

Практична робота 7

Екологічна імунологія

Тема: РЕАКЦІЯ ПРЕЦИПІТАЦІЇ

Мета: з'ясувати особливості взаємодії антигенів з антитілами у реакціях преципітації

Теоретичні відомості

Реакція преципітації (РП) – взаємодія розчинного антигену (преципітиногену) й антитіла (преципітину) в присутності електроліту (0,85 % розчин натрію хлориду). РП відрізняється від аглютинації за характером антигенів: в реакції аглютинації вони корпускулярні, навіть цілі клітини, а в реакції преципітації – молекулярні, в розчинному стані. Антигенами можуть бути екстракти мікроорганізмів, тканин, органів, хімічні речовини.

У реакції преципітації антигеном є окремі молекули (білки, полісахариди, вони можуть бути як повними антигенами, так і гаптенами). Перебіг реакції відбувається за наявності електролітів. На нерозведену сироватку в пробірці нашаровують розведений антиген. Якщо антиген і антитіло відповідають один одному, то через кілька хвилин з'являється осад у вигляді каламутного кільця (кільця преципітації). Реакцію застосовують для діагностики менінгіту, збудника сибірки, для виявлення фальсифікації харчових продуктів. Реакцію преципітації можна ставити в гелі для виявлення токсикогенності збудників дифтерії. В судово-медичній експертизі її застосовують для визначення видової належності крові. За допомогою специфічних преципітуючих сироваток проти білка людини, різних тварин і птахів можна встановити, якому виду належить виявлена кров.

Реакція флокуляції є різновидом преципітації у рідкому середовищі. Використовується для виміру сили токсинів і анатоксинів бактерій, зокрема дифтерійного анатоксина. Для визначення специфічності взаємодії антигена і антитіла змішують у пробірках однакові об'єми цільної (або розведеної у 2 рази сироватки) і розведеного фізіологічним розчином антигена. В процесі інкубації при 45 0C спостерігають, в якій пробірці раніше утворилися ніжні пластівці (ініціальна флокуляція). Кількість антитоксичних одиниць сироватки у пробірці з ініціальною флокуляцією відповідає кількості одиниць анатоксина. Реакцію можна ураховувати точніше за допомогою вимірювання мутності реакційної суміші на фотоелектроколориметрі.

Кільцепреципітація – якісна реакція преципітації. Проводиться у спеціальних тонких преципітаційних пробірках, куди спочатку наливають нерозведену преципітуючу сироватку, а зверху на неї нашаровують розчин антигена у зростаючих розведеннях, не допускаючи змішування двох шарів. При позитивній реакції через декілька хвилин на межі розділу шарів сироватки і антигена з'являється чітке кільце білуватого кольору – преципітат. На відміну від аглютинації титр преципітуючої сироватки визначається по титру антигена, тобто по тій найменшій кількості антигена, яка ще дає преципітат. Реакція кільцепреципітації дуже чутлива і специфічна і дозволяє виявляти антигени, розведені у тисячі і навіть мільйони разів. Кільцепреципітація використовується для визначення збудників хвороб по наявності певних антигенів, а також для визначення видової приналежності крові тварин за допомогою людських, курячих та інших сироваток.

Реакція термопреципітації Асколі – різновид реакції кільцепреципітації. Вона базується на тому, що преципітиногени проявляють значну стійкість до високої температури, витримують довготривале кип'ятіння, зберігаючи при цьому здатність реагувати з антитілами. Реакція термопреципітації Асколі використовується в основному для діагностики сибірської виразки (сибірки).

Реакції преципітації в гелі проводяться на щільних середовищах – на 1% агарі чи агарозі у чашках Петрі або на скляних пластинках. Вперше цей метод запропонував Дж. Оудін ще у 1946 р., встановивши, що антитіла сироваток можуть здійснювати дифузію в гелі та зв'язуватись прямо в ньому з антигенами. Іншими вченими були запропоновані модифікації методу преципітації в гелі. Деякі з них ми розглянемо нижче.

Зустрічна двомірна дифузія (метод Оухтерлоні) дозволяє аналізувати не одну пару «антиген – антитіло», а складні суміші мікробних антигенів і різних білків сироватки. На чашках Петрі з агаром роблять невеличкі (діаметром 5-6 мм) лунки: одна – в центрі, інші – по периметру, на відстані 1-2 см від центральної. В центральну лунку вносять антиген, а в інші – різні сироватки (або навпаки). Антигени і антитіла здійснюють дифузію у гель і починають рухатись назустріч один одному. Через 1-3 доби інкубації при кімнатній температурі в місцях, де зустрічаються специфічні антиген і антитіло, в гелі утворюються білуваті дугоподібні смужки – лінії преципітації. Якщо лінії преципітації з'являються біля декількох лунок, то в досліджуваному матеріалі є декілька компонентів, що вступають в реакцію.

Проста радіальна імунодифузія (метод Манчині) використовується в лабораторній практиці для визначення концентрації імуноглобулінів (IgM, IgG, IgA) у сироватках людей. Радіальна імунодифузія проводиться у гелі на спеціальних скляних або полістиролових пластинах. Постановка реакції передбачає наявність стандартної сироватки з відомою концентрацією імуноглобулінів (для побудування калібровочної кривої), а також моноспецифічних антисироваток проти IgM, IgG, IgA (для виявлення Ig у сироватці хворого). Антисироватку отримують шляхом імунізації тварини людськими імуноглобулінами певного класу (M, G чи A). Далі здійснюють очистку тваринної сироватки до такого стану, коли в ній залишаться антитіла тільки одного виду (наприклад, проти людських IgM).

Для постановки реакції завчасно готують гель на основі освітленого 1% агара (або агарози) з додаванням фізіологічного розчину (електроліта) і м'єртиолята (консерванта). У розплавлений гель при температурі 48°C вносять моноспецифічні антисироватки: в одну пробірку – антисироватку проти IgM, в другу – IgG, в третю – IgA. Кожний варіант гелю наносять на окрему спеціальну пластину і підписують її. Після застигання гелю в ньому роблять декілька горизонтальних рядів лунок з діаметром 2-3 мм. В них вносять по 20 мкл передчасно розведених проб досліджуваної сироватки хворого і стандартної сироватки. На одній пластині можна одночасно проаналізувати декілька сироваток хворих на наявність Ig певного класу. Пластини утримують у вологій камері при кімнатній температурі 48 годин. Завдяки дифузії в агар навколо лунок з'являються кільця преципітації з різним діаметром в залежності від розведення сироваток. Іноді для покращення візуалізації зон преципітації гелі профарбовують амідочорним. Після відмивки барвника преципітати набувають синього кольору. Вимірюють діаметр кілець зразків стандартної сироватки і для кожного виду Ig будують свою калібровочну криву, відкладаючи на осі абсцис концентрацію імуноглобуліна в пробі, а на осі ординат – квадрат діаметра зони преципітації. Вимірявши діаметри преципітатів досліджуваної сироватки на трьох пластинах, можна визначити концентрацію імуноглобулінів трьох класів у даній сироватці.

Імуноелектрофорез – варіант імунопреципітації в гелі, в якому поєднані електрофорез і метод зустрічної дифузії Оухтерлоні. Цей метод дозволяє визначати склад багатоконпонентних сумішей розчинних антигенів (до 30 конпонентів). Спочатку на агаровій пластині здійснюють розділення суміші антигенів в електричному полі. Потім у канавку, вирізану в гелі паралельно напрямку електрофоретичного розділення, наливають преципітуючу сироватку. В результаті уздовж канавки утворюються дугоподібні лінії преципітації. Кількість цих ліній відповідає кількості специфічних пар “антиген – антитіло”.

РЕАКЦІЯ ПРЕЦИПІТАЦІЇ

Реакції преципітації (РП) [від лат. praecipito, осаджувати] запропоновані Краусом (1897 р) і засновані на феномені утворення видимого осаду (преципітату) або загального помутніння середовища після взаємодії розчинних або у колоїдному дисперсному стані Аг з АТ.

Преципітація — реакція осадження комплексу антигену з антитілом; одна з імунологічних реакцій, що дозволяють визначити вміст антитіл в сироватці крові хворих або вакцинованих людей, а також імунізованих тварин.

Відрізняється від аглютинації за характером антигенів: в реакції аглютинації вони корпускулярні, навіть цілі клітини, а в реакції преципітації – молекулярні, в розчинному стані. Антигенами можуть бути екстракти мікроорганізмів, тканин, органів, хімічні речовини.



Реакція преципітації (РП) — взаємодія розчинного антигену (преципітиногену) й антитіла (преципітину) в присутності електроліту (0,85 % розчин натрію хлориду, нейтральний рН) з утворенням осаду (**преципітату**) чи помутніння.

РП має високу чутливість і специфічність. Вона дає змогу виявити антиген (преципітиноген) у розведенні 1 : 1 000 000 і 1 : 10 000 000.

Як преципітиногени можуть бути використані білки тваринного, рос-линного і бактеріального походження: кров, сироватка крові, екстрак-ти з різних органів і тканин, харчових продуктів білкового похо-дження (м'ясо, риба, молоко), фільтрати культур мікроорганізмів або тканин, уражених ними.

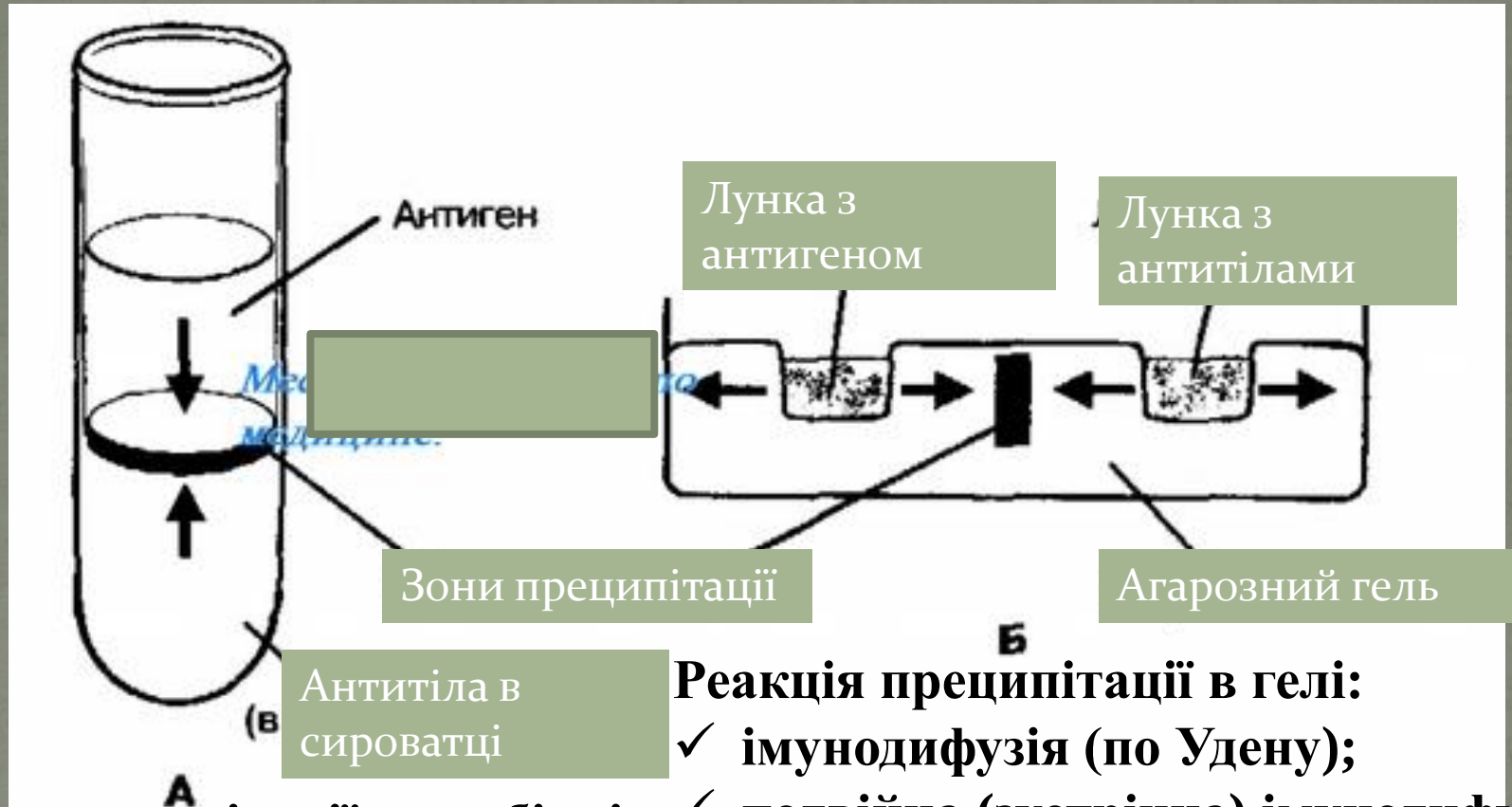
Деякі преципітиногени витримують нагрівання до температури 120—180 °С.

За титр реакції приймають найбільше розведення **антигена**, яке дає позитивний результат.

Спектр використання реакції преципітації

- ❑ РП застосовують для визначення антигену при діагностиці інфекцій (сибірська виразка, менінгіт, туляремія, віспа та ін.), а також при вивченні антигенної структури деяких груп бактерій.
- ❑ У судовій медицині для визначення видової приналежності плям крові, сперми.
- ❑ У санітарній експертизі при встановленні фальсифікації продуктів (виявляють домішки мо-лока одного виду тварини у молоці іншого виду, додавання штучного меду до натурального, фальсифікацію м'ясних, рибних, борошняних виробів і т. д.)
- ❑ У біології РП застосовують для встановлення генетич-них зв'язків близьких між собою видів (філогенетичну спорідненість у тварин, рослин, мікроорга-нізмів).

Відомо понад 20 модифікацій РП, які поділяють на кілька груп:
РП у пробірках, капілярах, на предметних скельцях, фільтрувальному папері, ацетатцелюлозній плівці, в гелі та ін.



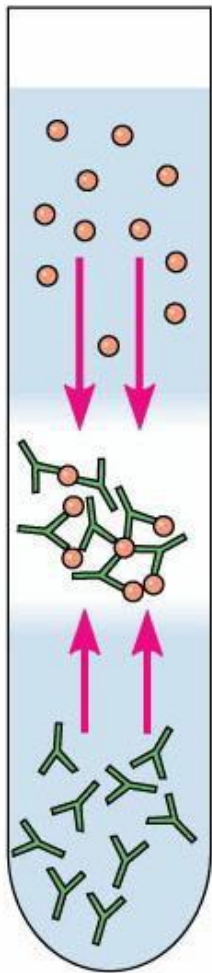
Реакція преципітації у пробірці:

- ✓ реакція кільцепреципітації;
- ✓ реакція мікропреципітації;

Реакція преципітації в гелі:

- ✓ імунодифузія (по Удену);
- ✓ подвійна (зустрічна) імунодифузія,
- ✓ радіальна імунодифузія (по Манчіні);
- ✓ подвійна (зустрічна) радіальна імунодифузія (по Оухтерлоні).

Реакція кільцепреципітації

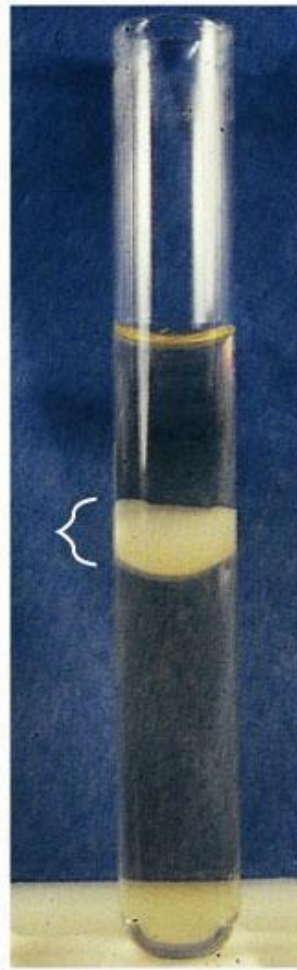


Антиген
(розчинний)

Зона
еквівалентності:
видимий
преципітат

Антитіла

(a)



(b)

Проводять у спеціальних преципітаційних пробірках діаметром 2,5-3,5 мм, нашаровуючи розчинений в електроліті АГ на імунну сироватку.

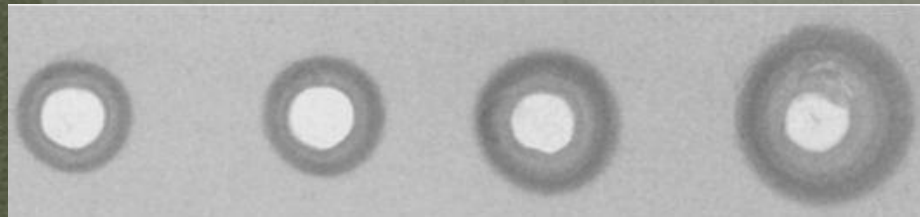
При оптимальному співвідношенні АГ і АТ на кордоні двох розчинів утворюється непрозоре кільце - преципітат.

Обов'язковою умовою постановки реакції преципітації (РП) в рідкому середовищі є максимальна прозорість іммунореагентів.

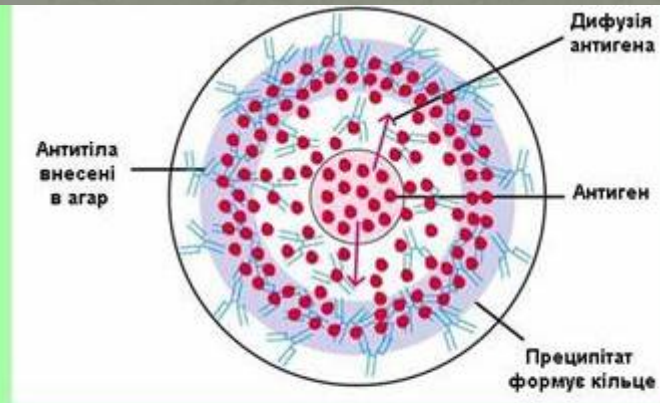
В якості реагентів використовують гіперімунні преципітуючі сироватки з високими титрами АТ до гомологічним Аг. При постановці РП розводять не сироватку, а Аг.

Реакція преципітації в гелі

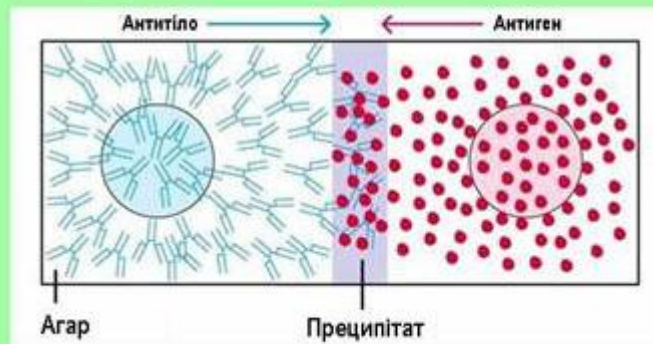
Розрізняють просту і подвійну дифузію в гелі.



Радіальна
імунодифузія

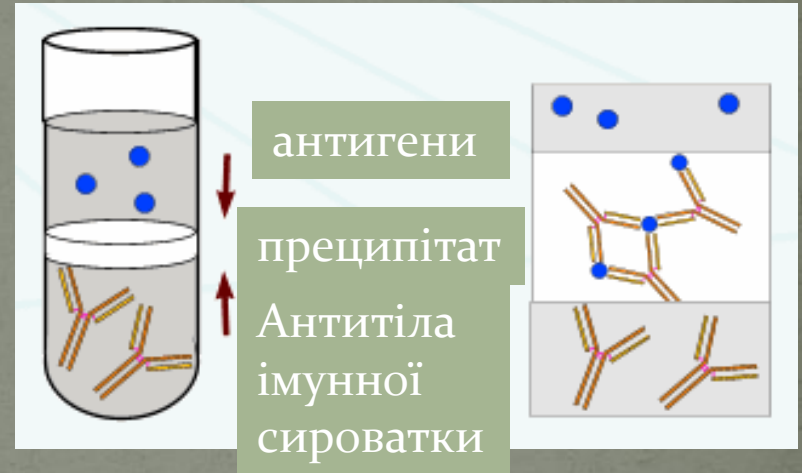


Подвійна
імунодифузія



Проста імунодифузія (реакція Удена).

Агаровий гель, який містить преципітуючу сировотку, поміщають у вузькі пробірки і зверху нашаровують розчин антигена. Дифундуючи в гель, антиген зв'язується з відповідними антитілами, утворюючи мутні лінії преципітації. Розміщення ліній в агарі визначається концентрацією відповідного антигена.

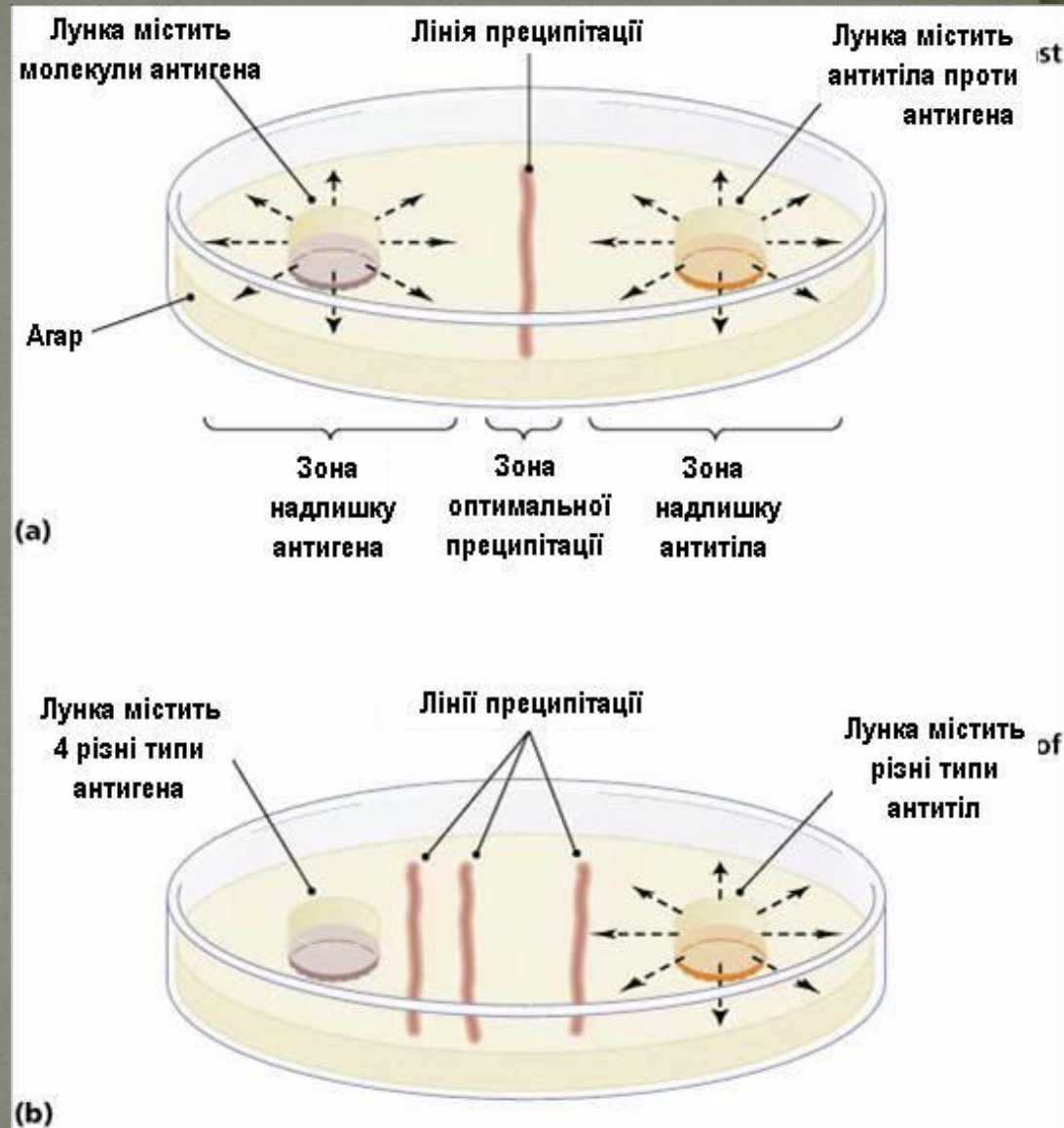


Подвійна імунодифузія за Оклі і Фулторпом.

На відміну від попереднього методу у подвійній імунодифузії реагенти розділені шаром нейтрального гелю, який не містить реагентів. На поверхню гелю, змішаного з специфічною сироваткою, вносять шар нейтрального гелю, після застигання якого нашаровують антиген. Дифундуючи назустріч один одному, антиген і антитіла зустрічаються в шарі нейтрального геля та утворюють лінії преципітації.

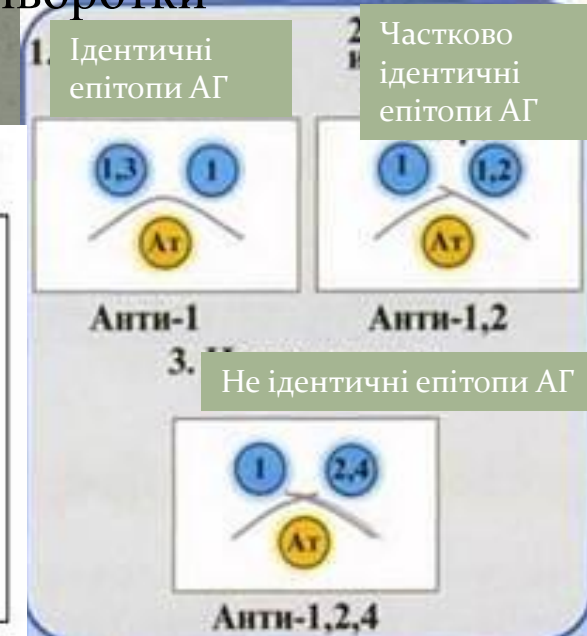
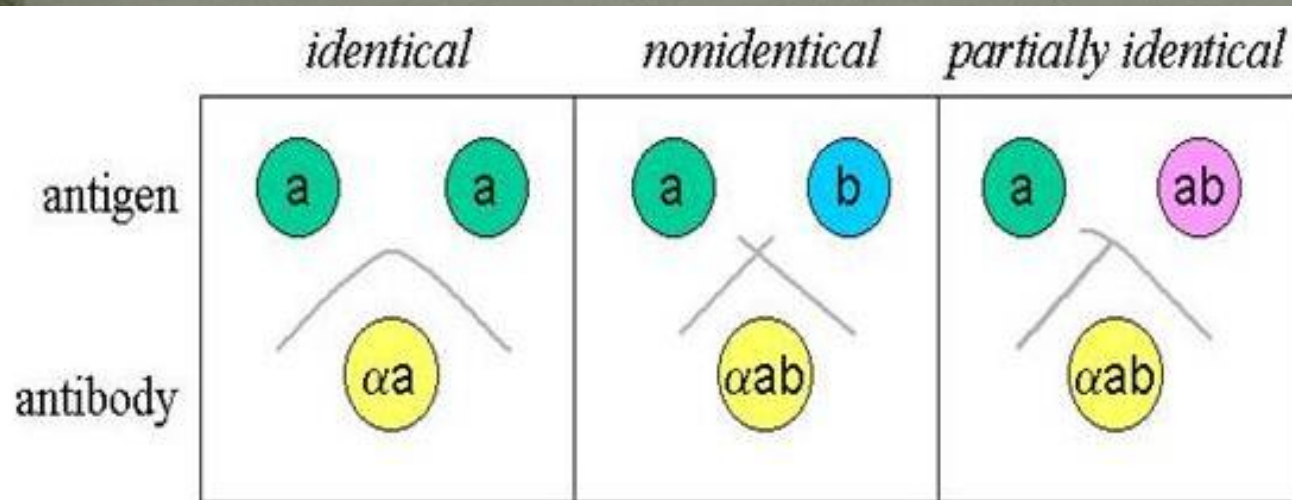
Подвійна радіальна імунодифузія за Оухтерлоні

В агарі, який розлитий тонким шаром в чашках Петрі або на предметних скельцях, за допомогою спеціальних штампів роблять круглі лунки на однаковій відстані одна від одної (4-10 мм). У лунки вносять досліджувану сироватку і розчин антигена в різних розведеннях або різні антигени. Із лунок антигени й антитіла дифундують назустріч один одному, і в точці їх оптимального співвідношення утворюється преципітат у вигляді тоненьких білих ліній. Якщо в сироватці є різні антитіла або антигени декількох видів, з'являються декілька ліній преципітації.



Оухтерлоні розрізняв 4 основні варіанти реакції між антигеном і антитілом:

- 1) при взаємодії ідентичних антигенів із специфічними антитілами лінії преципітації зливаються, утворюючи дугу;
- 2) коли обидва антигени неідентичні - лінії преципітації перехрещуються при умові, що сиворотка містить антитіла проти двох антигенів;
- 3) при частковій ідентичності лінії преципітації нагадують дугу із «шпорою». Чим більшою є спорідненість антигенів, тим «шпора» менше виражена і розміщується ближче до дуги;
- 4) обидві лінії перехрещуються і одночасно зливаються. Це означає, що обидва антигена містять як однакові, так і різні детермінанти, які вступають в реакцію з антитілами поліспецифічної сиворотки



Одним із різновидів реакції преципітації в гелі є проста радіальна імунодифузія за Манчіні.

За її допомогою визначають концентрацію імуноглобулінів у сироватці крові.

Методика постановки реакції:

Розтоплений агар при температурі 56°C змішують з відповідною антисывороткою (анти IgG, IgM чи IgA) у співвідношенні 3:1 і швидко вливають у чашку Петрі або на скляні пластинки.

Після його застигання з допомогою трафарета роблять лунки. У кожную дослідну лунку вносять по 0,5 мкл досліджуваної сироватки. У чотири контрольні лунки додають у чотирьохкратних розведеннях стандартну сироватку з відомим вмістом імуноглобулінів.

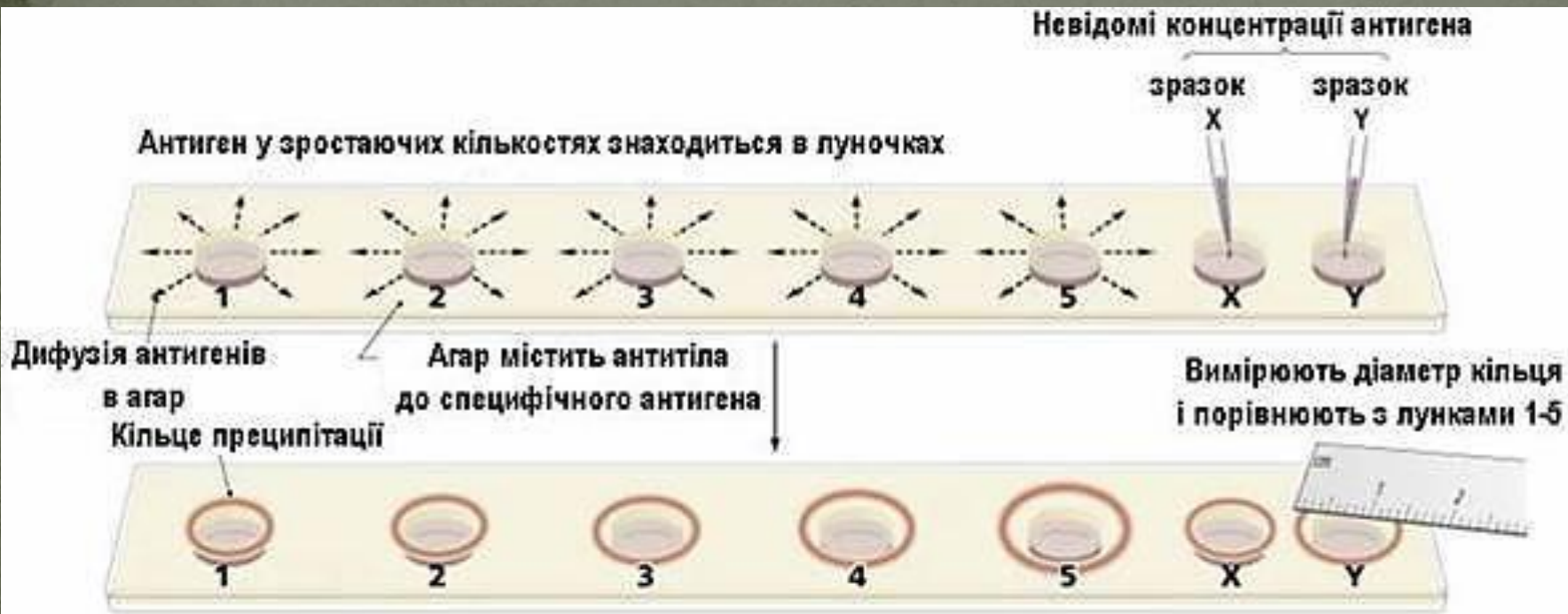
Після чого чашки або пластинки поміщають у вологе середовище в ексікатор на 24-48 год при 4°C і оцінюють результати реакції.

Вимірюють діаметри кілець преципітації навколо лунок.

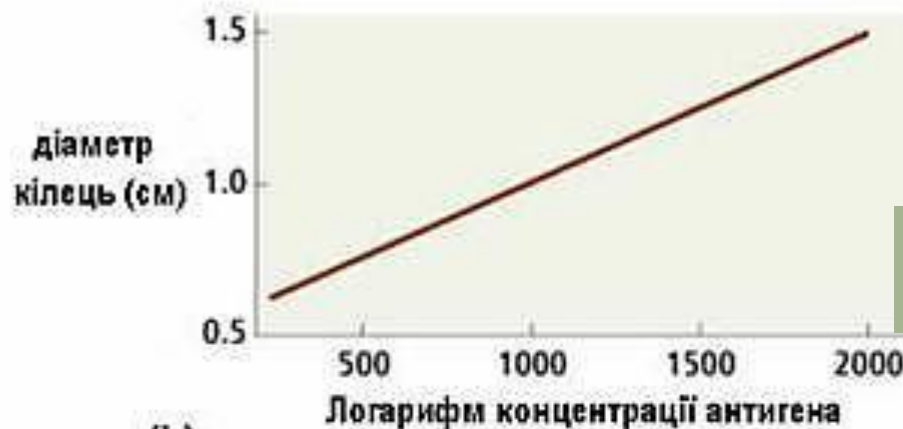
За величиною діаметрів кілець преципітації навколо лунок із стандартною сироваткою будують калібровальну криву.

При цьому враховують, що у певному інтервалі концентрації імуноглобулінів діаметр кільця прямо пропорційний логарифму концентрації імуноглобулінів.

Реакція радіальної імунодифузії Манчіні



(a)



(b)



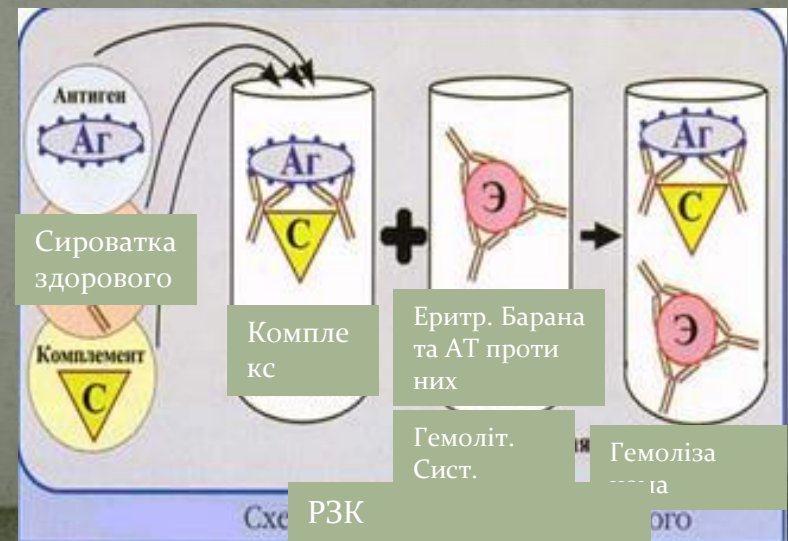
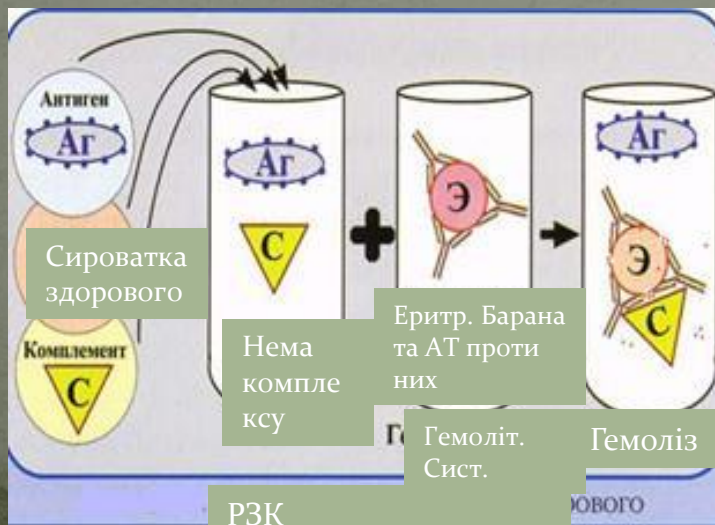
Реакція зв'язування комплементу (РЗК)

Складна двоетапна серологічна реакція.

Вона належить до непрямих двосистемних гетерологічних реакцій і ґрунтується на принципі взаємодії комплементу із специфічним комплексом антиген-антитіло. Внаслідок - цього не відбувається гемолізу сенсibilізованих еритроцитів.

Комплемент - термолабільний неспецифічний антибактеріальний фактор. Комплекс складних білків, постійно присутніх в крові.

Гемоліз - руйнування еритроцитів крові з виділенням в навколишнє середовище гемоглобіну. У нормі гемоліз завершує життєвий цикл еритроцитів (120 діб) і відбувається в організмі людини і тварин безперервно.



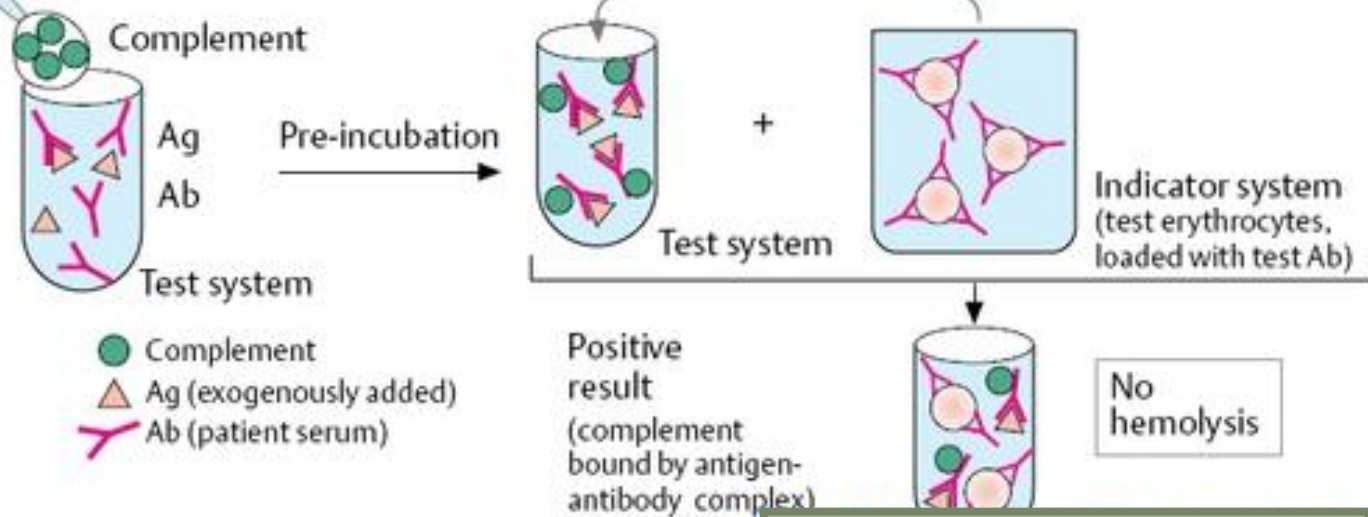
Реакція включає дві фази

У I фазі реакції (специфічній) зв'язування комплементу (РСК) шуканий Аг (або АТ) реагує з діагностичною антисивороткою (або Аг-діагностикумом) і комплементом. Утворений комплекс Аг-АТ зв'язує комплемент.

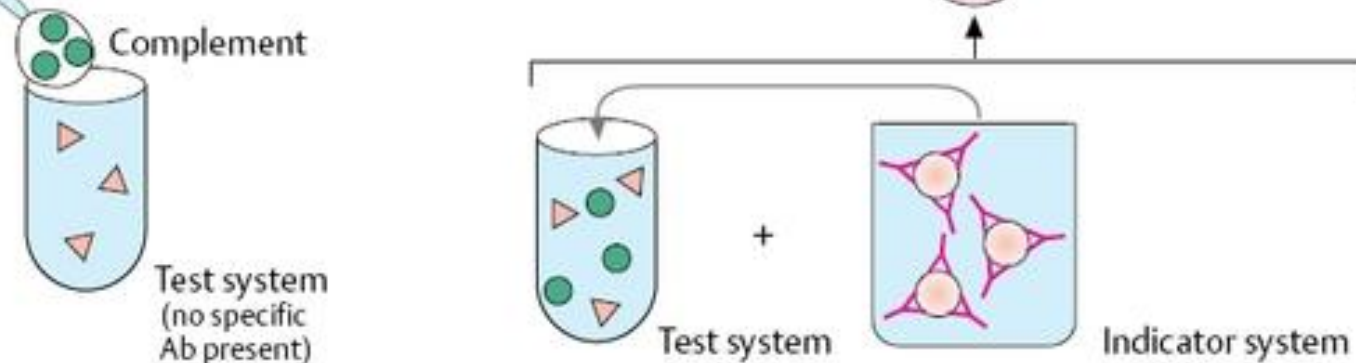
У фазі II реакції (індикаторна) визначають наявність вільного комплементу внесенням в реакційне середовище гемолітичної системи - еритроцитів барана і гемолітичної сироватки, що містить АТ до них. Якщо Аг і АТ не відповідають один одному і не утворюють імунних комплексів, то зв'язування комплементу не відбувається. В цьому випадку вільний комплемент взаємодіє з компонентами гемолітичної системи, фіксуючись на комплексі еритроцит-антиеритроцитарний АТ. Наслідок цього - гемоліз індикаторних клітин (феномен «лакової крові») - реакцію вважають негативною. Якщо в фазі I реакції зв'язування комплементу

Якщо у фазі I реакції АТ і Аг відповідають один одному, то утворюються імунні комплекси, що пов'язують комплемент, руйнування еритроцитів після внесення гемолітичної системи не спостерігають і реакцію вважають **ПОЗИТИВНОЮ**.

Principle: competition between test system(Ag + Ab) and indicator system (erythrocytes loaded with test Ab) for complement



Negative result (complement available for lysis of test erythrocytes)



B. Complement-binding reaction (CBR)

Компоненти реакції

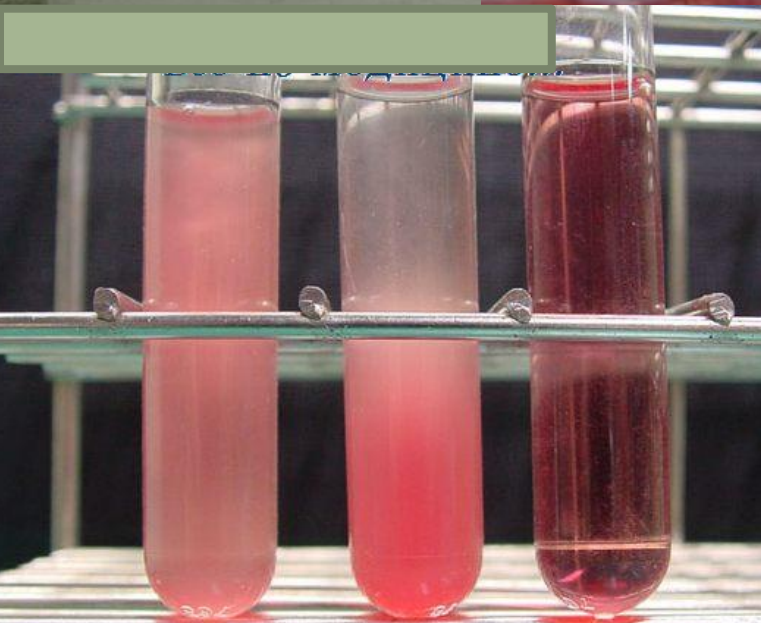
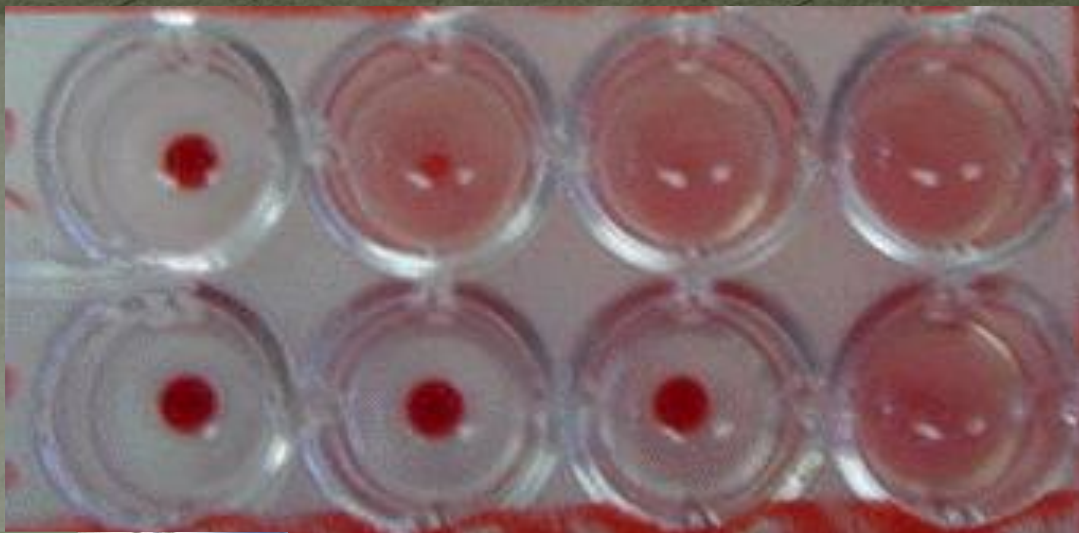
Компонентами реакції є:

- ✓ вірусмісткий матеріал,
- ✓ специфічна імунна сироватка,
- ✓ комплемент,
- ✓ гемолітична сироватка,
- ✓ еритроцити барана;
- ✓ електроліт.

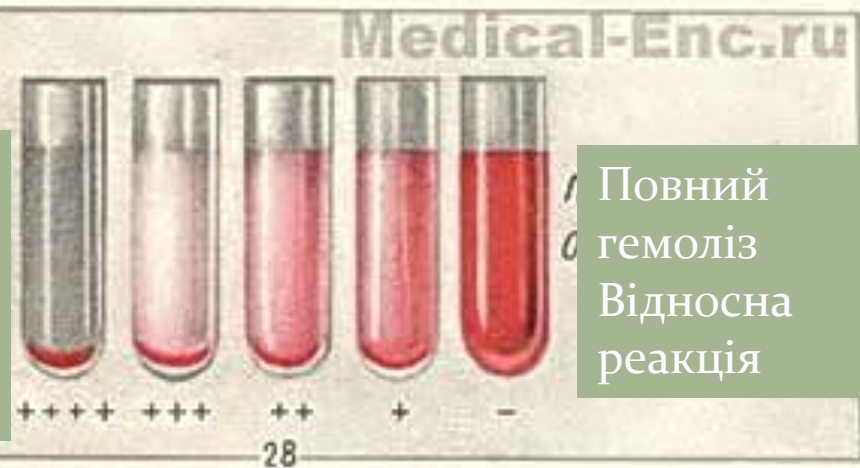
Зважаючи на високу чутливість реакції, всі її компоненти перед постановкою основного дослідження обов'язково титрують для визначення робочих доз інгредієнтів.

При виконанні реакції в окремих пробірках змішують вірусмісткий матеріал, специфічну імунну сироватку і комплемент у робочій дозі. Після інкубування цієї першої системи до неї додають попередньо сенсibilізовані гемолітичною сироваткою еритроцити барана. Після витримання дослідних пробірок при від-повідній температурі проводять облік результатів.

При утворенні специфічного комплексу між вірусами та імунною сироваткою він набуває здатності адсорбувати комплемент. Тому наступне додавання гемолітичної системи (при відсутності вільного комплексу) не супроводжується лізисом еритроцитів – позитивний результат. Якщо антигени та антитіла є гетерологічними, вільний комплемент зв'язується із сенсibilізованими еритроцитами барана, викликаючи їх гемоліз. Залежно від ступеня вираження гемолізу реакцію оцінюють за 4-плюсовою системою: від “++++” – різко позитивна реакція (прозора рідина і осад еритроцитів) до “–” – негативна реакція (відсутність осаду еритроцитів, повний гемоліз або “лакова кров”).



Повна
затримка
гемолізу
Позитивна
реакція



Повний
гемоліз
Відносна
реакція

Завдання 1. Перегляньте відеофільм з постановкою реакції преципітації для виявлення видової приналежності крові. Зробіть короткий аналіз переглянутого; визначте, реакції яких видів представлені.

Завдання 2. Проаналізуйте схематичне зображення двох варіантів реакції преципітації, поясніть відмінності (рис. 1).

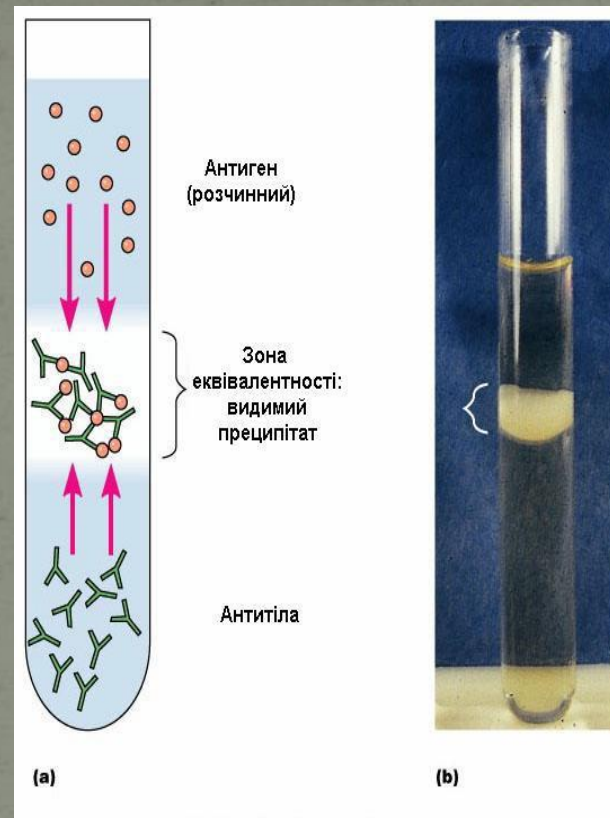
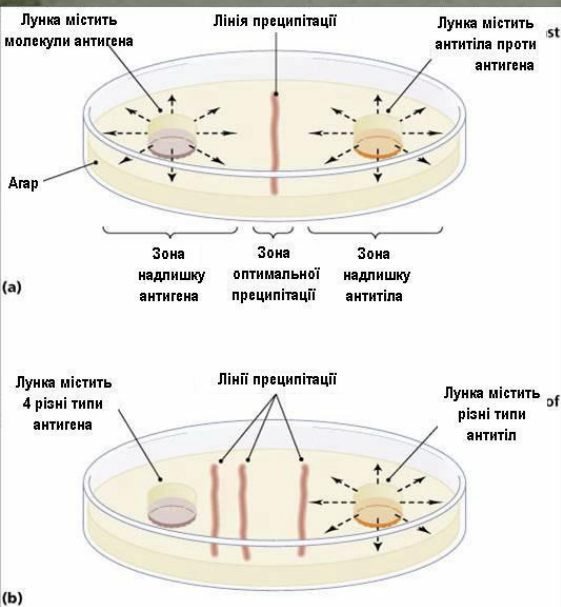


Рис. 1. Схематичне зображення двох варіантів реакції преципітації. Сформулюйте висновки до роботи.