

ТЕМА 5. РАДІОІМУННИЙ ТА ІМУНОХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ

Методи з використанням мічених антитіл або антигенів (кон'югатів)

Перший феномен взаємодії антитіл зі специфічним антигеном – сенсибілізація має місце у всіх випадках реакції антиген-антіло не залежно від класу антитіл, їхньої концентрації, концентрації антигену. *Виявлення імунних комплексів, що утворюються на стадії сенсибілізації, можливо тільки з використанням мічених антигенів або антитіл.*

Принципи та класифікацію сучасних методів з використанням мітки ми розглянули у вступі. Тут ми розглянемо лише ті з них, що використовуються в клініко-діагностичних лабораторіях.

Радіоімунний аналіз (RIA), принцип. Варіанти RIA Радіоімунний аналіз – вид імуноаналізу, у якому утворення комплексу антиген-антитіло визначають за активністю мітки-радіоізоотопу.

Цей метод дуже широко використовується в лабораторній діагностиці. За допомогою RIA в біологічних рідинах визначають концентрації гормонів, факторів росту, ферментів, автоантитіл, маркерів злоякісних новоутворень та інших речовин (наприклад, лікарських засобів та наркотиків).

Принцип. В основі RIA лежить феномен конкуренції: зв'язування антитіл з антигеном, поміченим радіоактивним ізотопом, пригнічується в присутності неміченого антигену.

Методика RIA

Вона проста і включає наступні основні етапи.

1. До розчину антитіл додають мічений антиген і пробу (містить невідому кількість неміченого антигену). Концентрацію антитіл в реакційній суміші підбирають так, щоб число місць зв'язування було набагато менше загального числа антигенів. Концентрація міченого антигену повинна перевищувати максимальну можливу концентрацію антигену в пробі.

2. Реакційну суміш інкубують при певній температурі. Мічений і немічений антигени конкурентно зв'язуються з антитілами, при цьому утворюються імунні комплекси, що містять або мічений, або немічений антиген. Таким чином, до кінця інкубації в реакційній суміші присутні мічені і немічені імунні комплекси, а також вільні мічені і немічені антигени. Кількість мічених імунних комплексів оборотне пропорційна кількості неміченого антигену в пробі.

3. Щоб оцінити кількість мічених імунних комплексів, їх треба відокремити від вільного міченого антигену. Найбільш поширені два способи поділу.

1). До реакційної суміші додають речовину, що підвищує її щільність, наприклад поліетиленгліколь.

2). До реакційної суміші додають речовину з великою молекулярною масою, яка специфічно зв'язується з антитілами в складі імунних комплексів. Для цього використовують другі антитіла або стафілококовий білок А.

В обох випадках імунні комплекси, що мають більш велику молекулярну масу, ніж вільні антигени, осаджують центрифугуванням і вимірюють радіоактивність осаду.

4. Визначають концентрацію антигену в пробі по калібрувальної кривій. Для її побудови використовують кілька стандартних калібрувальних розчинів з *відомими концентраціями неміченого антигену.*

Варіанти РІА

Розроблено безліч варіантів РІА. Методика, описана вище, називається рідиннофазний РІА (всі реагенти знаходяться в розчиненому стані). Існує і твердофазний РІА, в якому антитіла іммобілізовані на водонеразчинному носії, наприклад, на полістиролі. Особливий різновид методу – *імунорадіометричний аналіз (ІРМА)*, в якому використовуються мічені антитіла, а не мічений антиген.

Принцип РІА поширюється і на інші імунохімічні та неімунохімічні методи аналізу. Наприклад, у ІФА замість радіоактивного ізотопу в якості мітки використовують ферменти, а в імуофлуориметричному аналізі – флуоресціюючі речовини. У неімунохімічних методах роль антитіл виконують реагенти, які специфічно зв'язують речовину, що визначається. Цими реагентами можуть бути рецептори гормонів або білки плазми, які зв'язують. Так, в радіорецепторному аналізі для вимірювання тиреостимулюючих і тиреоблокуючих автоантитіл використовуються очищені рецептори ТТГ, а для вимірювання рівня вільного Т4 іноді застосовується тироксинзв'язуючий глобулін.

Всі ці методи аналізу називають методами конкурентного зв'язування.

Оцінка результатів у РІА

На відміну від біологічних методів аналізу, РІА є кількісним імунохімічним методом і дає можливість точно виміряти вміст речовини (антигену) в пробі. Результат РІА залежить тільки від співвідношення компонентів реакції антиген-антитіло.

Умови надійності результату РІА

1. При розведенні проби виміряна концентрація речовини повинна зменшуватися пропорційно до ступеня розведення.

2. Крива залежності рівня зв'язування антитіл з антигеном поміченим від концентрації антигену в пробі повинна збігатися з калібрувальною кривою.

Якщо ці умови не виконуються, можна припустити, що на імунохімічну реакцію впливають інші неспецифічні фактори.

Треба відзначити, що правильно інтерпретований результат РІА може мати діагностичне значення, навіть якщо він не задовольняє формальним критеріям надійності (наприклад, з-за імунохімічних відмінностей між стандартом і пробєю).

Неспецифічні та специфічні фактори, що впливають на імунохімічну реакцію

рН. Швидкість реакції антиген-антитіло і стабільність імунних комплексів зазвичай не залежать від рН в інтервалі 7,0-8,5. Як правило, в дуже кислому або дуже лужному середовищі імунні комплекси дисоціюють, хоча деякі білки з основними властивостями найкраще взаємодіють з антитілами при рН 4,0-6,0. Тому для кожної системи РІА підбирають оптимальний рН.

Склад реакційної суміші також впливає на реакцію антиген-антитіло. Енергія взаємодії антигену з антитілом зменшується при високій концентрації солей у пробі або в реакційній

суміші. Деякі лікарські засоби (гепарин) і бактерицидні препарати (тіомерсал) пригнічують імунохімічні реакції. Тому для розведення стандартів та проб використовують один і той же буферний розчин і враховують можливі ефекти компонентів реакційної суміші.

Перехресні імунореактивності речовин з подібною будовою включають: гетерогенність молекулярних форм пептидних гормонів, біологічно неактивні фрагменти молекул гормонів, гетерогенність інших з'єднань.

Чутливість і специфічність РІА

Чутливість РІА дуже висока. Деякі методики виявляють дуже низькі концентрації речовин, такі, як 10^{-14} моль / л. Чутливість особливо важлива при вимірі базальних концентрацій пептидних гормонів (ці концентрації звичайно знаходяться в межах від 10^{-13} до 10^{-10} моль / л), а також при визначенні гормонів не пептидної природи, наркотиків та лікарських засобів, ферментів, бактеріальних і вірусних антигенів.

Специфічність РІА визначається специфічністю антитіл і може бути надзвичайно високою. Отримано антитіла та розроблені методики РІА, що дозволяють диференціювати антигени з найменшими структурними відмінностями, в тому числі:

Т3 і Т4 (розрізняються одним атомом йоду).

кортизол і кортикостерон (розрізняються одним гідроксильним радикалом).

інсуліни людини і свині (розрізняються кінцевою амінокислотою В-ланцюга).

інсуліни свині, кашалота і собаки (мають однакову послідовність амінокислот, але різну конформацію).

Особливості застосування РІА в клініці

В основі визначення багатьох сотень ендогенних і екзогенних речовин лежить загальний принцип, але вимоги до чутливості методу і діагностичне значення результатів розрізняються.

Концентрації деяких пептидних гормонів у однієї людини змінюються в дуже широких межах: під впливом стимуляторів або інгібіторів секреції і залежно від часу доби рівень гормону може змінюватися на 1-2 порядки. У таких випадках результати РІА самі по собі не мають першорядного значення для діагнозу. Приклад: базальна концентрація гастрину в плазмі у здорових людей зазвичай <50 пг / мл. У хворих зі зниженою кислотністю шлункового вмісту, з гастриноміями (синдром Золінгера-Елісона) або з порушенням регуляції продукції гастрину в пілорусу (непухлинна гіпергастринемічна гіперхлоргидрія) базальний рівень гастрину значно підвищений і знаходиться в межах від 100 до 5000 пг / мл. Щоб встановити причину гіпергастринемії, необхідно досліджувати шлункову секрецію і провести диференційну діагностику синдрому Золінгера-Елісона та непухлинної гіпергастринемічної гіперхлоргидрії. Для диференціальної діагностики застосовують стимуляційні проби з секретином або з харчовим навантаженням.

Внутрішньовенне (в/в) введення секретину викликає викид гастрину з пухлини, але не з нормальних клітин пілорусу. Навпаки, харчова навантаження стимулює секрецію гастрину в

клітинах пілорусу, але не в клітинах гастрині. Стимуляційні і супресивні проби можуть знадобитися і в інших подібних випадках.

Концентрацію гормону слід зіставляти з концентраціями речовин, метаболізм яких регулюється даними гормоном, і речовин, що регулюють його секрецію. Наприклад, продукція інсуліну посилюється при підвищенні концентрації глюкози і деяких амінокислот в крові і знижується при гіпоглікемії. Рівень СТГ зростає при стресі та гіпоглікемії і знижується при гіперглікемії. Високий рівень АКТГ у плазмі на тлі зниженого рівня кортикостероїдів свідчить про первинну наднирковозалозну недостатність, а як що зміст кортикостероїдів підвищено, слід запідозрити гіпофізарний синдром Кушинга. Для уточнення результатів РІА нерідко потрібні стимуляційні і супресивні проби.

При визначенні не пептидних гормонів (зокрема, стероїдних і тиреоїдних) чутливість методу дуже важлива, оскільки в нормі концентрації цих гормонів дуже низькі.

При визначенні концентрацій лікарських засобів, особливо препаратів з вузьким терапевтичним діапазоном, також потрібна висока чутливість РІА.

При визначенні антигенів вірусів та мікроорганізмів (таких, як антиген вірусу гепатиту В або туберкулопротеїд) треба враховувати, що їх абсолютна концентрація в якій-небудь біологічній рідині залежить не тільки від важкості інфекції, але і від інших факторів, наприклад - від способу отримання матеріалу.

Біологічна активність гормону, його фрагмента або аналога далеко не завжди відповідає його імунохімічній реактивності. Щоб за результатами РІА судити про біологічну активність гормону, потрібно знати, в яких молекулярних формах існує гормон і які з них можна визначити за допомогою даної методики РІА.

Таким чином, роль РІА та інших імунохімічних методів аналізу в діагностиці хвороб і в фундаментальних медико-біологічних дослідженнях важко переоцінити. Тим не менше при плануванні й оцінці результатів імунохімічних досліджень треба брати до уваги всі їхні особливості і тонкощі і ставити діагностичні задачі з урахуванням реальних можливостей методу.

Проведення радіоімунологічного аналізу в практичних лабораторіях, що займаються медичною лабораторною діагностикою, здійснюється з використанням стандартних комерційних наборів, які містять необхідну кількість реагентів для проведення 50-100 визначень. До набору додається інструкція з докладним описом послідовності дій. На упаковці набору вказані термін придатності та умови зберігання набору.

До основних переваг радіоімунологічного аналізу відносяться:

висока чутливість, здатність визначати мінімальні кількості речовини, приблизно рівні 10^{-14} - 10^{-15} моль / л; специфічність, здатність системи вимірювати тільки одну, суворо певну субстанцію; - надійність, здатність визначати дійсну кількість речовини; точність, яка полягає в відтворюваності отриманих результатів;

доступність для автоматизації всього процесу від піпетування до аналізу отриманих результатів.

Основним організаційним недоліком цих методів є необхідність спеціального оснащення лабораторії для роботи з радіоактивними матеріалами. Важливим є і більш висока

вартість апаратури та реактивів у порівнянні з імуноферментним та імунофлуоресцентним методами. Крім того, доцільним є проведення аналізу тільки великих серій проб. За такої умови знижується вартість дослідження і збільшується ефективність використання апаратури, але подовжується до декількох тижнів термін видачі результату, що в деяких випадках небажано.

Імунохроматографічні методи

Перші «швидкі» експрес – тести з'явилися в кінці 90 – років минулого сторіччя. Вони вироблялися різними зарубіжними компаніями США, Німеччини, Франції і були призначені для лікарів ургентної медицини. Час отримання результатів таких тестів став займати 10 – 20 хвилин. Точність досліджень досягала 100%.

Що ж таке швидкі тести? У чому принцип їх роботи?

Для виробництва експрес-тестів застосовуються найчастіше наступні технології: метод імунохроматографії (латеральної дифузії), метод імунофільтрації - мембранні пристрої для концентрації імуного матеріалу (проточні), метод латекс-аглютинації. Швидкі тести, що широко представлені в Україні працюють за принципом імунохроматографічного аналізу.

Імунохроматографічний аналіз (ІХА) - заснований на реакції між антигеном і специфічним до нього антитілом в біологічних матеріалах (сеча, цільна кров, сироватка або плазма крові, слина, фекалії і т.д.). Даний вид аналізу здійснюється за допомогою індикаторних смужок, паличок, панелей або тест-касет. ІХА часто позначається в літературі також як стрип-тест, QuikStrip cassette, QuikStrip dipstick, експрес-тест або експрес-аналіз. Ці назви пов'язані з швидкістю проведення цього методу аналізу. Результати визначаються візуально в період з 3 по 20 хвилину.

У ІХА- тестах використовується три типи антитіл:

1. Рухомі моноклональні антитіла до досліджуваного антигену або антитіла, кон'юговані ("зшиті") з колоїдним золотом - барвником, який можна легко ідентифікувати навіть в найменших концентраціях. Ці антитіла нанесені поблизу ділянки занурення тест-смужки у фізіологічну рідину (сечу, кров).

2. Поліклональні антитіла до досліджуваного антигену або антитіл, жорстко іммобілізовані в тест-зоні смужки.

3. Вторинні антитіла до моноклональних антитіл, жорстко іммобілізовані в контрольній зоні тест-смужки. Принцип дії імунохроматографічного тесту полягає в тому, що при його зануренні у фізіологічну рідину вона починає мігрувати уздовж смужки за принципом тонкошарової хроматографії. Рухомою фазою в даному випадку є фізіологічна рідина. Разом з рідиною рухаються і антитіла з барвником. Якщо в цій рідині присутній досліджуваний антиген (гормон, інфекційний або онкологічний маркер), то відбувається його приєднання, як до першого (антитіла у тестовій зоні), так і до другого (антитіла у контрольній зоні) типу антитіл.

Основними перевагами використання імунохроматографічних тест-систем є:

1. Простота і зручність — дозволяє отримати результат (аналіз і первинне уявлення про причину захворювання) без устаткування і спеціальних навичок.

2. Надійність — достовірність тестів досягає 99,9%, при цьому кожен тест має вбудований внутрішній контроль.

3. Економічність — мінімальні витрати на придбання тесту і економія часу на проведення обстеження.

4. Анонімність — особливо важлива при виявленні захворювань, що передаються статевим шляхом, інших інфекційних захворювань, а також виявлення фактів вживання наркотичних речовин.

5. Незалежність — не вимагає лабораторії, може бути проведене у будь – який час, коли необхідне обстеження. Нажаль, сьогодні в Україні тест-системи використовуються частіше за все з метою діагностики, диференційної діагностики та контролю лікування. Метою залишається впровадження скринінгової діагностики онкологічних захворювань, кардіологічних та ендокринних хвороб.

Швидкі тести – перший крок, що надає лікарю надійну первинну інформацію про стан хворого та зорієнтує щодо подальших кроків.