комплементом людини. Отриману імунну сироватку очищають від антитіл до інших білків.

Еритроцити хворого відмивають фізіологічним розчином для повного видалення сироватки, що нейтралізує антитіла до імуноглобулінів і комплементу й може стати причиною хибно негативного результату.

Якщо на поверхні еритроцитів фіксовані антитіла або компоненти комплементу, додавання антиглобулінової або антикомплементарної сироватки викликає аглютинацію еритроцитів.



Рис.21. – Схема постановки прямого тесту Кумбса

Прямий тест Кумбса застосовують у наступних випадках. При наявності автоімунного гемолізу, гемолітичної хвороби немовлят, лікарської автоімунної гемолітичної анемії, гемолітичних трансфузійних реакціях.

Непрямий тест Кумбса

Якщо необхідно знати чи є в сироватці специфічні антитіла проти еритроцитів і визначити титр цих антитіл, то виконується непрямий тест Кумбса.

Тест виконується в такий спосіб. На першому етапі сенсibiliзують еритроцити групи 0 сироваткою хворого: добре відмиті еритроцити донора групи 0 преінкубують з розведеннями сироватки пацієнта, відмивають від антитіл, що не зв'язалися. На другому етапі до сенсibiliзованих еритроцитів додають реактив Кумбса, спостерігають аглютинацію й визначають титр (рис.22).



Рис. 22. – Схема постановки непрямого тесту Кумбса

Виявлення антирезусних антитіл (анти – Rh). Антирезусні антитіла не аглютинують еритроцити. Еритроцити Rh⁺ дітей від Rh⁻ матерів, які мають антирезусні антитіла, можуть бути пов'язані з антитілами матері. Антитіла матері – IgG, проходять через плаценту к плоду (друга вагітність), зв'язуються з еритроцитами плода, активують систему комплементу, що супроводжується гемолізом еритроцитів дитини. Щоб це перевірити виконують прямий тест Кумбса.

Щоб перевірити чи має мати в сироватці анти-резус антитіла ставлять непрямий тест Кумбса.

Гемаглютинація застосовується для виявлення антитіл до тиреоглобуліну і мікросомальних антигенів тиреоцитів, латекс-аглютинація – для виявлення ревматоїдного фактора і деяких інших автоантитіл.

Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА)

Заснована на феномені запобігання (гальмуванні) імунною сироваткою гемаглютинації еритроцитів вірусами. Використовується для виявлення та титрування противірусних антитіл. Вона служить основним методом серодіагностики грипу, кору, краснухи, епідемічного паротиту, кліщового енцефаліту та інших вірусних інфекцій, збудники яких мають гемаглютинуючі властивості. Наприклад, для серодіагностики кліщового енцефаліту в лунки панелі розливають дворазові розведення сироватки хворого на лужному боратному буферному розчині. Потім додають певну кількість, звичайно 8 АО (аглютинуючих одиниць) антигену кліщового енцефаліту і після 18 год. експозиції при температурі 4° С вносять суспензію гусячих еритроцитів, приготовлену на кислому фосфатно-буферному розчині. Якщо в сироватці крові хворого є антитіла до вірусу кліщового енцефаліту, то антиген вірусу нейтралізується і аглютинація еритроцитів не відбувається. Антигени вірусів здатні аглютинувати еритроцити птахів.

Реакції пасивної, або непрямой, аглютинації

В цих реакціях використовують еритроцити або нейтральні синтетичні матеріали (наприклад, частинки латексу), на поверхні яких сорбований антигени (бактеріальні, вірусні, тканинні) або антитіла. Їх аглютинація відбувається при додаванні відповідних сироваток або антигенів.

Реакція пасивної, або непрямой, гемаглютинації

Еритроцити, сенсibilізовані антигенами, називають антигенні еритроцитарні діагностикуми та використовують для виявлення та титрування антитіл. Еритроцити, сенсibilізовані антитілами, називають імуноглобуліновими еритроцитарними діагностикумами і застосовують для виявлення антигенів. Реакцію пасивної гемаглютинації використовують для діагностики захворювань, викликаних бактеріями (черевний тиф і паратиф, дизентерія, бруцельоз, чума, холера та ін.), найпростішими (малярія) і вірусами (грип, аденовірусні інфекції, вірусний гепатит В, кір, кліщовий енцефаліт, кримська геморагічна

лихоманка та ін.), а також для визначення деяких гормонів, виявлення підвищеної чутливості хворого до лікарських препаратів і гормонів, наприклад пеніциліну та інсуліну.