

Державний вищий навчальний заклад
“Запорізький національний університет”
Міністерства освіти і науки України

Н.В. Колісник, Л.О. Омелянчик

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ІМУНОЛОГІЇ

Навчальний посібник
для спеціалістів і магістрів біологічного факультету

Затверджено
вченою радою ЗНУ
Протокол № _____ від _____

Запоріжжя
2010

УДК 577.17: 577.1 (076)

Колісник Н.В., Омелянчик Л.О. Методи лабораторної імунології. Навчальний посібник для спеціалістів і магістрів біологічного факультету. - Запоріжжя: ЗНУ, 2010. – 118 с.

Навчальний посібник містить теоретичні положення, основні поняття та принципи сучасного імунного аналізу гуморальних та клітинних факторів імунної системи людини та тварин. Призначений для спеціалістів та магістрів біологічного факультету денного та заочного відділень (спеціальності «Біологія», «Хімія»).

Рецензент *В.О. Лях*

Відповідальний за випуск Н.В. Колісник

	ЗМІСТ	
	Передмова.....	9
1	Теоретичні основи імунного аналізу. Сучасний стан і перспективи розвитку імуноаналізу.....	11
1.1	Поняття імунного аналізу та фактори, що визначають його тип.....	11
1.1.1	Групи імунного аналізу за основним принципом...	11
1.1.2	Стандартні препарати.....	12
1.1.3	Антитіла як реагенти імунного аналізу.....	13
1.1.4	Гомогенні та гетерогенні методи. Носії у твердофазних методах. Носії у твердофазних методах.....	13
1.1.5	Мітки, класифікація за типом мітки.....	14
1.1.6	Методи визначення мічених сполук.....	14
1.1.7	Класифікація за способом здійснення аналізу.....	15
1.2	Подальший розвиток методів імунного аналізу.....	15
2	Класифікація методів імунного аналізу за способом детекції утворених комплексів антиген-антитіло...	16
2.1	Властивості антигенів та антитіл.....	17
2.1.1	Антигени. Властивості антигенів як індукторів імунної відповіді. Валентність антигенів.....	19
2.1.2	Антитіла. Природа та структура молекули антитіл..	20
2.1.2.1	Валентність антитіл.....	22
2.1.2.2	Афінність і авідність антитіл.....	22
2.1.2.3	Специфічність антитіл.....	24
2.1.2.4	Одержання антитіл. Поліспецифічні та моноспецифічні сироватки. Перехресно-реагуючі антитіла.....	25
2.1.2.5	Властивості поліклональних антисироваток.....	25
2.1.2.6	Загальна схема імунізації тварин.....	27
2.1.2.7	Динаміка синтезу антитіл. Первинна та вторинна імунна відповідь.....	28
2.1.2.8	Виділення окремих класів імуноглобулінів.....	28
2.1.2.9	Визначення титру антитіл.....	29
2.1.2.10	Загальні принципи роботи з антитілами.....	29
2.1.2.11	Моноклональні антитіла. Гуманізовані моноклональні антитіла	30
2.1.2.12	Антитіла як антигени. Вторинні антитіла.....	32
2.2	Вибір методів імуноаналізу за участю антитіл.....	33
2.2.1	Загальна характеристика реакції антиген-антитіло. Фактори, що впливають на прояв реакцій антиген-антитіло.....	33
2.2.2	Феномени перебігу реакції антиген-антитіло та методи їхнього дослідження.....	34
2.3	Фактори, що визначають можливість реакції зв'язування антиген-антитіла.....	35
3	Реакції преципітації й методи, засновані на реакції преципітації.....	36
3.1	Реакції преципітації в розчині.....	36
3.1.1	Теорія решітки. Зони утворення решіток.....	37
3.1.2	Основні фактори, що впливають на утворення імунопреципітата.....	38
3.1.3	Копреципітація.....	39
3.2	Методи преципітації у розчинах.....	40
3.2.1	Вимірювання преципітації з розсіювання світла. Нефелометрія та турбодиметрія.....	40
3.3	Імунопреципітація в гелі.....	42
3.3.1	Основний принцип імунопреципітації у гелі.....	42
3.3.2	Фактори, що впливають на утворення імунопреципітатів у гелі.....	43
3.3.3	Методи імунодифузії в гелі.....	45
3.3.3.1	Одновимірна дифузія за Уоденом.....	45
3.3.4.2	Метод радіальної імунодифузії за Манчині.....	45
3.3.4.3	Метод подвійній радіальної імунодифузії за Оухтерлоні.....	47

3.4	Імуноелектрофорез. Види імуноелектрофорезу.....	49
3.4.1	Зональний електрофорез	49
3.4.2	Зональний імуноелектрофорез.....	51
3.4.3	Ракетний імуноелектрофорез.....	52
3.4.4	Електрофорез з імунофіксацією.....	52
4	Методи аглютинації. Активна та пасивна аглютинація. Клінічні застосування реакції аглютинації.....	54
4.1	Якісні аглютинаційні тести	55
4.2	Кількісні аглютинаційні тести. Пасивна гемаглютинація.....	56
4.2.1	Антиглобуліновий тест Кумбса (прямий).....	57
4.2.2	Непрямий тест Кумбса.....	58
4.3	Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА).....	59
4.4	Реакції пасивної, або непрямой, аглютинації.....	60
4.4.1	Реакція пасивної, або непрямой, гемаглютинації (РПГА, РНГА).....	60
4.5	Реакція зв'язування комплементу (РЗК).....	60
4.6	Реакція радіального гемолізу еритроцитів.....	62
5	Методи з використанням мічених антитіл або антигенів (кон'югатів).....	62
5.1	Радіоімунний аналіз (RIA), принцип. Варіанти RIA..	62
5.1.1	Методика RIA.....	63
5.1.2	Варіанти RIA.....	64
5.1.3	Оцінка результатів у RIA.....	64
5.1.3.1	Умови надійності результату RIA.....	64
5.1.3.2	Неспецифічні та специфічні фактори, що впливають на імунохімічну реакцію в RIA.....	65
5.1.3.3	Чутливість і специфічність RIA.....	65
5.1.3.4	Особливості застосування RIA в клініці.....	66
5.2	Імуноферментний аналіз.....	68
5.2.1	Загальні положення.....	68
5.2.2	Класифікація ІФА.....	69
5.2.3	Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА.....	70
5.2.3.1	Ферменти.....	70
5.2.3.2	Субстрати.....	71
5.2.3.3	Кон'югат.....	72
5.2.3.4	Тверда фаза.....	73
5.2.3.5	Формування імуносорбенту.....	73
5.2.3.6	Вимірювання ферментативної активності.....	73
5.2.3.7	Інтерпретація результатів ІФА.....	74
5.2.4	Основні принципи постановка твердофазного імуноферментного аналізу.....	74
5.2.4.1	Прямий ІФА для визначення антигенів.....	75
5.2.4.2	Непрямий ІФА для визначення антитіл. Основні етапи непрямого ІФА для визначення антитіл різних класів	76
5.2.4.3	Схеми ІФА для виявлення антигенів «Сендвіч» – варіант ІФА для виявлення антигенів. Основні етапи аналізу.....	79
5.2.4.4	Конкурентний ІФА.....	80
5.2.5	Методи визначення секреторної активності імунокомпетентних клітин. Метод імуноферментних плям (ELISPOT).....	80
5.2.6	Системи посилення сигналу в ІФА.....	83
5.2.6.1	Системи на основі взаємодії авідін-біотин АВС- та стрептавідин-біотин (SaBC-методи).....	83
5.2.6.2	Використання хемілюмінесцентних реакцій.....	85
5.2.7	Точковий твердофазний імуноферментний аналіз – dot-ELISA	86
5.2.8	Практичне застосування ІФА.....	90

5.3	Імунофлуоресцентний аналіз (ІФЛА). Основи. Типи ІФЛА. Використання.....	91
5.4	Проточна цитофлуориметрія.....	93
5.4.1	Основні компоненти проточного цитометру.....	94
5.4.2	Параметри, за якими проводиться імунофлуориметричний аналіз	94
5.4.3	Імунофенотипування клітин та визначення їхньої функціональної активності.....	95
5.4.4	Застосування проточної цитометрії	96
6.	Імунохроматографічний аналіз. Принцип, застосування.....	96
	Тестові питання	98
	Теми рефератів	110
	Питання до заліку	110
	Рекомендована література	115
	Еталони відповідей до тестових питань	117

ПЕРЕДМОВА

Мета курсу «Методи лабораторної (клінічної) імунології –ознайомити спеціалістів та магістрів зі спеціальності «біологія» з основами дослідження гуморальних і клітинних ланцюгів імунної системи з використанням методів імунного аналізу. Дати основні поняття та принципи імунного аналізу: антигени, антитіла, специфічність взаємодії антитіл з антигенами, утворення імунних комплексів; візуальні методи виявлення імунних комплексів (преципітація і аглютинація) і методи з мітками. Мітки в імунному аналізі – ізотопні, ферментні, флуоресцентні й відповідно радіоімунний, імуоферментний та імуофлуоресцентний аналіз, Метрологічні характеристики методів імунного аналізу, області застосування.

Завдання лабораторної імунології – оцінка імунного статусу людини при підозрі на наявність захворювання, обумовленого гіпо – або гіперреактивністю імунної системи; діагностика інфекційних захворювань бактеріальної, вірусної або грибкової етіології; діагностика алергій та аутоімунних захворювань; оцінка ефективності вакцинації та лікування.

Оцінка імунного статусу включає виконання лабораторією тестів спочатку першого рівня – скринінг – тестів, а потім, з урахуванням результатів тестів першого рівня й клінічної картини – тестів другого рівня або аналітичних.

Тести першого рівня (скринінг – тести) включають кількісну й візуальну морфологічну характеристику імунокомпетентних клітин крові в циркуляції.

Це лейкограма з обов'язковою кількісною характеристикою відносного й абсолютного вмісту її компонентів, описом особливостей морфології лейкоцитів.

У нейтрофілів характеризують стан гранулярного апарата, наявність або відсутність вакуолізації, токсичної зернистості, структуру ядра, наявність гіперсегментації. Окремо описують наявність або відсутність ознак активації клітин (розташовані окремо або прилипають друг до друга, до лімфоцитів, еритроцитів, чи не прилипають до них тромбоцити; у моноцитів – чи немає пінистої цитоплазми; у лімфоцитів – який розмір клітин переважає, характеристика ядра, ядерць, цитоплазми; обов'язково підраховується число ЕК клітин.

Оцінка функціонального стану нейтрофілів у тестах дослідження показників фагоцитарної та метаболічної активності (фагоцитарне число, фагоцитарний індекс, завершеність фагоцитозу, спонтанний та стимульований НСТ - тест).

Оцінка рівня комплементу за 50% гемолізом (CH₅₀).

Визначення вмісту основних класів імуноглобулінів у сироватці крові (IgM, IgG, IgA), визначення білкових фракцій сироватки крові з використанням електрофорезу.

Визначення білків гострої фази – ЦРБ, церулоплазмін.

Визначення вмісту В і Т лімфоцитів. Раніше використали метод розеткоутворення, зараз рекомендують визначення кластерів диференціровки CD19 і CD3 з моноклональними антитілами, які містять флуоресцентну мітку.

При відхиленні від нормального діапазону показників скринінгових тестів виконують тести другого рівня або аналітичні. Вони включають розгорнуте дослідження "слабкої" ланки, виявленої при скринінгу.

Для нейтрофілів (з урахуванням клініки) – це дослідження стадій фагоцитозу, дослідження стану метаболічних систем, визначення антитіл до ферментів нейтрофілів (МПО й ПК3); визначення активності ферментів гранулярного апарата.

В системі комплементу – визначення компонентів та факторів комплементу.

В системі лімфоцитів – визначення субпопуляцій Т і В лімфоцитів, визначення рівня цитокінів, стану сигнальних систем в імунокомпетентних клітинах.

Визначення аутоімунних антитіл:

органоспецифічних – захворювання щитоподібної залози, міастенія, синдром Гудпасчера, первинний біліарний цироз;

системних – ревматоїдний артрит, хронічні запальні захворювання сполучної тканини й суглобів.

Інфекційна патологія потребує виявлення збудника і його ідентифікацію: виявлення антигенів збудника за допомогою панелі антиген специфічних антитіл, визначення класу та титру антитіл до конкретного збудника.

Коло перерахованих завдань вирішується з використанням методів імунного аналізу.

1 Теоретичні основи імунного аналізу. Сучасний стан і перспективи розвитку імунного аналізу

1.1 Поняття імунного аналізу та фактори, що визначають його тип

Імунний аналіз (імуноаналіз) – це застосування реакції взаємодії антигену з антитілом для визначення концентрації одного з цих реагентів в розчині. При оцінці можливостей віднесення того чи іншого методу імуноаналізу до певного типу до уваги приймаються головним чином наступні фактори:

- 1) основний принцип;
- 2) характеристики використовуваних антитіл;
- 3) система поділу (може включати твердий носій для одного з реагентів);
- 5) тип мітки, що застосовується для контролю реакції зв'язування;
- 6) тип реакції і система детектування.

1.1.1 Групи імунного аналізу за основним принципом

Відповідно до принципів, що лежать в їхній основі, методи імуноаналізу можна підрозділити на три основні групи:

1) конкурентне зв'язування: при цьому достатньо однієї антигенної детермінанти на речовині, яка визначається, аналіз виконується в умовах обмежених кількостей реагенту;

2) неконкурентне зв'язування: на обумовленої речовині мають бути дві антигенні детермінанти, що не перекриваються, аналіз виконується в умовах надлишку реагенту;

3) нерівноважний режим: використовується одна антигенна детермінанта і суворо контрольований надлишок реагенту.

Перша група методів є звичайним конкурентним зв'язуванням у присутності обмеженої постійної кількості міченого антигену або специфічного антитіла, немічений реагент при цьому може бути пов'язаний з твердою підложкою.

По завершенні реакції кількість міченого реагенту, пов'язаного з твердою фазою, буде обернено пропорційно кількості визначуваної речовини у зразку. Метод забезпечує коефіцієнт варіації менше 10% в широкому (два-три порядки) діапазоні концентрацій.

Чутливість методики залежить як від помилок практичного характеру (точність відбору проби, антитіл, антигену і спосіб вимірювання сигналу), так і від афінності антитіл.

Другий тип методів відомий як "сандвіч"-аналіз. Методи цього типу застосовуються для визначення речовин з молекулярною масою більше 1000, що мають як мінімум дві антигенні детермінанти (епітопи). У цих методах надлишок антитіл, що зв'язують, прямо або опосередковано пов'язують з твердою фазою. Другі мічені антитіла проти іншого епітопа додають або одночасно при зв'язуванні з антитілами першого типу (одностадійний метод), або після завершення стадій зв'язування та відмивання (двостадійний метод). Після завершення імунологічної реакції кількість зв'язаної з твердою фазою речовини безпосередньо залежить від кількості визначуваної речовини в пробі. Аналітична система дозволяє визначати з'єднання в діапазоні концентрацій, що становить чотири – п'ять порядків, з коефіцієнтом варіації менше 5%.

Чутливість методики залежить від помилок при відборі проб, рівня фону і констант зв'язування антигену з антитілами.

Методи третього типу є граничним варіантом методів першого типу; їх називають одноцентровим імунометричним аналізом і використовують головним чином для визначення речовин з молекулярною масою менше 1000. У цих методах речовина, яка визначається, зв'язується зі строго певним надлишком мічених антитіл, або краще Fab-фрагментів, для забезпечення одноцентрового зв'язування. Далі в систему додають антиген або антиідіотипічні антитіла на твердому носії для виділення незв'язаних антитіл. Методи третього типу також називають нерівноважний імуноаналіз з контрольованим надлишком реагентів.

1.1.2 Стандарти препарати

Стандартні препарати – загальний термін для матеріалу, що використовується

- 1) для калібрування.
- 2) в якості антигенів на твердій фазі;
- 3) для отримання антитіл;
- 4) для прямого визначення мікроорганізмів і макромолекул;
- 5) для визначення виділених гаптенів;
- 6) для прямого визначення загальної кількості гаптенів або комплекс гаптен-білок носій.

1.1.3 Антитіла як реагенти імуноаналізу

Антитіла є одним з найбільш важливих реагентів при визначенні антигенів методом імуноаналізу.

Антитіла можуть бути

- 1) полі-або моноклональними;
- 2) різного типу (IgG або IgM) і підтипу (IgG1, IgG2a);
- 3) моно-, бі- або полівалентними;
- 4) моно-або біспецифічними;
- 5) антиалотиповими або антиідіотиповими;
- 6) нативними або отриманими хімічним або генно-інженерним шляхом;
- 7) міченими або пов'язаними тим або іншим способом з твердою фазою.

Поліклональні антисироватки (поліклональні антитіла) можуть містити до 10 000 різних типів молекул IgG. Навпаки, всі молекули моноклональних антитіл повинні бути ідентичними. Моноклональні антитіла переважно використовувати в методах конкурентного імуноаналізу, оскільки в цьому випадку можна стверджувати, що мічений або пов'язаний з твердою фазою антиген і речовина, що визначається, конкурують за один і той же центр зв'язування. Моноклональні антитіла дуже добре працюють в "сандвіч"-аналізі, оскільки, як правило, добре відома специфічність їх епітопів. Такі антитіла легко отримувати у великих кількостях і з високим ступенем чистоти. Більшість нативних антитіл бівалентні, і всі вони моноспецифічні.

Антитіла можуть бути міченими або пов'язаними з твердою фазою з допомогою пасивної адсорбції або за рахунок ковалентних зв'язків.

1.1.4 Гомогенні та гетерогенні методи. Носії у твердофазних методах

На ранніх етапах розвитку імуноаналізу перевага віддавалася рідиннофазним методам. В даний час найбільш поширені твердофазні методи, оскільки вони дозволяють істотно спростити проведення аналізу і зменшити фоновий сигнал.

Пропонувалися наступні типи носіїв:

- 1) трубки (наприклад, скляні, полістирольні, поліпропіленові);
- 2) гранули (наприклад, активованого полістиролу);
- 3) дрібні частки (наприклад, поліакриламід, целюлози, сефарози);
- 4) мікропланшети або смужки (наприклад, полістирольні);
- 5) діпстіки, картки, стрижні (наприклад, полістирольні);
- 6) електроди (наприклад, платинові, вуглецеві);
- 7) плівки або волокна (наприклад, скляні, кварцові).

Якщо система включає електрод, то її можна назвати біо- або імуносенсором.

1.1.5 Мітки, класифікація імуноаналізу за типом мітки

В якості міток для контролю реакції антиген - антитіло рекомендувалися:

- 1) частки (наприклад, еритроцити, латекси);
- 2) золі металів і барвників;

- 3) радіонукліди (наприклад, йод-125, тритій);
- 4) ферменти, субстрати, кофактори;
- 5) люмінофори (наприклад, похідні ізолюмінолу, ефіри акридину);
- 6) електрохімічні активні з'єднання.

Одні мітки переважніше при проведенні аналізів поза лабораторією, інші дають найкращі результати в високочутливих аналізах, чутливість яких залежить від питомої активності реагенту і відношення сигнал / шум. Тип мітки часто використовується поряд з основним принципом при опису та класифікації методів імуноаналізу (радіоімуноаналіз, імуно-радіометричний аналіз, імуноферментний аналіз, ферментативний імунометричний аналіз і т. д.). Крім того, в опису може бути зазначено і використання твердої фази, наприклад твердофазний імуноферментний аналіз ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

1.1.6 Методи визначення мічених сполук

Для визначення мічених сполук і комплексів можна застосовувати різні методи:

1) оптичні: фотометричні, включаючи нефелометричні (для мічених сполук і продуктів, хемілюмінесценції; вимір розсіювання та відбиття фотонів частинками в розчині і реагентами на поверхнях);

2) радіометричні

На завершальному етапі імуноаналізу величина сигналу від мітки може бути виражена у вигляді її загальної кількості або у вигляді концентрації. Крім того, величиною, яка безпосередньо визначається, може бути швидкість реакції.

1.1.7 Класифікація за способом здійснення аналізу

Крім того, методи імуноаналізу можна класифікувати за способом здійснення:

- 1) рідиннофазні та твердофазні,
- 2) ручні, напівавтоматичні або автоматичні,
- 3) з розділенням (гетерогенні) або без поділу (гомогенні),
- 4) з екстракцією або без екстракції.

Рідиннофазні або твердофазні методи можуть бути ручними, напівавтоматичними з частковою участю оператора або повністю автоматичними (після завершення операцій підготовки проби). Крім того, вони можуть включати або не включати стадію розділення вільного та зв'язаного з антитілами визначуваної речовини. Нарешті, досліджувану речовину можна визначати або після виділення, або безпосередньо у вихідному зразку. Частку не пов'язаних з білками (тобто здаються вільними) гаптенів можна оцінити безпосередньо.

1.2 Подальший розвиток методів імуноаналізу

Подальший розвиток методів імуноаналізу необхідний для вирішення наступних завдань:

- 1) розширення кола визначених з'єднань;
- 2) підвищення чутливості (наприклад, при визначенні вірусних та бактеріальних антигенів і пухлинних маркерів);
- 3) розширення робочого діапазону концентрацій (що дозволить обходитися без розбавлення проб);
- 4) скорочення часу проведення аналізу;
- 5) розвитку поза лабораторних й домашніх діагностиків;
- 6) розробки методів одночасного визначення декількох речовин або об'єктів, наприклад для оцінки гормональних і бактеріальних профілів;
- 7) виробництва реагентів і наборів з великим терміном зберігання в несприятливих умовах;
- 8) державної та міждержавної стандартизації.

2 Класифікація методів імуноаналізу за способом детекції утворених комплексів антиген-антитіло

Використання антитіл як універсального інструменту імуноаналізу засновано на специфічності взаємодії антиген-антитіла з формуванням імуних комплексів, а методи імуноаналізу розрізняються способом детекції утворених імуних комплексів.

Умовно методи лабораторної імунології можна поділити на 3 групи.

Перша група – прямі методи визначення реакції антиген-антитіло. Включають реакції преципітації та аглютинації.

Якщо антиген розчинний, можливо утворення імуних комплексів, які утворюють видимий осад, преципітат. Ця група методів зветься реакції преципітації. Вони можуть здійснюватися в розчині, на полімерній плівці або у гелі. У розчині преципітат визначають оком, лупою, за допомогою нефелометрії або турбодиметрії. При використанні гелю виявлення преципітатів можливо здійснювати оком, а після фарбування – оком та за допомогою денситометрії.

Якщо антиген нерозчинний, входить до складу клітин бактерій, найпростіших, еритроцитів або сорбований на еритроцитах та частках, то імунні комплекси утворюються на поверхні клітин бактерій, еритроцитів та часток, а антитіла в складі комплексів визначають утворення аглютинатів, які визначають оком. При використанні у якості носія антигену еритроцитів кажуть про реакції гемаглютинації, при використанні часток латексу говорять про латексаглютинацію. В основі як реакції аглютинації, так і преципітації лежить здатність антитіл і антигенів утворювати ґрати. Ґрати утворюються за умови зв'язування полівалентного антигену й двовалентного або полівалентного антитіла.

У взаємодії антигену й антитіла розрізняють три фази:

сенсibiliзація, утворення ґрат, виявлення комплексу.

Сенсibiliзація – зв'язування антигену й антитіла з утворенням невидимого комплексу; утворення ґрат – F(ab)₂-фрагменти антитіла зв'язується з антигенними детермінантами, розташованими на різних молекулах (частках) антигену й формують ґрати, видимі як преципітат або аглютинат.

Антитіла, що викликають аглютинацію, називають аглютиніни, а преципітацію – преципітині. Цими властивостями володіють IgM та IgG.

Друга група методів визначення реакції антиген-антитіла заснована на ідентифікації утворених імунних комплексів шляхом виявлення мітки, яку вводять в антиген або антитіла. Антитіла й антигени з мітками називають кон'югати. Мітки можуть бути ферментами – це імуоферментний аналіз, радіоактивними ізотопами – радіоімунний аналіз, флуорохромами – імуофлуоресцентний аналіз і проточна цитометрія, імуоелектронна мікроскопія. Мітять, як правило, вторинні антитіла.

Третя група заснована на використанні імуосенсорів. Принцип методів, заснованих на імуосенсорній технології, полягає в зміні фізико – хімічних властивостей мембрани або іншого носія антигену, що зв'язав антитіла. Зміна мембранного потенціалу, зміна оптичних або хімічних властивостей середовища, що прилягає до носія, виявляються за допомогою спеціального електрода або оптичного пристрою й виражається у вигляді електричного сигналу.

2.1 Властивості антигенів та антитіл

Імунологічний аналіз має у своїй основі специфічність та кількісні взаємодії антитіл з антигеном.

Відповідно до традиційних уявлень, антиген - це молекула, здатна викликати специфічний імунний відповідь, який має три форми: продукцію антитіл, розвиток реакцій клітинного імунітету і стан толерантності.

У більш широкому сенсі антигенами позначають суміші молекул, цілі мікроорганізми, клітини, що використовуються як тригер розвитку імунної відповіді, або полідетермінантні мішені для зв'язування антитіл в імунологічних тестах. Для того щоб розрізнити молекули, що індують утворення антитіл, або розвиток реакцій клітинного імунітету антиген називають імуногеном, а молекули, які є мішенями для зв'язування антитіл називають антигенами. Це допомагає розділення уявлень про імуногенні і антигенні властивості молекул, що проявляються в здатності зв'язування антитіл.

У таблиці 1 узагальнені дані про типи антигенів, їхнє походження та приклади.

Таблиця 1 – Класи антигенів та їхнє походження

Клас	Походження	Приклади	
		Приклади типів	Приклади специфічності
Природні	Рослини, бактерії, тварини	Корпускулярні (частки)	Клітини крові, бактерії, віруси
		Розчинні	Токсини, токсосоїди*, білки, вуглеводи, глікопротеїни, ліпопротеїди
Природні модифіковані	Хімічно модифіковані природні	Білки, що пов'язані з йодом, кон'югати білок-гаптен	
Синтетичні	Молекули, що синтезовані за допомогою хімії	Поліпептиди, поліамінокислоти, мультіланцюгові сополімери	
*токсоїд – токсин, у якого в результаті обробки втрачені токсичні властивості, але збережена імуногенність			

Екзогенні антигени, які можуть викликати захворювання в організмі господаря, називаються патогени. Патогени - вірусні, бактеріальні та паразитарні антигени. Автоантигени – антигени власних тканин господаря, індують імунну відповідь і викликають розвиток автоімунних захворювань. Антигени-алергени (наприклад, пилок), антигени, що викликають стан гіперреактивності в імунній відповіді, алергійні реакції.

Толерогени – антигени, що викликають стан толерантності, а не імунної відповіді. Прикладом природних толерогенів є антигени власних тканин господаря. Екзогенні антигени можуть бути толерогенами, якщо вони вводяться в організм реципієнта на ранній стадії його розвитку, тобто до на стадії неповного формування його імунної системи.

2.1.1 Антигени. Властивості антигенів як індукторів імунної відповіді. Валентність антигенів

Чужерідність та досить складна структура. Структури на антигені, які розпізнаються імунокомпетентними клітинами й антитілами, називають антигенні детермінанти. Структури антигенних детермінант, комплементарні паратопам антитіл називають епітопи.

Антигени, здатні індукувати імунну відповідь, характеризують

- 1) жорсткість структури,
- 2) досить висока м.м.,
- 3) здатність до процесингу в клітинах, що презентують антиген (АПК),
- 4) досить тривалий час персистування – час взаємодії з різними АПК,
- 5) специфічність – вона визначається структурою антигенних детермінант; у білків це 3 - 4 амінокислотних залишки, у вуглеводів – 5 - 6 залишків цукрів. Найбільшу значимість мають амінокислотні залишки N – і C – кінців та циклічних амінокислот.

Детермінанти, епітопи, валентність антигенів. Певні ділянки тривимірної структури імуногенів і антигенів називають детермінанти. Ці ділянки здатні взаємодіяти як зі специфічними рецепторами лімфоцитів, індуючи тим самим імунну відповідь, так і з антигензв'язуючими центрами специфічних антитіл (епітопи). Складні антигени мають безліч антигенних детермінант. Одна антигенна детермінанта може бути утворена залишками 4-6 амінокислот або цукрів. Детермінанти надзвичайно різноманітні за формою та розподілу зарядів, що визначає різноманітність реакцій гуморальної імунної відповіді, її поліклональність. Уважають, що одна детермінанта доводиться на м.м. білка 5000 дальтон.

Кількість антигенних детермінант (епітопів, сайтів) визначає валентність антигенів. Антигени можуть бути одновалентні (одно сайтові), двовалентні (двох сайтові), полівалентні.

При імунізації тварин полівалентними антигенами одержують спектр антиген специфічних поліклональних антитіл.

Однакові по амінокислотному складу й послідовності амінокислот, антигенні детермінанти можуть бути різноманітні за формою, розподілу заряду. Саме тому вони розпізнаються й зв'язуються різними В – лімфоцитами й визначають поліклональну імунну відповідь.

Гаптен – сполука, яка не володіє властивостями імуногену, але придбає їх при зв'язуванні з білками – носіями. Гаптени – одно сайтови.

Антиген – структура, що розпізнається імунною системою, як що антиген ініціює імунну відповідь його звать імуноген, а як що антиген блокує імунну відповідь – це толероген.

2.1.2 Антитіла. Природа та структура молекули антитіл

Антитіла належать до типу білкових молекул, які називають імуноглобуліни (Ig). В організмі людини це гетерогенна популяція, що складається з 5 класів або ізотипів. Кожен клас імуноглобуліну в цілому характеризується різними функціями, а також різними періодами напіврозпаду. Імуноглобуліни можуть бути знайдені в рідких секретах, або пов'язаними з поверхнею клітини, таких як В лімфоцити.

Основна структурна одиниця молекул антитіл – 4 мономерні ланцюга. До складу цих чотирьох ланцюгів входять два ідентичних важких (H) ланцюгів і два ідентичних легких (L) ланцюгів.

Кожний ланцюг містить N-кінець і C-кінець. N-кінці L-і H-ланцюгів є частиною варіабельного або «V» регіону, C-кінці - константного або «C» регіону. Таким чином, як в легких так і в тяжких ланцюгах є варіабельні і константні регіони, які позначаються як V_L і C_L , V_H і C_H відповідно. У легких ланцюгах два регіонів (домени): варіабельний і константний. C_H регіон ділиться на три області (домени), які позначаються C_{H1} , C_{H2} і C_{H3} . Частина молекули антитіла, яка пов'язує антиген, розташована у варіабельних регіонах легких та важких ланцюгів. Між C_{H1} , C_{H2} розташована петля або шарнірна ділянка. Регіон петлі формується з двох важких ланцюгів. Шарнірна ділянка забезпечує гнучку структуру антитіл. Під дією папаїну молекула імуноглобулінів на рівні шарнірної ділянки розщеплюється на два фрагменти – фрагмент, що зв'язує антиген $F(ab)_2$ та Fc-фрагмент.

Послідовність амінокислот у константних регіонах антитіл генетично детермінована й завжди постійна для даної тварини або людини, вона визначає видову специфічність антитіл. Розрізняють 5 константних структур важких ланцюгів антитіл, назва яких визначила назву класу імуноглобулінів: μ – IgM, γ – IgG, α – IgA, ϵ – IgE, δ – IgD. Варіанти в структурі відповідних важких ланцюгів визначають підкласи імуноглобулінів. Їх 4 в IgG (IgG1, Ig2, Ig3, Ig4) і 2 в IgA (IgA1, IgA2)[]

Константна ділянка антитіл, називана Fc-фрагментом, відіграє важливу роль у виконанні ефекторних функцій імуноглобулінів: зв'язування з комплементарними до Fc-фрагмента рецепторами мембран нейтрофілів і моноцитів, В – лімфоцитів, рецепторами на плаценті, що забезпечує проходження материнських імуноглобулінів до плода, тобто Fc-фрагмент забезпечує взаємодію антитіл з іншими компонентами імунної системи.

Унікальною особливістю антитіл є їхня здатність вибірково, специфічно взаємодіяти з антигеном, що індукував їхній синтез. Здатністю до зв'язування з антигеном володіють тільки варіабельні домени молекули імуноглобуліну.

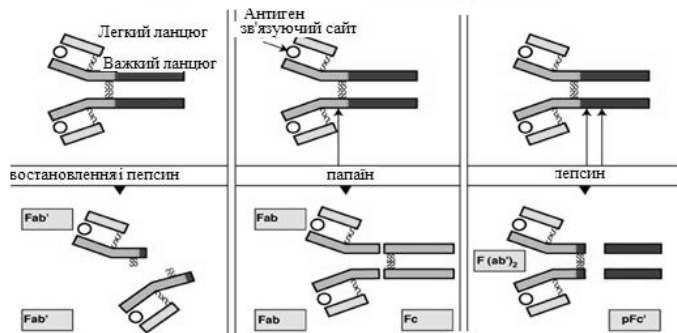


Рис – 1 – Загальна структура імуноглобулінів

Ці ділянки називають антигензв'язуючі сайти або Fab-фрагменти. Fab-фрагмент антитіл зв'язується з епітопом. При зв'язуванні антитіла з антигеном відбуваються значні конформаційні зміни всієї молекули імуноглобуліну, особливо в його константній ділянці – Fc-фрагменті (рис.1)[] Конформаційні зміни Fc-фрагменту є сигналом і необхідною умовою для приєднання до нього компонентів комплементу.

Специфічність антитіл до антигену є головним чинником, що забезпечує безпеку організму від дії комплементу на свої власні структури, а у випадку аутоімунних захворювань – це пусковий елемент руйнування власних тканин і клітин.

Таким чином, варіабельні домени антитіл антигенспецифічні і забезпечують розпізнавання та зв'язування антигену, що індукував їхній синтез, константні домени забезпечують зв'язок з гуморальними та клітинними ланками імунної системи. Сигналом для підключення цих ланок є зміна конформації Fc-фрагмента антитіл, що утворили комплекс з антигеном.

Що розпізнають антитіла? Структури на поверхні вірусів, бактерій, грибів та інше. Ці поверхні структури (епітопи) можуть бути: білками, нуклеїновими кислотами, ліпідами, сахарами, деякими амінокислотами, фосфатними групами, метильними групами та їхніми комбінаціями. Антитіла – інструмент №1 в імунному аналізі!

2.1.2.1 Валентність антитіл

Здатність антитіла зв'язувати кількість специфічних антигенних детермінант визначає валентність антитіла. Валентність антитіл визначається числом Fab фрагментів. IgG та IgE – 2 - х валентні; IgM – 10; IgA слизових – 4 - х валентні.

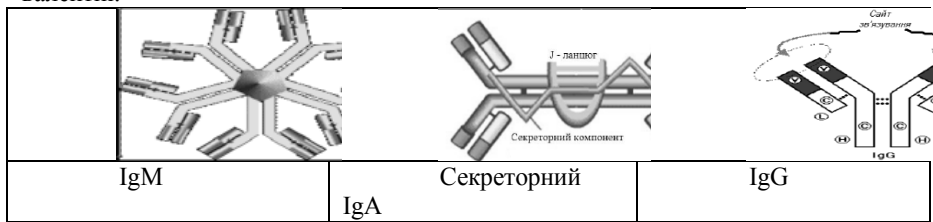


Рис. 2. – Валентність основних класів імуноглобулінів

2.1.2.2 Афіність і авідність антитіл

Утворення імунного комплексу антиген-антитіло забезпечується просторовою компліментарністю антигенної детермінанти й антиген зв'язуючого центра антитіл (ключ-замок) та нековалентними взаємодіями між ними. Сила зв'язків антигенної детермінанти (епітопу) з антигензв'язуючим центром антитіл (паратопом) характеризує афіність антитіл. За високу афіність у разі антитіл вважають $10^{12}/M$, низькою – $10^5/M$. Загальну силу (енергію) нековалентних зв'язків між антигензв'язуючими сайтами антитіл і антигенними детермінантами антигену називають авідність. Термін афіність відноситься до зв'язування антитіла з моновалентним гаптенем або з однією антигенною детермінантою. У більшості випадків, однак, ми маємо справу із взаємодією з антигеном антисироватки, тобто сироватки імунізованої тварини або людини. У цьому випадку антисироватки взаємодіють з полівалентним антигеном. Для опису такого зв'язування використовують термін "авідність".

Оскільки гетерогенна популяція антитіл має різну афіність по відношенню до певної антигенної детермінанти, то результуюча константа асоціації представляє собою усереднене значення. У зв'язку з цим неможливо оцінити Афіність сироватки, що володіє поліспецифічністю, тобто специфічною по відношенню до безлічі детермінант одного антигену. Такі сироватки порівнюють оду з одною по їх сумарним характеристикам зв'язування з антигеном – за загальною силою реакції в обраній тест-системі, що позначається як авідність. Авідність – строго функціональний термін, який описує поведінку антитіл (сироватки) у конкретній реакції.

Авідність визначається багатьма факторами, зокрема, гетерогенністю антитіл в цієї сироватці, спрямованих до певної антигенної детермінанти, а також гетерогенністю самих детермінант. Необхідно враховувати і таку обставину. Полівалентність більшості антигенів призводить до своєрідного ефекту, що "підсилює": величезне зростання константи рівноваги, що виникає через те, що складові афільності не складаються, а перемножуються, і забезпечує цей підсилюючий ефект. Саме авідність характеризує імунну відповідь *in vivo* і служить мірою функціональної афільності антисироватки до природного полівалентного антигену. Висока авідність має перевагу перед низькою для здійснення багатьох реакцій. Математично ця величина характеризується як константа асоціації (K_a), що розраховується в стані рівноваги між концентрацією імунного комплексу й концентрацією антитіла й антигену.

Приклад: IgM, як правило, має більш низьку Афіність, чим IgG, але IgM високоавідний пентамер, 10- валентний, тому він більш ефективно зв'язує антиген.

2.1.2.3 Специфічність антитіл

Специфічність антитіл – це показник того, наскільки вибірково вони взаємодіють з молекулами антигенів певного типу. Специфічність поліклональних антитіл визначається сукупністю специфічних взаємодій з численними антигенними детермінантами, які можуть бути або не бути унікальними, тобто притаманними тільки молекулам певної речовини.

Кожна молекула антитіла специфічна до тієї антигенної детермінанти, з якою вона зв'язується, це уявлення про специфічність в найбільш вузькому сенсі. Специфічність антитіл до антигену визначається тим, що його детермінанти відбирали відповідні В лімфоцити з комплементарними антигензв'язуючими центрами на мембранних імуноглобулінах (рис.3)

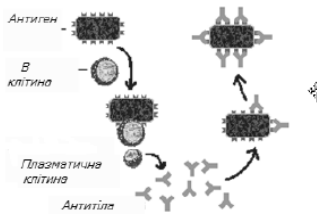


Рис.3 – Антиген визначає В клітинну імунну відповідь

На відміну від цього специфічність антисироватки визначається безліччю специфічностей антитіл, які вона містить. Антисироватки зв'язується з одним певним антигеном тільки в тому випадку, якщо сукупність специфічностей антигензв'язуючих центрів антитіл у сироватці спрямована на детермінанти тільки цього антигену. Однак, як правило, деякі детермінанти є спільними для декількох антигенів (одні й ті ж білки близьких видів тварин). У цьому випадку деякі з антитіл, що утворюються у відповідь на стимуляцію даними антигеном, можуть зв'язуватися і з іншими антигенами. Такі антитіла називають перехресно-реагуючими, а сироватку, що містить їх, неспецифічною, перехресно-реагуючою. Специфічність такої сироватки можна підвищити шляхом очищення на сорбенті. Процес очищення називають виснаженням сироватки. В процесі очищення перехресно-реагуючі антитіла відділяють шляхом контакту з антигенами, які містять антигенні детермінанти спільні з індукують антигеном і знаходяться на імуносорбенті (нерозчинна форма антигенів на сорбенті).

2.1.2.4 Одержання антитіл. Поліспецифічні та моноспецифічні сироватки. Перехресно-реагуючі антитіла

Антитіла одержують шляхом імунізації тварин, з наступним відділенням сироватки крові й називають антисироватками. Специфічність антисироватки визначається безліччю специфічностей утворюючих її антитіл і здатністю до зв'язування з антигеном. Тому їх називають поліклональними.

Можливі наступні варіанти зв'язування антитіл сироватки з антигеном. Всі антигензв'язуючі центри антитіл взаємодіють тільки з одним антигеном, його детермінантами. Такі сироватки називають моноспецифічними.

При імунізації тварин навіть добре очищеним антигеном отримують поліспецифічні, перехресно-реагуючі сироватки.

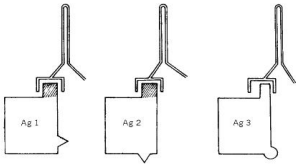


Рис. 4. – Перехресні реакції антитіл

Поняття перехресної реакції може бути застосовано й до антигену. Перехресно-реагуючий антиген – той антиген, котрий зв'язується з антитілами, утворення яких було індуковано іншим антигеном, що володіють із цим антигеном загальними антигенними детермінантами.

2.1.2.5 Властивості поліклональних антисироваток

Поліклональна антисироватка – це сироватка імунізованої тварини – кролика, кози, барана й т.д.

Рис. 5. – Антигенні детермінанти та поліклональна сироватка.



Відповідно до рис. 5 поліклональна сироватка походить від численних клонів антитіла-продукуючих клітин і може мати кілька різної специфічності двовалентних антитіл (анти-A1, анти-A2, анти-A3, анти-A4, анти-B1 анти-D3), що здатні реагувати з кожною детермінантою (A, B, C, D) на одному рідному антигені (Ag), що зображений в центрі. Детермінанти A, B, C розташовані на поверхні полівалентного глобулярного нативного білка. Внутрішня детермінанта D може бути похована у середині ядра нативного білка, і антитіла реагують з цією латентною детермінантою тільки тоді, коли антиген знаходиться в денатурованому стану. Кожна тварина, яка імунізована антигеном, може виробляти антитіла до деяких або всіх з цих визначальних детермінант.

Поліклональна сироватка тому, що антиген, яким імунізували тварину, був полідетермінантним (A, B, C, D, рис.5). Вона містить антитіла неоднакової специфічності стосовно його детермінантів (епітопів). Основна перевага цих сироваток – здатність до утворення великих нерозчинних імунних комплексів з антигеном, преципітаті, аглютинації клітин, у мембранах яких є антиген. Такі реакції зручно спостерігати й нефелометризувати. Основні обмеження у використанні поліклональних антисироваток: гетерогенність по специфічності навіть при взаємодії з антигеном невеликої м.м.; не стандартність, яка обумовлена необхідністю імунізації декількох тварин і в різний термін. В утворенні таких антисироваток брали участь численні клітинні клони, тому поліспецифічні сироватки різні по класу, підкласу й афінності.

З поліспецифічних сироваток можна приготувати:

- поліспецифічні до безлічі окремих антигенів;
- олігоспецифічні – специфічні до невеликого числа окремих антигенів;
- моноспецифічні – специфічні до одного єдиного антигену.

В останньому випадку вони теж поліспецифічні – специфічні до різних антигенних детермінантів одного антигену.

Крім того, у ході гуморальної імунної відповіді на індивідуальну антигенну детермінанту антитіла продукуються численними клітинними клонами; тому за той самий епітоп можуть конкурувати антитіла з різною афінністю.

Практичне значення подібної гетерогенності однієї сироватки або різних сироваток полягає в тому, що кожна сироватка унікальна по складу антитіл, оптимальним умовам зв'язування з антигеном, поведженню в імунологічних реакціях.

Ця обставина ставить за обов'язок щораз приймати рішення відносно придатності наявної сироватки для конкретного імунологічного тесту.

2.1.2.6 Загальна схема імунізації тварин

У цей час відома безліч методів імунізації різних видів тварин. Науково-дослідні лабораторії одержують антитіла самостійно для конкретних методів.

Загальна схема одержання моноспецифічних антитіл з високим титром включає імунізацію кроликів дуже малими кількостями високо очищених антигенів, порядку 25 мкг/кг живої ваги. У такий спосіб виключається вплив будь – яких можливих домішок в антигені на утворення антитіл, і в той же час зазначена доза досить велика для одержання антитіл з високим титром.

Одержати антитіла до одного білка можна в такий спосіб: готують розчин з концентрацією 2 - 4 мг/мл. На 0 – й, 14 – й, 28 – й і 42 – й день кроликові вагою 3 – 4 кг вводять стандартну суміш 50 мкл і 50 мкл неповного ад'юванта Фрейнда. Ад'ювант забезпечує помірне поглинання антигену та неспецифічну стимуляцію імунної системи (активацію макрофагів). Ін'єкцію роблять у стовщену ділянку шкіри над лопаткою, максимально ближче до поверхні. На 50 – й день відбирають 45 мл крові з вушної вени. Через кожні 6 тижнів беруть чергову порцію 45 мл крові, причому тварині вводять стандартну суміш антигену за 8 – 10 днів до відбору крові. Така схема відбору крові не приводить до анемії й захворювання тварин. Тварина може використатися кілька років.

Ін'єкції в подушечки лапок тварин приносять їм непотрібні страждання!

Для одержання поліспецифічної сироватки дозу збільшують приблизно в 10 разів. Для збільшення титру антитіл реімунізацію проводять через кожні 14 днів, 4 ін'єкції.

Здатність продукувати антитіла в кожного кролика різко індивідуальна, і разом з тим титр антитіл у кожної окремої тварини може змінюватися від одного забору крові до іншого. Якщо при імунізації тварин досягнутий певний рівень антитіл, один – два забору крові без попередньої імунізації звичайно приводить лише до незначного зниження середнього титру антитіл.

2.1.2.7 Динаміка синтезу антитіл. Первинна та вторинна імунна відповідь

Перше введення антигену супроводжується прихованим або латентним періодом, протягом якого антитіла не виявляються впродовж 2 – 4 днів. Потім слідує первинна імунна відповідь, яку характеризує:

- поступове підвищення в плазмі крові антитіла протягом від декількох днів до декількох тижнів;
- концентрація специфічних антитіл досягає плато і протягом наступних тижнів зменшується до дуже низького або невизначені рівня;

–спочатку синтезуються IgM антитіла, їх синтез триває 10-12 днів, 4-5 днів слідує IgG відповідь із синтезом великої кількості IgG антитіл;

–у відсутність антигенної стимуляції IgM антитіла зникають, синтез IgG антитіл може здійснюватися протягом кількох місяців.

Після первинної відповіді слідує фаза формування імунологічної пам'яті, що виявляється посиленням імунної відповіді на повторне введення антигену.

Вторинну імунну відповідь характеризують

- короткий латентний період;
- швидкий синтез і більш високі концентрації антитіл;
- у відповідь на повторний контакт з тим же антигеном синтезується мінімум IgM та високий рівень IgG антитіл;
- включається імунологічна пам'ять.

2.1.2.8 Виділення окремих класів імуноглобулінів

У багатьох випадках робота з виділеними імуноглобулінами має переваги в порівнянні з використанням нативної сироватки. Так, в імунологічних дослідженнях з фарбуванням імунопреципітатів після завершення реакції антиген-антитіло необхідно повне видалення сторонніх білків шляхом відмивання. Відмивання спрощується, якщо застосовувати чисті імуноглобуліни замість сироваток. Ліпопротеїди особливо підсилюють фарбування фону.

Абсолютно необхідно працювати з імуноглобуліновою фракцією антисироватки у випадку одержання кон'югатів антитіл з ферментами та флуорохромами.

Отримання IgM: преципітація фракції імуноглобулінів хімічними методами, що засновані на м.м. та розчинності

- еуглобулінова преципітація,
- подальше очищення за допомогою гель хроматографії,
- центрифугування у градієнті щільності.

Отримання IgG: іонообмінна хроматографія, афінна хроматографія з використання білків A та G (Staph. Aureus – протеїн A, Streptococcus – протеїн G).

Отримання IgA, IgD, IgE – багатостадійні методи.

IgA: преципітація Zn, іонообмінна хроматографія й гель фільтрація.

IgE – афінна хроматографія; імуносорбентні методи: антиген специфічно ізолюється на поверхні сефарози, целюлозі або поліакриламідного гелю.

2.1.2.9 Визначення титру антитіл

Титр антитіл є їхньою істотною характеристикою. Він являє собою максимальну кількість антигену, яку можна осадити 1 мл антитіл.

Метод кількісного осадження. Титрування роблять додаванням концентрацій антигену, що збільшуються, в серію пробірок, що містять однакову кількість антитіл. Обсяг кожної пробірки доводять до постійного додаванням фізіологічного розчину.

Після годинної інкубації при 37⁰C пробірки поміщають у холодильник на 48 годин, можна довше, причому вміст пробірок двічі в день перемішують, щоб досягти повноти реакції антиген-антитіло. Кількість білка, що преципітує, еквівалентно зменшенню змісту білка в рідині. Зміст білка в рідині визначають із реактивом Фоліна. Титр антитіл розраховують по кількості антитіл у пробірці, що містить найбільшу кількість преципітату.

Крім методів кількісного осадження визначення титру антитіл здійснюють з використанням реакцій аглютинації, радіальної імунодифузії, ракетного імуоелектрофорезу, методів з використанням мітки, тобто за допомогою тих методів, в яких конкретні антитіла будуть використані.

2.1.2.10 Загальні принципи роботи з антитілами

Антитіла – білки й повинні зберігатися на льоді або замороженими, якщо вони не використовуються.

Антитіла працюють краще одразу після розведення. Тому головувати розведення антитіл варто перед використанням. При повтореному заморожуванні й розморожуванні антитіла втрачають активність. Розморожені один раз розчини антитіл варто зберігати при 4⁰C.

Якщо лабораторія одержує антитіла замороженими, їх необхідно помістити на лід, якщо у вигляді розчину – їх негайно поміщають на лід. При розморожуванні антитіл на пробірці вказується дата розморожування.

Центрифугувати розчин антитіл необхідно обережно в мікроцентрифузі.

Антитіла втрачають стійкість пропорційно їхньому розведенню. Тому антитіла зберігають у концентрованому виді, без розведення.

Як правило, на пробу використовують 10 – 50 μ l. Тільки при більших розведеннях використовують більші обсяги.

Маркувати пробірки необхідно з точною вказівкою розведення антитіл і дати готування розведення.

2.1.2.11 Моноклональні антитіла. Гуманізовані моноклональні антитіла

Моноклональні антитіла – гомогенні антитіла, що продукують гібридні клітини, в яких поєднуються здатність синтезу специфічних імуноглобулінів одного ізотипу з необмеженою проліферацією. таких гібридних клітин, інакше званих гібридома. У загальних рисах методика отримання моноклональних антитіл полягає в тому, що лімфоцити імунізованої тварини, наприклад, миші, гібридизуються з пухлинними клітинами, що культивуються у середовищі, на

приклад мишачими мієлобластами. В процесі пасажів гібридом вдається проводити відбір клонів, які синтезують антитіла зі специфічністю, що яка цікавить дослідника.

Головною перевагою моноклональних антитіл є стандартна і відтворна в пасажах специфічність відносно конкретного епітопа, оскільки кожен з відібраних клонів містить генний набір одного імунного лімфоцита, тоді як звичайні сироватки від імунізованих тварин являють собою суміш східних, але не ідентичних антитіл, які продукуються безліччю лімфоцитів. Антитіла, отримані при імунізації тварин на відміну від моноклональних, позначаються як поліклональні. Моноклональні антитіла однорідні не тільки по своїй специфічності, але і по всіх інших біологічних властивостях, як-то авідності, афінності, стабільності і т. п. Нарешті, гібридомна технологія дозволяє виготовляти практично необмежені кількості гомогенних антитіл до різноманітних антигенів, тобто препаратів діагностичного, виробничого або лікувального призначення. Моноклональні антитіла знайшли широке застосування у практиці імунного аналізу. З їх допомогою стало можливим підвищити чутливість і відтворюваність діагностичних тестів.

Взагалі моноклональні антитіла використовують для

- отримання очищених білків,
- ідентифікації та ізолювання субпопуляцій та клонів лімфоцитів,
- рутинної лабораторної техніці – серології,
- виявлення пухлин, у діагностичних цілях,
- терапії клітин-мішеней пухлин.

Таким чином, моноклональні антитіла мають такі основні переваги перед поліклональними:

- повна стандартизація препарату антитіл;
- висока специфічність;
- вільний вибір антигенних детермінант, до яких утворюються антитіла.

Разом з тим, у деяких схемах імуноаналізу застосування поліклональних антитіл (у комбінації з моноклональними) дозволяє досягти кращих результатів. Це обумовлено здатністю поліклональних антитіл пов'язувати не одну, а практично всі наявні на молекулі визначуваної речовини антигенні детермінанти. У діагностичних тест-системах, як ти що розпізнають, а також у пасткових, застосовуються антитіла класу IgG. Причинами цього є наступні обставини:

- вміст IgG у сироватці значно більше, ніж імуноглобулінів інших класів, що важливо при отриманні поліклональних антитіл;
- молекула IgG представлена мономером, який має більшу мобільність, ніж димер або пентамер;
- Fc-фрагмент молекули IgG може бути в свою чергу пов'язаний, наприклад, з білком А, що використовується в деяких схемах імуноаналізу.

Для терапевтичних цілей моноклональні антитіла гуманізують для зменшення імуногенності.

Отримання людських антитіл і антитіл частково людського походження стало можливим після клонування генів імуноглобулінів і розробки генно-інженерних методів. Константні і варіабельні регіони антитіл незалежно кодуються безліччю генетичних сегментів. Генно-інженерні технології дозволяють створювати гібридні антитіла миша/людина, що розрізняються ступенем «гуманізації». Найбільш ранньою версією таких гібридних антитіл є химерні антитіла. У химерних антитіл константні регіони мають людське походження, а варіабельні отримані від миші. Типовий приклад химерного антитіла - ритуксимабу. Друге покоління гібридних антитіл - гуманізовані антитіла, в яких мишаче походження мають тільки невеликі антигензв'язуючі ділянки варіабельних регіонів. Як у химерних, так і в гуманізованих антитіл ділянки, що безпосередньо зв'язують антиген, отримували від імунізованих тварин. В останнє десятиліття розроблені способи конструкції повністю людських антитіл, минаючи етап імунізації людини.

Моноклональні антитіла – ідеальний діагностичний засіб проти білків крові й тканин, проти специфічних антигенів збудників, органів і тканин нормальних і ракових клітин, ряду хімічних сполук.

2.1.2.12 Антитіла як антигени. Вторинні антитіла Вторинні антитіла

Видові особливості антитіл дозволяють використати їх як антигени при імунізації тварин. Використання антитіл при імунізації як антигенів призводить до утворення в організмі імунізованої тварини або людини "анти-антитіл" – вторинних антитіл, антиглобулінів. Наприклад, імуноглобуліни людини є антигенами для миші і викликають вироблення антиімуноглобулінових антитіл. Препарати таких антитіл мають назву мишачих антитіл проти імуноглобулінів людини. Необхідно відзначити, що проти імуноглобулінів різних класів утворюються антитіла різної специфічності. Наприклад, антитіла проти IgG людини не розпізнають IgM, і навпаки. Так звані антивидові антитіла використовуються в імуноаналітичних методах для визначення в крові людини специфічних антитіл, наприклад, до інфекційних патогенів. Частина антивидових антитіл буде специфічна до Fab-фрагментів вихідного антитіла, частина до Fc-фрагмента. Fab ділянки таких "анти-антитіл" будуть мати серологічні ознаки антитіл тієї тварини, що були використані для одержання вихідних (первинних) антитіл. "Анти-антитіла", що мають на своїх Fab-фрагментах імунологічні ознаки антигену, який був використаний для одержання специфічних до нього первинних антитіл, називають антиідіотипичними антитілами

2.2 Вибір методів імуноаналізу за участю антитіл

Неодмінною умовою використання антитіл є оцінка сироватки: специфічності, титру і параметрів зв'язування в тих тест-системах, в яких вони будуть використані.

2.2.1 Загальна характеристика реакції антиген-антитіло. Фактори, що впливають на прояв реакцій антиген-антитіло

Взаємодія антитіл з антигеном, антигенні детермінанти якого індукували їхній синтез, здійснюється за рахунок компліментарності поверхні епітопів антигену та паратопів антитіл. Стабільність утворених комплексів антиген-антитіла забезпечується нековалентними зв'язками між епітопом та паратопом. Це водневі, електростатичні, сили Ван-дер-Ваальса і гідрофобні з в'язкі. Множинні зв'язки між антигеном і антитілом гарантують, що антиген буде туго з пов'язане з антитілом.

Єдине свідчення реакції антигену й антитіла – це утворення імунного комплексу антиген-антитіло. Утворення комплексу залежить від безлічі факторів у тому числі:

- концентрації реагентів,
- температури,
- тривалості інкубації,
- рН тест-системи,
- афінності – чим вона вище, тим більше шансів утворення й стійкості комплексу,
- авідності – полівалентні комплекси стійкі,
- співвідношення антиген/антитіло, воно визначає розмір комплексів – великі комплекси формуються при високих концентраціях антигену й антитіла,
- фізичного стану антигену й антитіла: корпускулярні антигени при зв'язуванні антитілами аглютинують, розчинні полівалентні антигени при зв'язуванні антитіла преципітують.

У сучасному біоаналізі використовують три класи антитіл: поліклональні, моноклональні та модифіковані (гуманізовані) рекомбінантні антитіла.

2.2.2 Феномени перебігу реакції антиген-антитіло та методи їхнього дослідження

Перебіг реакції антиген-антитіло супроводжується проявом наступних феноменів.

1. Первинний феномен (сенсibiliзація).

Його суть: поєднання антиген специфічних сайтів антитіл з відповідними детермінантами на антигені.

Тести для виявлення цієї реакції є технічно важким, складним, дорогими, потребують спеціального обладнання і витрат часу. Це методи засновані на використанні міток: імунофлуоресцентного, радіоімунного та імуноферментного аналізів.

2. Вторинний феномен.

Поєднані антиген-антитіла утворюють перехресні зв'язки, формують решітки, створюють великі комплекси, які легко виявляються.

Методи, які використовуються для виявлення цих реакцій швидкі, їх легко виконати, вони дешеві, потребують менше витрат часу і звичайно не вимагають спеціального устаткування.

Ці методи є менш специфічними, менш чутливими і мають більше перешкод. Методи, що використовуються для виявлення такого роду реакцій включають преципітацію, аглютинацію і реакцію зв'язування комплементу.

3. Третинний феномен.

Реакції антиген-антитіло не видно, але згодом виявляється її вплив на реакцію тканини або клітин. Ці типи реакцій включають: запалення, фагоцитоз, відкладення імунних комплексів, імунні прилипання, а також хемотаксис.

Вторинний феномен є методом вибору для багатьох серологічних тестів при виявленні *in vitro* наявності антигену або антитіл.

Преципітація припускає можливість сполучення розчинних антитіл з розчинним антигеном з утворенням нерозчинних комплексів.

Аглютинація це процес, в якому корпускулярні антигени (клітини, частки) у присутності специфічних антитіл агрегують з утворенням великих, видимих агрегатів.

Фіксація комплементу. Завдяки зв'язування антигену специфічними антитілами й утворення комплексу антиген-антитіло Gc-фрагменти антитіл у складі комплексів здатні зв'язувати C1q субодиницю C1 компонента комплементу і запустити класичний шлях активації системи комплементу.

2.3 Фактори, що визначають можливість реакції зв'язування антиген-антитіла

Зв'язок антигену і антитіл визначають насамперед дві характеристики антитіл – їхня афінність та авідність.

1. Афінність є первісною силою тяжіння антигензв'язуючого сайту антитіл до конкретних епітопів антигену або його детермінантам. При зближенні антигену і антитіл формуються слабкі хімічні зв'язки і комплекс може дисоціювати. Гарна просторова комплементарність антитіл та антигену буде визначати стабільність зв'язку.

Антитіла можуть реагувати з антигенами, які структурно схожі на оригінал антигену і приводити до перехресної реактивності, чим більше схожості оригінальному антигену, тим сильніше реакція. Чим більше подібність антигену і антитіл з ідеальним замком (ключ-замок), тим більше афінність.

2. Авідність є сумою всіх сил тяжіння між антигеном і антитілом. Це сила, яка стабілізує реакцію антиген-антитіло, утримуючи молекули разом. Чим сильніше хімічні зв'язки, які формуються між антигеном і антитілом, тим менша ймовірність того, що реакція буде оборотною.

3. Закон діючих мас регулює оборотності реакції антиген-антитіло.

Вільні антиген і антитіла знаходяться в рівновазі з пов'язаними. Константа рівноваги відображає швидкість утворення комплексу антиген-антитіла та його дисоціацію. Афінність прямо впливає на швидкість реакції утворення комплексу, а авідність оборотно визначає швидкість його дисоціації.

3 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.

3.1 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 пробірочку 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 "-".

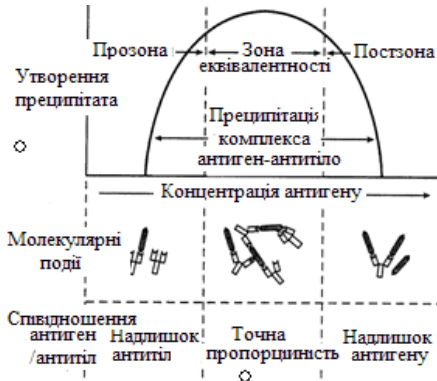


Рис. 6. – Крива преципітації реакції антиген-антитіло.

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.

3.1.1 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 як що

-антиген полівалентний (містить мінімум два ідентичних епітопа);

-перехресно реагує зі специфічними антитілами, які містять два й більше антигензв'язуючих сайти;

-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 імунопреципітата

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.

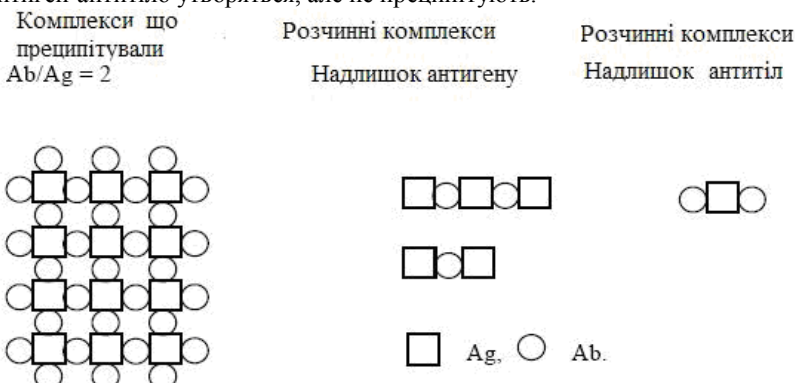


Рис.7. - Схема утворення решіток полівалентним антигеном і двохвалентними антитілами

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.

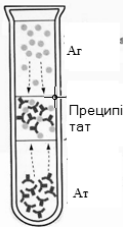
3.1.3 Копреципітація

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 імунопреципітата. Мічений антигену утягується в преципітат, копреципітує.

3.2 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 контролями сироватки та антигену.

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

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

3.2.1 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, C3, C4, 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), C3, 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 антитілу у процес зв'язування не утягаються.

Чутливість: 0,5 – 1 мкг/мл.

3.3 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 10^6). Коли полідетермінантний складний антиген переміщується в зону, яка містить антитіла, то при оптимальному співвідношенні концентрацій антигену і антитілу 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.

3.3.1 Основний принцип імунопреципітації у гелі

У товщі гелю, через його осередки у водній фазі легко дифундують молекули антигенів й антитілу 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-антитілу 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 антитілу 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 антитілу утворюються смуги преципітації в зоні їх оптимального співвідношення зветь імунодифузія.

3.3.2 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 антитілу, 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 антитілу, з'являється можливість перехреста градієнтів і формування смуги преципітації там, де концентрації пари антиген-антитілу еквівалентні.

У суміші антигенів і антитілу смуги преципітації утворюються кожною парою. Якщо в системі концентрація антигену = концентрації антитілу, то при інкубації лінія преципітації не міняє положення й згодом її інтенсивність наростає. Якщо концентрація антигену \gg концентрації антитілу 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 антитілу;
- напрямок та швидкість дифузії антигену та антитілу;
- 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 антитілу.

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 послаблюють взаємодію антиген-антитілу. 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.

Подвосня 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.

3.3.3 Методи імунодифузії в гелі

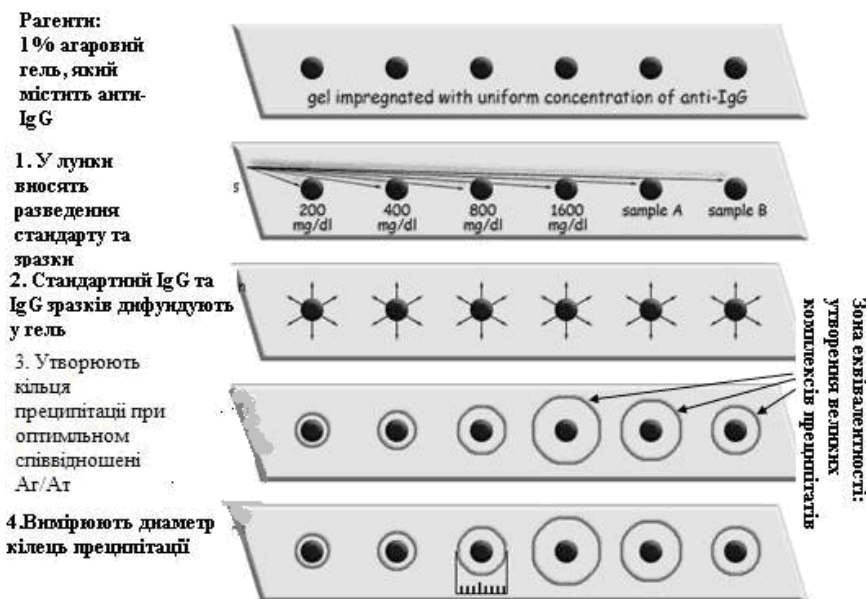
3.3.3.1 Одновимірна дифузія за Уоденом

Антитіла додаються в гель агарози, що поміщений в пробірку, розчин антигену нашарується 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.

3.3.4.2 Метод радіальної імунодифузії за Манчіні

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 зображена на рис. 9.



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 шораз при визначенні антигену, що визначається, у мг/мл,

Рис. 9 Схема визначення вмісту IgG за Манчіні

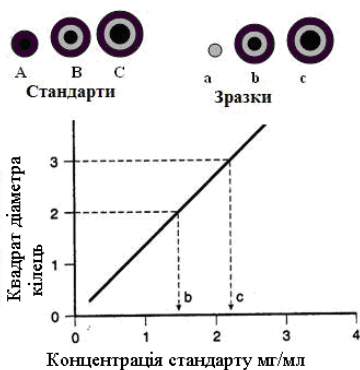
постановці реакції. Його можна будувати у двох варіантах: на ординаті – концентрація антигену, що визначається, у мг/мл, на абсцисі – квадрат діаметра кільця в мм; або на ординаті квадрат діаметру кільця в мм, на абсцисі – концентрація стандартного імуноглобуліну в мг/мл (рис. 10).

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 мономерні IgM (наприклад, при макро-глобулінемії Вальденстрема, атаксії-телеангіектазії), рівень буде штучно завищений, оскільки мономерний 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 козячим імуноглобулінів, тому при використуванні козячих антитіл для визначення рівня IgA в цьому випадку виходять завищені результати.

3.3.4.3 Метод подвійної імуодифузії 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 імуодифузії відображені на рис. 11 – 13.

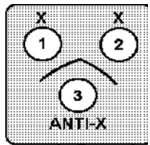


Рис. 11. – Схема смуг преципітації при ідентичності антигенів у 1 та 2 лунках.

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

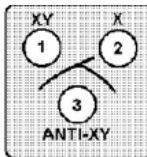


Рис. 12. – Схема смуг преципітації при частковій ідентичності антигенів у 1 та 2 лунках.

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

X
поміщена в
вміст лунки

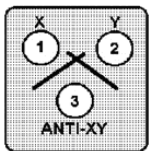


Рис. 13. – Схема смуг преципітації при не ідентичності антигенів у 1 та 2 лунках

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 імуодифузії.

Метод подвійної імуодифузії – 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 моноспецифічних 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 імуодифузії 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 імуодифузії поступається багатьом кількісним методам, технічно він простий, не вимагає високо очищених антитіл, специфічний і може використовуватися при проведенні масових досліджень.

3.4 Імуоелектрофорез. Види імуоелектрофорезу

При дослідженні складних сумішей антигенів, молекулярні маси яких близькі, дослідження наявності окремих антигенів проводять з використанням імуоелектрофорезу. Імуоелектрофорез сполучає поділ антигенів в електричному полі за значенням заряду молекули з імуопреципітацією у гелі.

Всі методи імуоелектрофорезу засновані на електрофоретичній міграції антигенів у гелі, що може містити або не містити антитіла й на специфічній імуопреципітації антигенів при взаємодії з відповідними преципітуючими антитілами. У кожній конкретній системі антиген-антитіло утворюються відповідні преципітати. Площа, займана цими преципітатами, пропорційна співвідношенню антиген-антитіло.

Таким чином, методи імуоелектрофорезу застосовні як для імунологічної ідентифікації, так і кількісного визначення антигенів і (або) антитіл.

В імуоелектрофорезу число молекул антитіл, що з'єднується з молекулами антигену, називають еквівалентною кількістю. Еквівалентна кількість – кількість антигену, що приєднується до певної кількості антитіл з утворенням максимальної кількості преципітату. Чіткість преципітату при електрофорезі забезпечується міграцією антитіл в область преципітату з навколишнього гелю. Розподілення та форма смуг преципітації при розподілу білків сироватки в ІЕФ аналізу є відносно стабільними і відтворюваними. Будь-яке відхилення є ненормальним. Ці відхилення можуть бути виявлені шляхом оцінки таких особливостей смуг преципітації як: позиція преципітату; спотворення кривизни або дуги преципітату; щільність і відносне подовження смуги; скорочення (гальмування), проріджування або подвоєння

Таким чином, методи імуоелектрофорезу застосовні як для імунологічної ідентифікації, так і кількісного визначення антигенів і (або) антитіл.

ІЕФ являє собою надійний і точний метод виявлення білків, їхніх структурних аномалій та зміни концентрації

3.4.1 Зональний електрофорез

Зональний електрофорез - напівкількісний метод, що дозволяє розділити суміш білків в залежності від їх молекулярної маси і електричного заряду. Суть методу полягає в наступному: досліджувану суміш білків на носії (наприклад, пластині з гелем, папір, ацетат целюлози) поміщають у камеру для електрофорезу, заповнену буферним розчином і підключену до джерела постійного струму.

При електрофорезі білків сироватки звичайно виходить 5 основних смуг, які відповідають фракціям альбуміну, α_1 -, α_2 -, β - і γ -глобулінів (рис. 14).

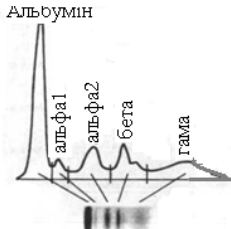


Рис.14. - Зональний електрофорез сироватки з денситограмою

Імуноглобуліни мігрують переважно у фракцію γ -глобулінів, хоча також присутні у фракціях α_2 - і β -глобулінів. Відносний вміст кожної фракції сироваткових білків можна оцінити за допомогою денситометра. За допомогою зонального електрофорезу можна досліджувати не тільки сироватку, але й інші біологічні рідини, наприклад СМР (спинномозкова рідина) і сечу. Цей метод дозволяє оцінити білковий склад досліджуваної проби і виявити моноклональні антитіла, хоча він недостатньо чутливий для визначення моноклональних антитіл у низькій концентрації на ранніх стадіях мієломної хвороби.

3.4.2 Зональний імуоелектрофорез

Суть методу полягає в наступному:

- 1) проводять електрофоретичної розділення білків в гелі;
- 2) після закінчення електрофорезу в гелі паралельно на \ominus правлінню електрофорезу вирізують борозенки;
- 3) в борозенки вносять антитіла (антисироватки), наприклад до важких (α -, μ -, γ -, ϵ -, δ -) або легких (λ -, κ -) ланцюгів імуноглобулінів.

Ці антитіла і розділені при електрофорезі білки дифундують назустріч один одному. У тих місцях, де антитіла зв'язуються з білками, утворюються дуги преципітації (рис.15).

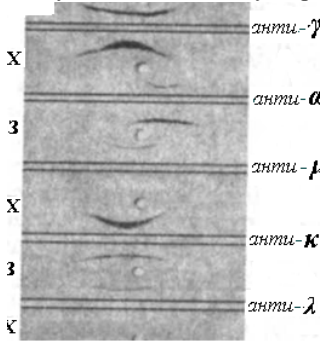


Рис.15. – Імуоелектрофорез сироватки здорової людини (З) та хворої (Х) на моноклональну гамопатію, що супроводжується підвищенням рівня γ - та κ -ланцюгів. Антитіла γ - та κ -ланцюгам утворюють більш ширші дуги преципітації з сироваткою хворого, ніж сироваткою здорової людини.

Імуоелектрофорез дозволяє оцінити лише якісний склад досліджуваної суміші білків. Оцінка результатів дослідження вимагає високої кваліфікації. Найчастіше цей метод застосовується для виявлення і характеристики моноклональних антитіл.

Відмінний скринінг-тест, для того щоб виявити наявність аномальних білків, таких як при мієломі, макроглобулінемія Вальденстрема, злоякісних лімфомах та інших лімфопроліферативних захворюваннях. Зональний імуоелектрофорез відмінний скринінг-тест, для того щоб виявити наявність аномальних білків, таких як при мієломі, макроглобулінемії Вальденстрема, злоякісних лімфомах та інших лімфопроліферативних захворюваннях.

3.4.3 Ракетний імуоелектрофорез

Цей метод аналізу являє собою простий, швидкий (2 – 4 години), добре відтворюваний метод визначення даного білка в декількох зразках білкової суміші. Розбавлені розчини зразків, які підлягають порівнянню, вносять у лунки, розташовані в ряд. Електрофорез ведуть в агарових гелі, що містить моноспецифічну антисироватку. Ідентифікацію білка проводять за утворенням піку преципітації у формі ракети, а кількісне визначення можна робити за висотою піку.

Висота піку пропорційна концентрації антигену, що визначається.

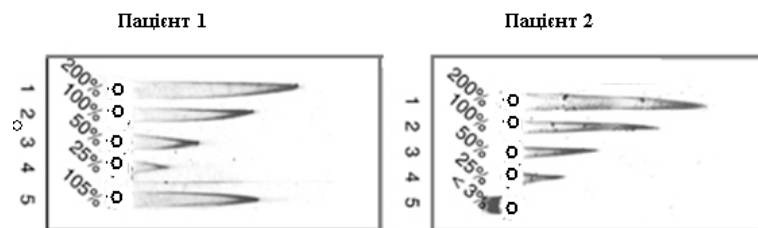


Рис. – 16. – Ракетний імуоелектрофорез.

На рис.16 відображено визначення фактору Н – регуляторного білку в системі комплементу. У лунках 1 – 4 розведення моноспецифічної сироватки до Н фактору (стандарт), у лунці 5 – досліджувана сироватка. Відповідно до отриманих даних у сироватці пацієнта 1 фактор Н відсутній, у пацієнта 2 його вміст складає 105 %.

3.4.4 Електрофорез з імуофіксацією (ІФЕ)

Частіше всього електрофорез з імуофіксацією (ІФЕ) застосовують в діагностиці моноклональних гамопатій – стан, в якому один клон плазматичних клітин дає підвищений рівень одного класу імуноглобулінів.

При діагностиці моноклональних гамопатій важливо виявити наявність у сироватці крові моноклональних антитіл відповідного класу, а у сечі - κ - або λ - легких ланцюгів (білки Бенс-Джонса).

Для виявлення моноклональних антитіл проводять ІФЕ. ІФЕ являє собою двоступеневу процедуру з використанням електрофорезу білка у чистому гелю агарози на першому етапі та імуопреципітації на другому.

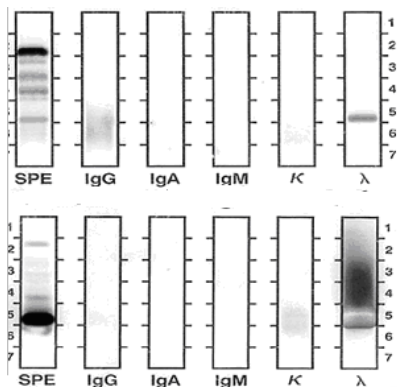


Рис.17. -Виявлення моноклональних антитіл з використанням ІЕФ

(рис. 17). Відповідно до даних рис.17 при електрофорезі білків сироватки крові у γ -фракції виявляється М-градієнт – наявність моноклонального імуноглобуліну (SPE). При імунофіксації встановлено, що моноклональні білки представлені G-імуноглобулінами с превалюванням легких ланцюгів типу λ . При паралельному проведенню електрофорезу з імунофіксацією сечі (рис.16, нижні гелі) виявляється високий рівень λ -ланцюгів. Таким чином, за допомогою ІЕФ встановлено G λ тип мієломи. Встановлення типу гамапатії важливо для лікаря гематолога.

Досліджуватися може сироватка, сеча, спинномозкова рідина та інші рідини тіла.

Застосування ІФЕ. ІФЕ використовується з метою встановлення наявності (або відсутності) та ідентифікації парапротеїнів, виявлення підвищення або зниження рівня різних груп білків у сироватці крові й сечі. Частіше ІФЕ призначають для виявлення й ідентифікації моноклональних антитіл (надмірна продукція одного класу імуноглобулінів).

Моноклональний білок може виявлятися й у сечі й у сироватці, а може тільки в сечі. Наприклад, білок Бенс Джонсона – легкий ланцюг імуноглобулінів може виявлятися тільки в сечі. Невелика молекула цього білка легко фільтрується нирками й надходить у вторинній сечі.

Електрофорез білків сечі може бути призначений для оцінки стану нирок при цукровому діабеті й, автоімунних захворюваннях. Не призначається електрофорез при запальних інфекціях сечових шляхів

Джерела помилок при імуноелектрофорезі:

- 1)застосування струм у неправильному напрямку;
- 2)некоректний рН буфера;
- 3)некоректний час поділу;
- 4)сума перерахованих помилок.

4 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;
- рН;
- час інкубації;
- концентрація іонів.

Розрізняють активну й пасивну аглютинацію.

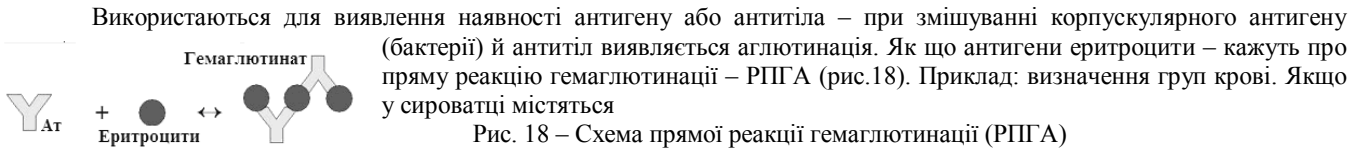
Активна (пряма): у реакції бере участь частка з власними епітопами поверхневого антигену. Наприклад, еритроцити – антигенні детермінанти антигенів системи АВ0, бактерії – антигенні детермінанти їхніх поверхневих антигенів. Реакції прямої аглютинації використовують для ідентифікації збудника. У суспензію 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 (СРБ); людський хоріонічний гонадотропін (ЛХГ) – тест на наявність вагітності; у серології: визначення груп крові, виявлення бактеріального антигену (коклюш, лептоспіра, бліда трепонема).

4.1 Якісні тести. Пряма аглютинація



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 їхній відсутності при попередньому визначенні.

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

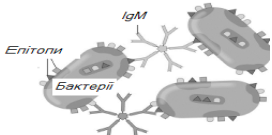


Рис.19. – Схема прямої аглютинації бактерій IgM.

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.

4.2 Кількісні аглютинаційні тести. Пасивна гемаглютинація

Принцип:

1) в лунках планшетів для мікротитування готують розведення сироватки (антитіл);

2) додають стандартну кількість еритроцитів, бактерій або іншого корпускулярного антигену й визначають найбільше розведення, що дає видимої аглютинації. 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 1/2, 1/4).

Пациент	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	К+	К-	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.

4.2.1 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 ефективній 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 виявити наявність неаглютинуючих антитіл на еритроцитах додають вторинні антитіла, спрямовані проти Fc-фрагментів IgG, які сенсibiliзували 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 C3 – компоненту комплементу (антикомплемента сироватки) тварину імунізують сироваткою, імуноглобулінами або комплементом людини. Отриману імунову сироватку очищують 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 антикомплемента сироватки викликає аглютинацію еритроцитів.



Рис.21. – Схема постановки прямого тесту Кумбса

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

4.2.2 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 сенсibilізують 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 сенсibilізованих еритроцитів додають реактив Кумбса, спостерігають аглютинацію й визначають титр (рис.22).

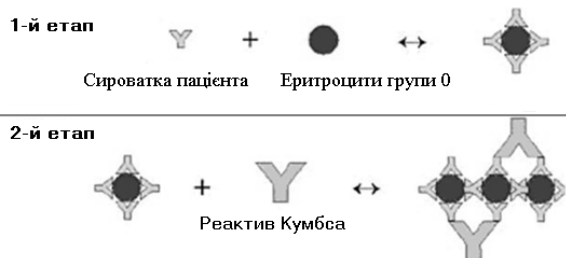


Рис. 22. – Схема постановки непрямого тесту Кумбса

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 аутоантитіл.

4.3 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, приготувану 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.

4.4 Реакції пасивної, або непрямої, 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.

4.4.1 Реакція пасивної, або непрямої, 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.

4.5 Реакція зв'язування комплементу (РЗК)

Ця реакція дозволяє оком виявити наявність, або відсутність утворення комплексу антиген-антитіло (рис.23). Вона ґрунтується на здатності комплементу зв'язуватися з комплексом АГ-АТ. С1 компонент комплементу зв'язується з Fc-фрагментами IgG і IgM у складі комплексів. Реакція перебігає у дві фази. Перша фаза – взаємодія антигену та антитіла.

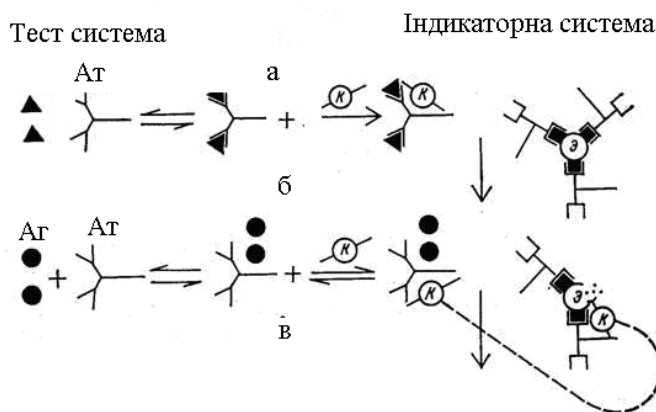


Рис. 23. - Схема реакції зв'язування комплементу
 а - лізис сенсibilізованих еритроцитів у присутності комплементу;
 б - відсутність гемолізу внаслідок фіксації комплементу комплексом Аг-Ат; в - лізис еритроцитів в результаті відсутності комплексу Аг-Ат.

В якості матеріалу, що містить антитіла, використовується досліджувана сироватка, до якої додається відомий антиген. До цієї системи додають розчин стандартного комплементу і інкубують при 37°C протягом однієї години. Друга фаза – виявлення результатів реакції за допомогою індикаторної гемолітичної системи (еритроцити барана і гемолітична сироватка кролика, що містить антитіла до еритроцитів барана). До суміші антиген + антитіло + комплемент (1-а фаза) додають індикаторну систему і знову інкубують при 37°C протягом 30 - 60 хв, після чого оцінюють результати реакції. Руйнування еритроцитів відбувається в разі приєднання до гемолітичної системи комплементу. Якщо комплемент раніше зв'язався на комплексі АГ + АТ, то гемоліз еритроцитів не настає. При відсутності в досліджуваній сироватці специфічних антитіл, комплекс АГ + АТ не утворюється і комплемент залишається непов'язаним. При додаванні гемолітичної системи комплемент приєднується до неї і відбувається гемоліз еритроцитів.

При позитивній реакції у досліджуваній системі відбувається зв'язування комплементу, і тоді при додаванні сенсibilізованих антитілами еритроцитів гемолізу не спостерігається. Реакцію застосовують для серодіагностики сифілісу (реакція Васермана), вірусних та бактеріальних інфекцій.

4.6 Реакція радіального гемолізу еритроцитів

Може виконуватись в гелі. Завісь еритроцитів барана поміщають в агарозний гель з комплементом; в застиглому на склі шарі гелю роблять лунки і вносять до них гемолітичну сироватку – антитілі до еритроцитів барана. Навколо лунок в результаті радіальної дифузії антитіл утворюється зона гемолізу, радіус якої прямо пропорційний титру сироватки. Якщо сорбований на еритроцитах який-небудь антиген, наприклад глікопротеїновий гемаглютинін вірусу грипу, краснухи або кліщового енцефаліту, то можна відтворити феномен гемолізу імунними сироватками до цих вірусів. Реакцію радіального гемолізу в гелі застосовують в діагностиці вірусних інфекцій. Вона характеризується простотою постановки, нечутливістю до сироватковим інгібіторам, дозволяє титрувати сироватки крові за діаметром зони гемолізу, не вдаючись до серійних розведень.

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

Перший феномен взаємодії антитіл зі специфічним антигеном – сенсibilізація має місце у всіх випадках реакції антиген-антіло не залежно від класу антитіл, їхньої концентрації, концентрації антигену. *Виявлення імунних комплексів, що утворюються на стадії сенсibilізації, 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.

5.1 Радіоімунний аналіз (РІА), принцип. Варіанти РІА 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 РІА в біологічних рідинах визначають концентрації гормонів, факторів росту, ферментів, автоантитіл, маркерів злоякісних новоутворень та інших речовин (наприклад, лікарських засобів та наркотиків).

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

Методика РІА

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 конкурентне 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 калібрувальній кривій. Для її побудови використовують кілька стандартних калібрувальних розчинів з відомими концентраціями неміченого антигену.

5.1.2 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 водонерозчинному 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 імунофлуориметричному 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.

5.1.3 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.

5.1.3.1 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).

5.1.3.2 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 імунохімічну реакцію. 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.

5.1.3.3 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).

5.1.3.4 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 гастриномією (синдром Золінгера-Елісона) або з порушенням регуляції продукції гастрину в пілорусу (непухлинна гіпергастринемічна гіперхлоргідрія) 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 гіперхлоргідрії. Для диференціальної діагностики застосовують стимуляційні проби з секретинном 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 гастриніоми. 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, суворов 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.

5.2 Імуноферментний аналіз

5.2.1 Загальні положення

Імуноферментний аналіз – вид імуноаналізу, у якому утворення комплексу антиген-антитіло визначають за активністю мітки-ферменту

Розвиток ІФА визначили два відкриття.

Перше, різні ферменти можна ковалентно приєднувати до антигену або антитілу різними хімічними методами за умови збереження біологічної активності та імунологічної специфічності антигену, антитіл, ферментів.

Друге, більшість антигенів і антитіл мимовільно сорбується на поверхні пластику (полістиролу) і зберігає при цьому здатність до специфічного зв'язування відповідно антитіл та антигену.

Сорбцію антигену або антитіл на поверхні пластику називають сенсibiliзацією. Сорбовані на пластику антиген та антитіло не змиваються буфером, що містить детергент, не пов'язані антиген та антитіло легко віддаляються відмиванням. Пластик з сорбованими на ньому антитілами або антигеном отримав назву імуносорбент. Досліджуваний зразок і стандартні реагенти інкубують в сенсibiliзованих лунках пластикових планшетів. При інкубації на поверхні лунок формуються імунні комплекси антиген-антитіло.

Антиген та антитіло, що не зв'язались, видаляються відмиванням. Ця властивість визначає високу специфічність аналізу. При утворенні імунних комплексів активний центр ферменту – мітки антигену або антитіла залишається вільним і доступним для субстрату. Інкубація ферменту з хромогенним субстратом супроводжується кольоровою реакцією. Реакцію зупиняють при досягненні стандартом певної оптичної щільності. Ступінь фарбування можна оцінювати візуально або за допомогою фотометрії.

Різноманітність об'єктів дослідження від низькомолекулярних з'єднань до вірусів і бактерій, а також надзвичайно широке коло завдань, пов'язаних з різноманітними умовами застосування ІФА, обумовлюють розробку надзвичайно великої кількості варіантів цього методу. Будь – який варіант ІФА містить 3 обов'язкові стадії:

- 1) стадія впізнання шуканого з'єднання специфічними до нього антитілом, що веде до утворення імунного комплексу;
- 2) стадія формування зв'язку кон'югату з імунним комплексом або з вільними місцями зв'язування;
- 3) стадія перетворення ферментної мітки в реєстрований сигнал.

5.2.2 Класифікація ІФА

В основу класифікації методів ІФА покладено кілька підходів:

1. За типом реагентів, присутніх на першій стадії ІФА, розрізняють конкурентний і неконкурентний методи. У конкурентному ІФА на першій стадії в системі присутні одночасно аналізоване з'єднання та його аналог, мічений ферментом і конкуруючий за центри специфічного зв'язування з аналізованим антигеном або антитілами. Для неконкурентних методів характерна присутність в системі на першій стадії тільки аналізованого з'єднання і специфічних до нього антигенів або антитіл, що сорбовані.

2. Всі методи ІФА поділяються на гомогенні і гетерогенні. Якщо всі три стадії ІФА проходять в розчині і між основними стадіями немає додаткових етапів поділу імунних комплексів, що утворилися, від компонентів, які не реагували, метод відноситься до групи гомогенних.

Для гетерогенних методом характерно проведення аналізу в двофазній системі за участю твердої фази – носія, і обов'язкова стадія поділу імунних комплексів від компонентів, що не прореагували, (відмивання), які знаходяться в різних фазах (імунні комплекси, що утворилися знаходяться на твердій фазі, а ті, що не прореагували – у розчині). Гетерогенні методи, в яких формування імунних комплексів на першій стадії протікає на твердій фазі, називають твердофазним методами. В сей час у клініко-діагностичних лабораторіях використовують твердофазний ІФА.

5.2.3 Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА

5.2.3.1 Ферменти

Ферментні мітки володіють надзвичайно потужною каталітичною дією, одна молекула ферменту може реагувати з великою кількістю молекул субстрату. Таким чином, фермент, присутній в незначних кількостях, можна виявити і кількісно визначити за утворенням продуктів, в реакції яку він каталізує.

Інша перевага застосування ферментів в якості міток обумовлена наявністю в молекулі численних функціональних груп (сульфгідрильних, карбоксильних, залишків тирозин та інших), через які можна ковалентне приєднати його молекули до антигену або антитілу.

Ферментні маркери, які використовуються в ІФА, повинні мати наступні властивості:

– наявність економічно доступних джерел отримання ферменту;

– висока активність і стабільність ферменту в умовах аналізу в кон'югаті з антитілами або антигеном;

– наявність економічно доступних субстратів і простота методу визначення продуктів або субстратів ферментативної реакції;

– можливість адаптації систем фермент – субстрат до подальшого посилення;

– відсутність ферменту і його інгібіторів в досліджуваній біологічній рідині.

Вищеназваним вимогами найбільш відповідають пероксидаза хрому (ПХ) та лужна фосфатаза (ЛФ) зі слизової оболонки теля. Обидва ферменту стабільні і каталізують високочутливі реакції. Крім того, продукти, одержувані в результаті реакцій, що каталізуються цими ферментами, в залежності від використовуваного субстрату, можуть виявлятися не тільки колориметричними методами, але також флуоресцентними.

5.2.3.2 Субстрати

Поряд з ферментативною активністю кон'югату, великий вплив на чутливість аналізу надає тип субстрату. Продукт ферментативного перетворення субстрату повинен володіти новим фізико-хімічними параметром, що дозволяє детектувати його з високою чутливістю. Такими параметрами є: поглинання світла у видимій області (хромофорних субстрати), флуоресценція у видимій області (флуоресцентні субстрати) і хемілюмінесценція (хемілюмінесцентні субстрати).

Хромофорні субстрати. Як хромофорних субстратів можуть бути використані як індивідуальні речовини, так і суміші речовин, що вступають у послідовні реакції один з одним і утворюють, в кінцевому рахунку, пофарбований продукт. Перелік найбільш часто використовуваних ферментів та субстратів наведено в табл.1. Використання таких субстратів дає можливість проводити як інструментальний, так і візуальний облік результатів аналізу.

Флуоресцентні субстрати. До флуоресцентних субстратів відносяться речовини, які стають флуорохромами після ферментативного перетворення. Всі флуоресцентні субстрати забезпечують більш високу чутливість аналізу в порівнянні з хромофорних і, незважаючи на неможливість візуального обліку результатів аналізу, вони отримують в останні роки все більше поширення.

Хемілюмінесцентні субстрати. Хемілюмінесцентними субстратами, які найбільш широко застосовуються в ІФА, є люмінол і ізолуінол. На стадії вимірювання ферментативної активності вони окислюються перекисом водню в присутності кон'югатів з пероксидазою. Випромінювання світла в результаті люмінол - пероксидазної реакції може бути посилене в кілька сотень разів за рахунок використання підсилювачів хемілюмінесценції, якими є 6-гідроксібензотіазол,

p-іодфенол, p-фенилфенол, 1-бром-2-нафтол та ін. Цей підхід забезпечує значне посилення хемілюмінесценції і відповідне підвищення чутливості аналізу.

Основні вимоги до субстрату:

– забезпечення високої чутливості методу при виявленні ферменту в кон'югаті;

– субстрат повинен бути безпечним, дешевим, доступним і зручним для застосування.

Для ПХ використовують 3,3',5,5'-тетраметілбензидин (англ. ТМВ) та 3,3'-діамінобензидин (англ. ДАВ). Для ЛФ – p-нітрофенілфосфат та 5-бром-4-хлоро-3-індолил фосфат. Субстрати хромогенні, під дією ферментів утворюється фарбований продукт, інтенсивність фарбування розчину прямо пропорційна активності ферменту.

Одним з найбільш важливих компонентів у ІФА є антитіла. Чутливість ІФА залежить від концентрації, активності та специфічності використовуваних антитіл. Використовувані антитіла можуть бути полі – або моноклональними, різного класу (IgG або IgM) та підкласу (IgG1, IgG2) [], антиалотипічними або антиідіотипічними. При низькій афінності антитіл розпад комплексу антиген-антитіло призводить до видалення пов'язаного антигену з системи. Чутливість і специфічність методу підвищується при використанні моноклональних антитіл. У цьому випадку з'являється можливість виявляти низькі концентрації антигену у випробовуваних зразках.

5.2.3.3 Кон'югат

Надійний кон'югат повинен володіти наступними властивостями: високим антигінним титром і високою афінністю до антигену, щоб його можна було використовувати у великому розведенні, і таким чином, зменшити неспецифічне зв'язування;

– достатньою специфічністю в робочому розведенні;

– переважанням мономерних форм над полімерними, тому що полімерні форми мають тенденцію до неспецифічної адгезії на пластику, що призводить до високого фонового рівня реакції; – оптимальним молярним співвідношенням між ферментом і антигенами (оптимальне співвідношення становить близько 1:1) [];

– достатньою ферментативною активністю кон'югату. Ця властивість визначається головним чином умовами кон'югації і співвідношенням молекул ферменту і антигену у кон'югаті.

5.2.3.4 Тверда фаза

В якості твердої фази для проведення ІФА можна застосовувати різні матеріали: полістирол, полівінілхлорид, поліпропілен і інші речовини. Твердою фазою можуть служити стінки пробірки, 96 – луночні та інші планшети, кульки, намистини, а також нітроцелюлозні та інші мембрани, що активно сорбують білки.

5.2.3.5 Формування імуносорбенту

Імунохімічні методи ґрунтуються на використанні попередньо адсорбованих «пасткових» антитіл для іммобілізації антигену або антитіл. Антиген, іммобілізований імунохімічно, в 10 разів активніше, ніж пасивно адсорбований антиген. Можуть використовуватися лектини або імуноглобулін – зв'язуючи білки бактерій, які легко адсорбуються на пластику або інших гідрофобних поверхнях, наприклад конканавалін А (Кон А) або стафілококовий білок А. Кон А здатний іммобілізувати gp 120 – білок вірусу ВІЛ. Вільні сайти на поверхні твердої фази, не пов'язані з агентом, можуть фіксувати в ході тесту інші молекули, у тому числі і кон'югати, що призводить до підвищення фонового сигналу. Для запобігання неспецифічного зв'язування після іммобілізації на тверду фазу основного матеріалу проводять обробку нейтральними для тіста речовинами. Найбільш популярні блокуючі агенти – бичачий сироватковий альбумін (БСА), казеїн і ін. Вибір блокуючого агента і умови проведення цього етапу залежать від типу твердої фази, чутливості системи.

5.2.3.6 Вимірювання ферментативної активності

Останнім компонентом специфічного комплексу на твердій фазі є кон'югат. Його ферментативна активність, а, отже, і концентрація, буде пропорційна концентрації решти компонентів комплексу, один з яких підлягає визначенню. Визначення ведуть з урахуванням кінетичних особливостей ферменту-мітки.

На величину ферментативної активності впливає рН, температура (температурний оптимум лужної фосфатази 37° С, для пероксидази – 15° С), концентрація субстрату та конформаційні зміни в ферменті.

Інтенсивність перемішування розчину навколо твердої фази, як на цій стадії, так і на інших розглянутих стадія ІФА, грає дуже важливу роль.

5.2.3.7 Інтерпретація результатів ІФА

Залежність величини ферментативної активності специфічного комплексу з ферментної міткою від кількості будь-якого компоненту комплексу зображується у вигляді доза-відповідь кривої, де на осі ординат відкладена інтенсивність сигналу субстрату після його ферментативного перетворення, виміряна в момент часу t , а по осі абсцис концентрація реагенту, визначається в пробі.

Під чутливістю аналізу розуміється та мінімальна концентрація реагенту, що визначається, при якій помітна відмінність сигналу для цієї концентрації та нульового стандарту, тобто зразка, що свідомо не містить визначуваного реагенту. Ця різниця у величинах сигналів повинна становити 2 - 3 величини стандартного відхилення.

5.2.4 Основні принципи постановка твердофазного імуноферментного аналізу

Широке розповсюдження отримали різні варіанти твердофазного імуноферментного аналізу (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Твердофазний ІФА був запропонований у 1971 році. Основні принципи твердофазного ІФА, незалежно від модифікації, полягають в наступному.

1. На 1 етапі адсорбують антиген або антитіла на твердій фазі. При цьому не пов'язані з твердою фазою реагенти легко віддаляються відмиванням.

2. У сенсифікованих лунках інкубують досліджуваній зразок. У лунках з позитивним контролем – стандартні реагенти. При цьому на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси. Незв'язані компоненти видаляють відмиванням.

3. При додаванні кон'югату антитіло-фермент або антиген-фермент і зв'язуванні його з іммобілізованим імунним комплексом активний центр ферменту залишається доступним для подальшої взаємодії із субстратом. Інкубація субстрату в лунках з іммобілізованим кон'югатом призводить до розвитку кольорової реакції. Цю реакцію можна зупинити на потрібній стадії, ступень фарбування можна оцінити візуально або по оптичній щільності.

Важливий етап будь-якого варіанту твердофазного аналізу – процедура відмивання від незв'язаних реагентів. Важливо не просто сполоснути фіксовані на твердій фазі компоненти, а видалити реагенти з усієї глибини шару. Це найбільш тривалі та трудомісткі етапи аналізу. Промивання проб може проводитися в автоматичному режимі за допомогою спеціального приладу – вошер або вручну за допомогою багатоканальної піпетки.

Для проведення ІФА необхідні:

- полістироловий планшет або інші варіанти твердої фази, що використовуються;
- відмиваючий розчин;
- кон'югат (мічені ферментної міткою антигени або антитіла); – суміш використовуваних субстратів;
- розчин, що зупиняє реакцію (стоп-реагент – розчин для зупинення реакції);
- зразки, що використовуються для позитивного та / або негативного контролю;
- стандартний антиген (для побудови калібрувальної кривої);
- одно - і багатоканальні піпетки;

– вошер (промивач);

– оптичний прилад для визначення оптичної щільності досліджуваного розчину (ІФА-зчитувач, який послідовно фотометрує всі лунки);

– 5-100 мкл досліджуваного біологічного матеріалу.

5.2.4.1 Прямий ІФА

1. У лунках панелей адсорбують антигени або антитіла (рис. 24).

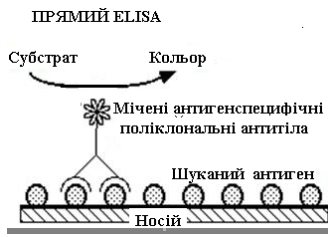


Рис.24. – Схема поставлення прямого ІФА

Вище зазначалося, що антигени істотно розрізняються за здатністю адсорбуватися на різних видах пластику в залежності від того, до якого класу речовин (білків, вуглеводів або ліпопротеїдів) вони належать. Часто в прямому ІФА антиген, іммобілізований на твердій фазі, це клітини та інші корпускулярні антигени. В якості контролю використовують лунки з адсорбованим позитивним контрольним зразком, в якому обов'язково міститься шуканий антиген, і негативним контрольним зразком, що свідомо не містить досліджуваного антигену. При наявності очищеного стандартного антигену реакцію проводять у кількох розведеннях, так щоб можна було побудувати калібрувальну криву.

2. «Блокують» вільні місця зв'язування, що залишилися на твердій фазі, за допомогою бичачого сироваткового альбуміну (БСА), казеїну та ін. (для запобігання неспецифічній сорбції кон'югату на твердій фазі).

3. В лунки вносять антигенспецифічні мічені поліклональні антитіла (кон'югат), інкубують. Зв'язування кон'югату з твердою фазою буде відбуватися лише у випадку комплементарності обох компонентів системи. Після інкубації з кон'югатом лунки відмивають, видаляючи, таким чином, частину кон'югату, яка не зв'язалась.

4. Потім в лунки вносять субстрат, специфічний для використовуваного ферменту, і інкубують. По досягненні оптимального рівня забарвлення в лунках з позитивним контролем, ферментативну реакцію зупиняють.

5. Облік реакції. Спочатку результати реакції враховують візуально. Для більш точного обліку результатів інтенсивність фарбування оцінюють на ІФА-зчитувачі з відповідним світлофільтром.

5.2.4.2 Непрямий ІФА для визначення антитіл. Основні етапи непрямого ІФА для визначення антитіл різних класів

Цей варіант ІФА використовують звичайно для виявлення специфічних антитіл. У лунках панелей адсорбують стандартний антиген і інкубують із зразками сироватки або іншого біологічного матеріалу, отриманого від хворого (спинномозкова рідина, слина та ін.). Специфічні антитіла, зв'язавшись з антигеном на твердій фазі, виявляють за допомогою антиглобулінового кон'югату. Залежно від мети аналізу використовують різні антиглобулінові реагенти, що виявляють антитіла всіх ізотипів, або специфічні до окремих класів і підкласів імуноглобулінів. Основна перевага методу полягає в універсальності кон'югату. Один і той же кон'югат може служити для виявлення антитіл людини до самих різних антигенів у будь-яких зразках. Реакція методично проста.

Основні етапи непрямого ІФА для визначення антитіл.

Схема постановки непрямого ІФА залежить від класу антитіл, які визначають.

На рис.25 представлена схема виконання ІФА при визначенні антиген специфічних IgG

1. Імуносорбент готовий, містить антиген відомого збудника

2. В лунки вносять досліджуваний матеріал, інкубують, проводять процедуру відмивання. Паралельно ставлять

проби з

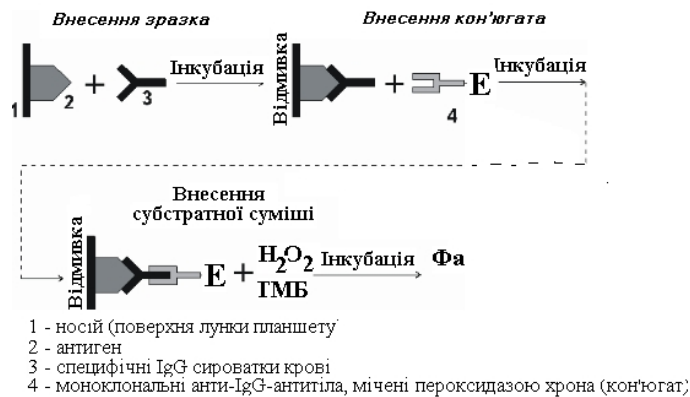


Рис.25. – Схема непрямого ІФА при визначенні IgG у біологічних рідинах.

позитивним і негативним контролюями.

3. Додають анти-IgG кон'югат в робочому розведенні, інкубують, відмивають від незв'язаних компонентів.

4. Вносять субстрат, інкубують. По досягненні оптимального рівня забарвлення в лунках з позитивним контролем реакцію зупиняють, додаючи стоп-розчин.

5. Вимірюють кількість продукту реакції на ІФА-зчитувачі. За оптимальних умов проведення аналізу метод високо специфічний і чутливий. Він дозволяє виявляти нанограміві кількості антитіл у сироватках досліджуваних хворих. Для отримання задовільних результатів необхідна стандартизація реагентів і методичних прийомів. Цей варіант ІФА може також використовуватися для тестування моноклональних антитіл.

Визначення антиген специфічних IgM та IgA. На рис.26.

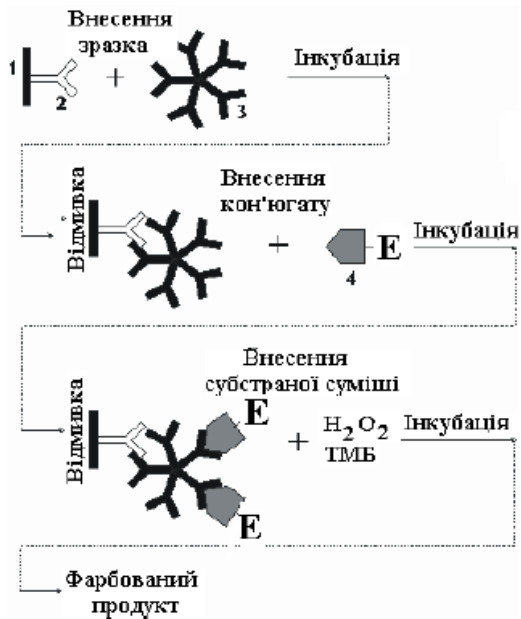


Рис.26. – Схема визначення IgM у сироватці крові.

Позначки:

1 – носій (поверхня лунки); 2 – моноклональні анти-IgM-антитіла; 3 – IgM крові; 4 – антиген, мічений пероксидазою хрому.

Для визначення цього класу імуноглобулінів використовується схема ІФА з фіксованими анти-антитілами або "пастками для антитіл" (Antibody capture ELISA). Метод засновано на тому, що на твердофазному носії фіксуються моноклональні антитіла миші, що реагують специфічно з людськими антитілами певного класу, тобто вторинні антитіла до Fc μ – IgM, Fc α – IgA, Fc γ – IgG. У результаті інкубації тестованої сироватки антитіла відповідного класу зв'язуються з імуносорбентом. Наявність серед них антитіл, специфічних для будь-якого антигену (наприклад, трепонемні), виявляється в ході інкубації з цим антигеном, міченим ферментом. При інкубації з субстратом в тому випадку, коли в досліджуваному зразку були присутні специфічні антитіла, розвивається фарбування розчину. За допомогою цієї ж схеми можна визначити інші класи антитіл при умові, пастки будуть представлені, наприклад, моноклональними анти-IgA-антитілами при визначенні IgA.

5.2.4.3 Схеми ІФА для виявлення антигенів. «Сендвич» – варіант ІФА для виявлення антигенів. Основні етапи аналізу

Розрізняють одно- та двохстадійний «сендвич» ІФА. На рис. 27 надана схема проведення одно стадійного визначення антигену з використанням «сендвич»-варіанта.

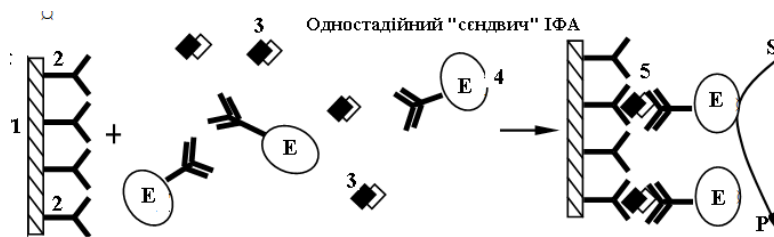


Рис. 27. – Визначення антигену за схемою одностадійного «сендвич» ІФА

Позначки: 1 – носій (поверхня лунки); 2 – моноклональні антитіла; 3 – аналізований зразок (антиген); 4 – кон'югат моноклональних антитіл з пероксидазою; 5 – іммобілізовані комплекси з міченими антитілами; S – субстрат, P – фарбований продукт.

Антигени, що визначаються за допомогою даного варіанту ІФА, повинні мати як мінімум два епітопів, здатних зв'язувати антитіла, або мати повторювані, просторово розділені епітопи з однаковою специфічністю. При проведенні цього варіанту ІФА моноклональні антитіла, адсорбовані на твердій фазі, інкубують з досліджуваним зразком і кон'югатом моноклональних антитіл з пероксидазою хрому. На твердій фазі утворюється Після процедури відмивання в лунки вносять зразок, інкубують, відмивають і додають кон'югат моноклональних антитіл з пероксидазою, інкубують, відмивають і вносять субстрат. Реакцію зупиняють до того ж антигену і далі проводять всі інші етапи реакції. Так як паратопи моноклональних антитіл зв'язують різні епітопи у антигену, то конкуренція виключається. Інтенсивність фарбування пропорційна кількості антигену.

Основною перевагою методу є висока чутливість, що перевершує можливості інших схем ІФА. Ця схема ІФА використовується при визначенні вмісту гормонів – фолікулоstimулюючий, лютеїнізуючий та гормон, пролактин, хоріонічний гонадотропін, тиреоглобулін, маркері пухлин – загальний простат-специфічний антиген; вільний простат-специфічний антиген, а також альфа-фетопротеїн та IgE.

На рис. 28 надана схема двох стадійного «сендвич» ІФА.

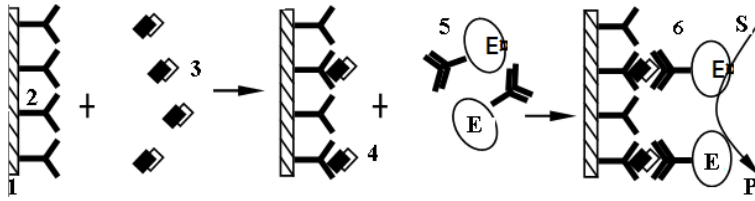


Рис. – Визначення антигену за схемою двохстадійного «сендвич» ІФА

Позначки: 1 - 3 ті ж, що на рис.27, 4 – комплекс антитіло-антиген; 5 – кон'югат моноклональних антитіл; 6 – іммобілізовані комплекси з міченими антитілами; S – субстрат, P - фарбований продукт.

Ця схема ІФА використовується для визначення тиреотропного гормону та антигену лямблій у екстракті фекалій.

5.2.4.4 Конкурентний ІФА

Конкурентний ІФА відрізняється від неконкурентного, як правило, більшою специфічністю за рахунок того, що в якості конкурента в реакцію вводять реагент, що пройшов спеціальний строгий відбір на специфічність. На рис.29 відображена схема одностадійного конкурентного ІФА визначення антигену.

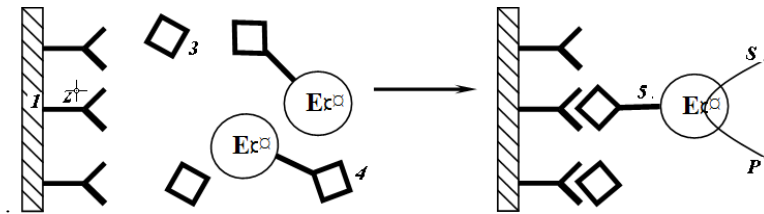


Рис.29. – Схема одно стадійного конкурентного ІФА визначення антигену.

Позначки: 1 – 3 ті ж, що на рис.27, 4 – кон'югат антигену; 5 – іммобілізовані комплекси з міченим антигеном; S – субстрат, P - фарбований продукт.

Основні етапи аналізу для виявлення антигену (рис.29).

1. На твердій фазі іммобілізують специфічні для виявляється антигену моноклональні антитіла.

2. В лунки панелей вносять у відомій концентрації антиген, мічений ферментом, і досліджуваний зразок. Проводять інкубацію і відмивання. Паралельно в сусідніх лунках ставлять позитивний і негативний контролю. Для побудови калібровочної кривої використовують стандартний немічений антиген в різних розведеннях. 3. Додають субстрат, інкубують, зупиняють реакцію при розвитку оптимального забарвлення в лунках з позитивним контролем. 4. Облік реакції на ІФА-зчитувачі. У цьому випадку кількість антигену в досліджуваному зразку оборотне пропорційна ферментативної активності на твердій фазі.

За такою схемою ІФА визначають: вільний тироксин, загальний тироксин, вільний трийотиронін, загальний трийодтрионін, кортизон, оксипрогестерон, естрадіол, дегідропіандростерон сульфат, мікроальбумін.

Один з варіантів конкурентного ІФА для визначення антитіл к ВІЛ випускається фірмою Wellcome. У якості конкуруючого реагенту використовують поліклональні анти-ВІЛ антитіла, кон'юговані з ферментом. На тверду фазу сорбують антигени ВІЛ. Випробувані проби змішують з конкуруючим реагентом і суміш вносять у лунки з антигеном. Після відмивання видаляються незв'язані антитіла до не ВІЛ та частина незв'язаних мічених анти-ВІЛ антитіл конкуруючого реагенту. Після додавання субстрату сильне забарвлення розвивається тільки в лунках, у які внесли сироватки, що не містять анти-ВІЛ антитіл. Якщо у випробуваній пробі була деяка кількість анти-ВІЛ антитіл, то розвинеться слабе або нульове забарвлення. Результат бажано реєструвати кількісно за допомогою вертикального спектрофотометра.

При визначенні антитіл цей варіант аналізу заснований на конкуренції мічених (кон'югат) і немічених (досліджуваних) антитіл за зв'язування з антигеном, адсорбованим на твердій фазі. Кількість ферменту, який приєднався до твердої фазі, зменшиться пропорційно вмісту в суміші вільних антитіл.

Конкурентний метод вимагає мінімального числа операцій, незначної витрати реагентів і легко може бути автоматизований. При проведенні конкурентного ІФА для виявлення антитіл краще використовувати мічені моноклональні антитіла, тоді конкуренція кон'югату з досліджуваним зразком відбувається за єдиний епітопи адсорбованого на твердій фазі антигену.

Цей варіант ІФА застосовується для визначення різних сполук, таких як імуноглобуліни людини, раково-ембріональний антиген, інсулін, а також гормони небілкової природи. Він дозволяє виявляти антитіла до діагностично значимих епітопів інфекційних агентів.

В Україні виготовлення тест-систем для ІФА здійснює підприємство "Діапроф-Мед".

5.2.5 Методи визначення секреторної активності імунокомпетентних клітин. Метод імуноферментних плям (ELISPOT)

1983 році була розроблена технологія твердофазного ІФА для визначення лімфоїдних клітин, що секретуючих антитіла або антигени (наприклад, цитокіни), *in vitro*. Метод отримав назву ELISPOT (метод імуоферментних зон або плям).

Основний принцип методу.

1. На поверхні полістиролових лунок (використовують

24-х лункові панелі для культивування клітин) сорбують антигени або антитіла, які служать «пастковими» реагентами.

2. Додають досліджувані лімфоцити, культивують кілька годин при 37°C, даючи їм можливість зайняти певне місце і виконати секреторну функцію. Антитіла або антигени, що секретуються такими клітинами, вловлюються адсорбованими на твердій фазі реагентами.

3. Клітини видаляють, використовуючи для цього розчин для відмивання з детергентом, лізують клітини.

4. Ділянки накопичення секреторних продуктів виявляють, додаючи пов'язані з ферментом антитіла (антиглобуліновий реагент).

5. Додають суміш субстрату з агарозою (використовувані субстрати повинні розчинятися в агарозі і утворювати нерозчинні продукти реакції), на поверхні твердої фази утворюються коричневі або блакитні плями (у залежності від використовуваних ферментів і субстратів), виявляючи ділянки, де розташовувалися клітини. Плями, що утворилися, підраховують під мікроскопом, це й буде кількість клітин, які секретували. В якості твердої фази може бути використана нітроцелюлозна мембрана. У цьому випадку є ряд переваг: через високу адсорбційну здатність нітроцелюлозної мембрани потрібна значно менша кількість антигену, що використовується як «пастковий» реагент, крім того, відпадає необхідність у включенні субстрату в агарозу. Даний метод знайшов широке застосування для оцінки кількості клітин, секретуючих антиген, шляхом уловлювання адсорбованими антитілами: визначення кількості клітин, секретуючих цитокіни (ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІФН- γ , ФНП- α).

5.2.6 Системи посилення сигналу в ІФА

При використанні високоафінних антитіл чутливість окремих варіантів ІФА дуже висока і теоретично дозволяє виявити одиничні молекули антигену, але на практиці чутливість обмежується рядом факторів: активністю ферменту, інтенсивністю сигналу і методами обліку сигналу. Системи посилення сигналу дають можливість підвищувати чутливість різних варіантів ІФА.

5.2.6.1 Системи на основі взаємодії авідін-біотин (ABC-метод) та стрептавідін-біотин (SaBC-метод)

Біотин (вітамін Н) – з'єднання, стійке до дії високих температур, до кислого і лужного середовищі, добре розчиняється у воді і спирті. Він є коферментом в багатьох реакціях приєднання (карбоксилування). Біотин легко може вступати в стійке з'єднання з різними білками, в тому числі з ферментами та імуноглобулінами.

Авідін глікопротеїни яєць птиць та рептилій утворює з біотином надзвичайно стійкий комплекс. Зруйнувати такий комплекс можна тільки при температурній обробці, тому що авідін руйнується при нагріванні. Авідін має 4 місця зв'язування, до яких можна приєднати біотин або білки. Таким чином, комплекс біотин-авідін можна використовувати як сполучний місток між антитілами і ферментами. Для цього готується комплекс, що складається з ферменту, пов'язаного з біотином і авідіном. В утвореному комплексі три центри зв'язування авідіну пов'язані через біотин з ферментом, а четвертий залишається вільним. Комплекс формується в три етапи: – на першому етапі немічені первинні антитіла з'єднуються з антигеном,

- на другому етапі мічені біотином вторинні антитіла з'єднуються з первинними,

- на третьому додається комплекс авідін-біотин-фермент, який приєднується до біотину вторинних антитіл.

Таким чином, з одною молекулою антигену виявляються пов'язаними три молекули ферменту (рис. 30). Даний метод був названий ABC-методом (аббревіатура от англійського Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex).



Рис. 30. – Кроки розвитку методів посилення сигналу при вмявленні комплексу антиген-антитіло з ферментною міткою.

Подальший розвиток ця технологія отримала після заміни авідіну на стрептавідін – білок, який отримують з мікроорганізмів *Streptomyces avidinii* (SaBC-метод). Стрептавідін володіє такими ж здібностями пов'язувати біотин, як й авідін, але на відміну від нього він не має заряду в нейтральному середовищі, не зв'язується з ендогенними ферментами і набагато менше з ендогенним біотином. Заміна авідіну на стрептавідін дозволила підвищити чутливість методу приблизно у 8 разів. Подальшим розвитком систем візуалізації стала розробка полімерних систем. Основою систем є декстранова молекула, до якої приєднують до 20 молекул первинних або вторинних антитіл і до 100 молекул ферменту. Таким чином, одна молекула антигену виявляється пов'язаною зі 100 молекулами ферменту, що забезпечує дуже високу чутливість.

Рис. 31 – Схема посилення сигналу в ІФА з використанням молекули декстрану.



5.2.6.2 Використання хемілюмінесцентних реакцій. Хемілюмінесцентні реакції можна використовувати для отримання сигналу в ІФА, при цьому підвищується чутливість методу і скорочується час проведення аналізу, але вимірювання сигналу здійснюють вже за допомогою люменометру. В якості мітки в ІФА широко застосовують пероксидазу хрому, для її виявлення можна використовувати і різні хемілюмінесцентні реакції. Хемілюмінесцентні реакції засновані на здатності люмінолу світитися при окисленні перекисом водню. У прямому аналізі при ферментативної реакції утворюється перекис водню й окисляє люмінолу, каталізатором цієї реакції виступає пероксидаза хрому. Для посилення сигналу використовуються різні сполуки, наприклад, люциферин, феноли; в цьому випадку інтенсивність люмінесценції посилюється в 10 - 100 разів, в окремих варіантах у 500 разів (посилені хемілюмінесцентний аналіз). Люмінесцентний сигнал дуже стабільний, його рівень досягає максимуму за 30 с (для порівняння: кольорова реакція з ОФД повністю розвивається лише за 30 хв.). При непрямому аналізі люмінолом або його похідними мітаються антитіла. Така мітка у вільному стані здатна окислюватися перекисом водню з виділенням світла. Якщо вона утворила комплекс, то втрачає здатність окислюватися.

5.2.7 Точковий твердофазний імуоферментний аналіз

Останнім часом спостерігається тенденція до зниження вартості медичного обслуговування. У зв'язку з цим серед фізіологів і лікарів найбільшу популярність набувають прості методи аналізу, що не потребують дорогого обладнання. Метод ELISA також зазнав змін, став більш надійним, більш простим у виконанні і прийнятним за ціною. У модифікованому варіанті для адсорбції різних наявних у продажу антигенів замість внутрішніх поверхонь лунок мікротитрувальних планшетів, на яких не дуже ефективно зв'язуються білки, використовують нітроцелюлозні фільтри. Таку модифікацію називають dot-ELISA (крапковий твердофазний імуоферментний аналіз). У dot-ELISA мінімальні обсяги розчинів антигену або антитіл наносять на нітроцелюлозу або подібну підложку у вигляді серії точок, що дозволяє виконати набагато більше число аналізів з тією ж кількістю реагентів. Преципітуючи хромогенні субстрати, зазвичай вживані в імуоблотингу, на білому фоні нітроцелюлозних фільтрів утворюють легко помітні кольорові плями, в результаті чого відпадає потреба в дорогих фотометрах. Білий колір підложки навколо плям допомагає контролювати реакції неспецифічного зв'язування. Фільтри з результатами аналізу можуть зберігатися в темряві протягом багатьох років без втрати забарвлення. Крім того, простота і економічність відносно витрати антигенів та реагентів дозволяють здійснювати аналізи типу dot-ELISA за межами лабораторії, наприклад в домашніх або польових умовах.

Антигени. У dot-ELISA можна застосовувати різні препарати антигенів. Так, на нітроцелюлозних мембранах можна сорбувати як життєздатні або фіксовані формаліном найпростіші, так і супернатанти, отримані після руйнування клітин ультразвуком і заморожуванням-розморожуванням. З нітроцелюлозними мембранами можна пов'язувати етанольні екстракти бактеріальних препаратів, екстракти екскреторно-секреторного антигену цестод, антиген ехінококової кісти, антигени слинних залоз кліща і сінаптосомальні мембрани мозку щура. На пластиковому підложці також можна сорбувати екстракти ядер вірусів.

Нанесення антигенів на мембрану. Технологія dot-ELISA сприяє збереженню антигенності препаратів і дозволяє проводити велику кількість аналізів з обмеженою кількістю антигену. Концентровані препарати антигену, нанесені на тверду підкладку, дають чітку кольорову реакцію. Пляму антигену наносять в обсязі від 0,1 до

3 мкл. Для цієї мети найкраще підходять скляні гамільтоновські шприци об'ємом до 10 мкл і ціною поділки 0,1 мкл, що забезпечує сталість діаметра плями. У разі препаратів солюбілізованих антигенів краще використовувати мембрани з малим діаметром пір, так як на них білки зв'язуються в основному з поверхнею. Навпаки, при застосуванні цілих клітин найпростіших, що мають розміри 5-10 мкм, величина пір не грає великої ролі.

Послідовність операцій. Dot-ELISA дозволяє визначати як антигени, так і антитіла. Усі стадії інкубації і промивання виконують при кімнатній температурі. Спочатку диски з антигеном обробляють блокуючим розчином. Для цієї мети краще всього підходить 3 - 5%-вий розчин очищеного бичачого сироваткового альбуміну в сольовому триетаноламіновому буферному розчині (БСА-СТБ). Можна успішно застосовувати і цілісну кінську сироватку або 1%-ний розчин нормальної сироватки кролика в фосфатному буферному розчині з NaCl (ФСБ). При виявленні антитіл 50 мкл сироватки пацієнта в 1%-вому розчині БСА-СТБ інкубують на диску; при цьому антитіла специфічно зв'язуються з антигеном, сорбованим на диску. Потім диски тричі промивають у розчині детергенту. Для цієї мети використовують 0,05% розчин твін-20 в сольовому розчині трис-НСl. Після промивання диски інкубують з 50 мкл кон'югату афінно очищених антивидових антитіл (вторинних антитіл) з ферментом. У імуоаналізі широко використовуються кон'югати антитіл з пероксидазою, оскільки молекули цього ферменту менше молекул лужної фосфатази та їх надлишок набагато легше вимивається з реакційної суміші. Однак пероксидаза інактивується азидом натрію, використовуваним як консервант, а також ароматичними вуглеводнями, що містять хлор, присутніми в деіонізованій полістирольними смолами воді. Кон'югати з лужною фосфатазою меншою мірою схильні до дії різних речовин, але з-за великого розміру молекули ферменту вони дають більш високий фоновий сигнал.

Після відмивання незв'язаного матеріалу додають хромогенний субстрат, що преципітує. При окисленні субстрату ферментом у присутності пероксиду водню утворюється чітка пляма. У разі пероксидази субстрат, що преципітує, використовують 4-хлор-1-нафтол (4ХН), який дає блакитне забарвлення і діамінобензідін, який утворює продукт коричневого кольору. У разі лужної фосфатази в dot-ELISA застосовують 5-бром-4-хлоріндоліл-3-фосфат (БХІФ), який утворює блакитний осад. У всіх випадках інтенсивність забарвлення пропорційна кількості неспецифічно зв'язаних антитіл. При визначенні антигенів проби наносять безпосередньо на підкладку, після чого проводять імунологічну реакцію або зі специфічними антитілами і потім з кон'югатом вторинних антитіл з ферментом і хромогенним субстратом, або з кон'югатом специфічних антитіл з ферментом-маркером і субстратом. Останній спосіб дає більш чітку позитивну реакцію, особливо якщо концентрація антигену в пробі дуже мала.

У двохсайтовому dot-ELISA при визначенні антигенів спочатку на підкладку наносять специфічні антитіла. Антигени в пробі зв'язуються цими антитілами. Потім додають мічені специфічні антитіла проти іншого епітопу антигену і проводять реакцію з субстратом, що преципітує. Для таких методик характерна висока специфічність, так як при промиванні видалюються непов'язані антигени, що заважають визначенню.

Межа виявлення. Метод dot-ELISA характеризують висока чутливість, специфічність і відтворюваність. Межа виявлення специфічно пов'язаних антитіл (IgG) становить до 1 нг в пробі

Чутливість і специфічність dot-ELISA Чутливість методу складає 98%; діагностична специфічність 98%.

Відтворюваність. Трохи вище в порівнянні зі звичайним ELISA і значно краще, ніж у реакції зв'язування комплекменту (РЗК).

Поточну патогенну інфекцію можна відрізнити від минулої інфекції за допомогою dot-ELISA з клас-специфічним імуноглобуліном. IgM-специфічний dot-ELISA на лептоспіроз дозволяє виявити захворювання на кілька днів раніше, ніж застосовуваний у даний час метод мікроскопічної аглютинації. При визначенні імуноглобулінів IgM до *Toxoplasma gondii* чутливість dot-ELISA, звичайного ELISA і флуоресцентного імуноаналізу (ІФА) однакова.

Смужки мембран на пластиковій підкладці (дип-стріки.) Для скринінгу великого числа проб або в дрібносерійних аналізах запропоновано для dot-ELISA смужки нітроцелюлозних мембран на пластиковій підкладці (дипстріки). Дипстріки менше за розміром, ніж мікропланшети, і їх зручніше використовувати за межами лабораторії. Однак нітроцелюлозні смужки дуже неміцні і легко ламаються, що значно обмежує їх застосування поза лабораторією. Для подолання цього недоліку нітроцелюлозні фільтри після нанесення антигену стали наклеювати на гнучкі пластикові смужки. Отримані таким чином дипстріки зручні у користуванні і не ламаються. Дипстріки послідовно інкубують з невеликим обсягом (300 мкл) розведеної сироватки пацієнта, кон'югатом вторинних антитіла - фермент і хромогенним субстратом. Dot-ELISA на дипстріках є досить чутливий для виявлення хворих та специфічним, дозволяючи виключати з аналізу здорових людей того ж географічного регіону при масових обстеженнях.

Для обстеження великого числа людей одночасно на кілька хвороб на дипстріки наносять кілька різних антигенів. Дипстріки з чотирма різними антигенами інкубують з набором сироваток, кожна з яких дає позитивну реакцію в інших тестах тільки на одну хворобу. Мультиантигенні дипстріки володіють високою реактивністю й діагностичної чутливістю.

Пластикові картки – це третій вид оформлення dot-ELISA У цьому методі антиген наносять на білі непрозорі пластикові картки у вигляді точок, розташованих, як на звичайному мікротитрувальному планшеті. Картки можна обрізати, якщо передбачається аналізувати невелику кількість проб. Картки забезпечують високу відтворюваність результатів, а оброблені картки можна зберігати як завгодно довгий час. Попередні дані показують, що dot-ELISA на пластикових картках можна успішно застосовувати для діагностики амебіазу, токсоплазмозу, сифілісу, вірусів.

Представлені дані свідчать про можливість широкого застосування методу dot-ELISA для оцінки імунної реакції організму на інфекції та для виявлення відповідних антигенів у пробах хворих. Цей метод можна застосовувати як для аналізу сироватки однієї людини, так і для великомасштабного скринінгу проб крові. Найбільш популярною підкладкою для зв'язування антитіл або антигенів є нітроцелюлозна мембрана, яка володіє високою адсорбційною ємністю і великою площею поверхні, що дозволяє підвищити чутливість й відтворюваність аналізу в порівнянні зі звичайним ELISA на стандартних пластикових мікротитрувальних планшетах. В даний час спеціально для цього методу аналізу розробляються нові види мембран і пластиків, які мають ще більше підвищити чутливість аналізу і спростити його проведення. Великі можливості dot-ELISA і подібних імунозв'язуючих методів у визначенні антигенів або антитіл роблять ці методи перспективними для одночасного виявлення серії алергенів або венеричних захворювань. Важливою перевагою методу dot-ELISA є можливість його застосування для найрізноманітніших медичних цілей. При обстеженні населення окремих регіонів, наприклад в епідеміологічних дослідженнях, на одній нітроцелюлозній мембрані розміром з мікротитрувальний планшет можна одночасно проаналізувати сотні і тисячі проб при мінімальному витраті реагентів. При дослідженні одиничних зразків аналіз можна проводити на дипстріках або маленьких картках. Крім того, дипстріки і картки дуже зручні для аналізів в польових умовах. Мембрани з антигенами декількох типів дозволяють проводити в країнах, що розвиваються, швидко, недорого і просте обстеження населення на декілька захворювань. Всі модифікації dot-ELISA відрізняються економічною витратою реагентів, не вимагають приладів з електроживленням для реєстрації результатів, а відповідні набори дуже компактні. Dot-ELISA, мабуть, найбільш перспективний для проведення аналізів у географічно віддалених районах, де застосування більшості інших імунодіагностичних тестів неможливо через відсутність електрики, холодильної апаратури і чистої води. Подальше підвищення чутливості та ефективності аналізу можливо за рахунок застосування антигенів, отриманих генно-інженерним шляхом. Завдяки численним позитивним якостям dot-ELISA знайшов широке застосування у вигляді готових, доступних і дешевих наборів в клінічній діагностиці, ветеринарії та сільському господарстві.

Сфера застосування розробленої технології величезна. В останні роки досягнення в області виробництва моноклональних антитіл сприяло виявленню практично будь-якого бажаного аналізу, від важких металів з наркотиками, і клінічних маркерів на продовольство патогенів використанням імуноферментного.

5.2.8 Практичне застосування ІФА

ІФА знайшов широке застосування в різних областях медицини і біології завдяки відносній простоті і високій чутливості методу. ІФА успішно застосовується для:

- масової діагностики інфекційних захворювань (виявлення різних специфічних антигенів або антитіл до них);
- виявлення і визначення рівня гормонів і лікарських препаратів у біологічних зразках;
- визначення ізотипів (IgG, IgM та інші) антитіл проти конкретного антигену; виявлення імунних комплексів; виявлення онкомаркерів;
- визначення білків сироватки крові (феритину, фібронектину та ін);
- визначення загального IgE і специфічних IgE антитіл;
- скринінгу моноклональних антитіл; визначення цитокінів в біологічних рідинах.

Чутливість методу. ІФА прийшов на зміну широко використовуваним раніше в клінічній практиці методам аглютинації, преципітації і РІА. У порівнянні з вищезазначеними методами ІФА менш трудомісткий і менш тривалий за часом, зручний для виконання великого числа однотипних аналізів. У ІФА поєднується унікальна специфічність імунохімічних аналізів з високою чутливістю визначення ферментної позначки. Чутливість методу (під чутливістю мають на увазі мінімальну кількість антитіл або антигену, що виявляються) визначається наступними факторами: афінності

антитіл, переважніше використання моноклональних антитіл; специфічною активністю ферменту; інтенсивністю сигналу; чутливістю обліку сигналу. Різні варіанти ІФА розрізняються за своєю чутливістю. Окремі варіанти твердофазного ІФА дозволяють виявляти в зразку поодинокі молекули. Середня чутливість ІФА – 10^{-9} - 10^{-12} моль/л.

5.3 Імунофлуоресцентний аналіз (ІФЛА). Основи. Типи ІФЛА. Використання

В основі методів люмінесцентного аналізу лежить спільне явище – збуджені будь-яким чином молекули або атоми віддають всю енергію збудження або її частину у вигляді світла. Розбурхувати з'єднання можна ультрафіолетовим випромінюванням, наприклад, ртутної лампи. Люмінесценцію, викликану світловими квантами, називають фотолюмінесценція або флуоресценція. Саме флуоресценцію найчастіше і використовують для аналітичних цілей, хоча нерідко застосовують і люмінесценцію, що виникає при хімічних реакціях, – хемілюмінесценцію.

Флуоресценція – випускання світла, спостерігається тільки в присутності збуджуючого світла. Поняття «флуоресценція» ввів Стокс, він же сформулював закон: довжина хвилі люмінесценції (флуоресценції) більше, ніж довжина хвилі збуджуючого світла. Досліджують флуоресценцію за допомогою люмінесцентного мікроскопу.

Імунофлуоресцентний аналіз поєднує специфічність взаємодії антиген-антитіло з виявленням імунного комплексу, що утворився, за допомогою мітки, флуорохрому.

Імунофлуоресцентний аналіз використовується для:

- ідентифікації збудників інфекції у клінічних зразках – визначення антигенів;
- ідентифікація серотипу вірусів в культурі;
- визначення концентрації антитіл;
- визначення антигенних детермінант на клітинах;
- ідентифікація різних клітин;

Завдання імунофлуоресцентного аналізу – виявлення локалізації та відносного вмісту будь-якого білку для якого є специфічні антитіла. Антитіло специфічно зв'язується з шуканим білком, а флуоресцентна мітка дозволяє за допомогою флуоресцентного мікроскопа побачити імунний комплекс.

Флуоресцентний барвник ковалентно пришивається до антитіла. Він абсорбує світло певної довжини хвилі, а випромінює світло другої хвилі, світло що випускається, є видимим дослідникові.

Існують три модифікації імунофлуоресцентного аналізу.

Метод прямої імунофлуоресценції, заснований на зв'язуванні антитіл, мічених флуорохромом (наприклад, флуоресцеїном), з антигенами на поверхні або всередині мікроорганізмів. Антитіла, що зв'язались, виявляють під люмінесцентним мікроскопом (флуорохром поглинає ультрафіолетові промені і випромінює хвилі видимого діапазону).

Метод непрямой імунофлуоресценції включає два етапи: спочатку об'єкт обробляють антитілами до антигенів, характерним для даного мікроорганізму, а потім вторинними антитілами, специфічними до перших. Вторинні антитіла, мічені флуорохромами, зв'язуються з першими і виявляються під люмінесцентним мікроскопом; оскільки ж до кожного з перших антитіл можуть приєднуватися кілька вторинних, корисний сигнал посилюється. Обидва методи застосовують для виявлення вірусів у культурі клітин (наприклад, цитомегаловірусу, вірусу простого герпесу), а також для виявлення бактерій, що погано піддаються культивуванню (наприклад, *Legionella pneumophila*).

5.4 Проточна цитофлуориметрія

В основі методу проточної цитометрії лежить вимірювання параметрів кожної окремо взятої клітини. Суспензію попередньо пофарбованих флуоресціюючими барвниками (як правило, в ролі барвників виступають моноклональні антитіла, кон'юговані з флуорохромом) клітин під тиском проганяють через капіляр. Клітини, підхоплені потоком рідини, шикуються одна за одною, утворюючи "ланцюжок" – принцип гідродинамічного фокусування, завдяки якому створюються умови ламінарного потоку без перемішування суспензії клітин з рідиною, що обтікає, забезпечується збереження життєздатності клітин.

Коли такий струмінь перетинає сфокусований лазерний промінь, в точці перетину потоку і променя одночасно виявляється, як правило, тільки одна клітина, що дозволяє уникнути артефактів, пов'язаних з різною віддаленістю клітин від точки перетину лазерного променя з потоком. Високо чутливі датчики, розташовані поблизу проточної осередку, фіксують розсіювання світла під кутом від 2 до 19 °, яке називається прямим або малокутовим світлорозсіюванням (FSC) і під кутом 90° – бічне світлорозсіювання (SSC). Одночасно з цим реєструється випромінювання флуоресцентних міток (FL1, FL2, і т.д.), що має строго визначену для кожного флуорохрому довжину хвилі.

У проточному цитофлуориметрії світло перетворюється в електричні сигнали, які обробляються, і в остаточному підсумку визначається кількісна величина кожного вимірюваного параметра. Ці величини дискретизуються і передаються в комп'ютер для виведення аналізу на дисплей. Використання багатобарвного флуоцитометричного дослідження дозволяє одночасно отримати інформацію про декілька антигенах на поверхні клітин.

5.4.1 Основні компоненти проточного цитометру

1. Струменева автоматика – капіляр для рідини, гідродинамічне фокусування
2. Оптична автоматика – лазери, лінзи, дихроїчні дзеркала (кольорововибіркові дзеркала), детектори (датчики)
3. Комп'ютер – управління та аналіз.

5.4.2 Параметри, за якими проводиться імунофлуориметричний аналіз

Імуноцитофлуориметричний аналіз клітин проводиться за наступними основними параметрами:

–FSC (forward side scatter) – показник прямого світлорозсіювання, який характеризує розміри клітин;

–SSC (side scatter) – показник бічного світлорозсіювання, який відображає оптичну неоднорідність цитоплазми клітин, характер клітинних включень і гранулярність клітини. Термін "гранулярність" має специфічне цитофлуориметричне навантаження: розуміється вся сукупність утворень, що формують клітину, включаючи будь-які клітинні органели і ядро. Використання цього параметра дозволяє судити про співвідношення розмірів ядра та цитоплазми.

FL1, FL2 – канали детекції специфічного флуоресцентного сигналу барвника на різній довжині хвилі.

Аналіз інформації, що отримується по каналах світлорозсіювання, дає можливість розділити лейкоцити периферичної крові на три популяції – лімфоцити, моноцити і гранулоцити. Лімфоцити характеризуються найменшими розмірами, найбільш великі клітини – гранулоцити, моноцити займають проміжне положення за параметрами FSC. Найбільш низькі характеристики SSC мають лімфоцити, проміжні – моноцити і високі показники SSC – у гранулоцитів.

Використання декількох флуоресцентних міток дозволяють проводити одночасний двох-, триколірний і більше аналіз, так як кожен флуорохром при проходженні через промінь лазера випромінює світло різної довжини хвилі. Найбільш часто в якості фарбувальної мітки застосовується флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC), який вловлюється FL-1-детектором (перший канал флуоресценції) (зелений спектр), фікоеритрин (PE) – FL-2-детектором (жовтий спектр), менш часто –тандем ціанін-5/фікоеритрин і піридин хлорофіл (PerCp, Cy5/PE) - FL-3-детектором та алофікоціанін (APC) – FL-4-детектором. Сучасні моделі приладів можуть бути оснащені двома або більше лазерами і чотирма і більше фотопомножувачами, що дозволяє реєструвати різні флуорохроми на різних довжинах хвиль. При виборі сполучень флуорохромів для одночасного визначення декількох клітинних маркерів слід враховувати довжину хвилі джерела світла і здатність оптичної системи приладу розділяти і одночасно реєструвати сигнали від використовуваних флуорохромів.

5.4.3 Імунофенотипування клітин та визначення їхньої функціональної активності

Імунофенотипування клітин з різного біоматеріалу має величезне значення для клініциста. Дані аналізи в першу чергу дозволяють судити про морфологічну складову імунітету, тобто відповісти на запитання: "Чи достатня кількість клітин у крові та тканинах для реалізації необхідних функцій". Друге питання: "чи готові функціонально клітини до виконання тієї чи іншої задачі". Одним з найбільш частих видів досліджень в у лабораторіях імунології є визначення популяційного і субпопуляційного складу лімфоцитів периферичної крові. Це дослідження включає визначення вмісту Т-лімфоцитів, їх субпопуляцій: CD4⁺ (Т-хелперів) і CD8⁺ (цитотоксичних Т-лімфоцитів), а також В-лімфоцитів і NK-клітин. Додатково може бути досліджено зміст активованих Т-лімфоцитів (CD3⁺ HLA-DR⁺) та регуляторних Т-клітин з супресорною активністю (CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺). Оцінка функціональної активності імунокомпетентних клітин характеризує їх здатність до проліферації у відповідь на стимуляцію антигеном, секретувати цитокіни, що впливають на активацію або, навпаки, інгібування інших клітин, а також здатність вбивати інфіковані вірусом клітини.

Секреція цитокінів може бути оцінена за допомогою проточної цитометрії (внутрішньоклітинне фарбування) або методом ELISAPOT. Проліферацію Т-клітин вивчають у відповідь на автоспецифічні, пухлинні антигени, алоантигени. Це дозволяє охарактеризувати силу імунної відповіді хворого, імунологічну пам'ять і здатність відповідати на специфічні та неспецифічні антигени.

Аналіз вмісту В-лімфоцитів в крові та імуноглобулінів у сироватці крові дозволяє охарактеризувати відхилення гуморального імунітету.

5.4.4 Застосування проточної цитометрії

Коло проблем, що вирішуються за допомогою проточної цитометрії включає:

1. Якісні дослідження

–імунофенотипічний аналіз:

–діагноз і контроль злоякісних гематологічних захворювань

–діагноз і диференціальний діагноз імунодефіцитів

–контроль активності автоімунних захворювань

–контроль перед- та посттрансплантаційних станів,

–HLA-типсування;

–аналіз пухлинних клітин: антигени проліферації;

–виявлення експресії молекул адгезії

–виявлення, діагноз і контроль перебігу інфекційних хвороб (HBV, ВІЛ)

2. Кількісні визначення

1) Кількісне визначення мічених клітин і клітин з поверхневими молекулами

2) Визначення вмісту ДНК і РНК в клітинах

– аналіз клітинного циклу

– визначення апоптозу

3) Вимірювання функціональної активності клітин:

– визначення фагоцитарної і хемотаксичної активності клітин

- визначення внутрішньоклітинної концентрації кальцію та внутрішньоклітинних сигнальних молекул, внутрішньоклітинного рН
 - визначення активності ферментів та їх локалізація
- 4) Виділення / поділ клітин.

5 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 імунного 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 використовуються 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.

ТЕСТОВІ ПИТАННЯ

Перший модуль

1. Застосування реакції антигену з антитілом для визначення концентрації одного з цих реагентів:

- 1) Імуноаналіз
- 2) Аналітична імунологія
- 3) Протеоміка

2. При віднесення того чи іншого методу імуноаналізу до певного типу до уваги не приймається:

- 1) основний принцип;
- 2) система поділу (може включати твердий носій для одного з реагентів);
- 3) тип мітки, що застосовується для контролю реакції зв'язування;
- 4) тип реакції і система детектування
- 5) буферні системи відмивання

3. В яких методах імунного аналізу не використовують моноклональні антитіла?

- 1) РІА.
- 2) ІФА.
- 3) преципітації та аглютинації.

4. Імуносорбент – це що?

- 1) матеріал, до якого сорбують антиген, або антитіла;
- 2) носій комплексів антиген-антитіло;
- 3) носій з сорбованими або приєднаними тим чи іншим шляхом антигеном або антитілами;

5. Що з перерахованого не використовується у імунному аналізі в якості носія:

- 1) гранули (наприклад, активованого полістиролу);
- 2) мікропланшети або смужки (наприклад, полістирольні);

3)[#] агароза.

6. В якості міток для контролю реакції антиген - антитіло найчастіше використовують:

- 1)[#]частки (наприклад, еритроцити, латекси);
- 2)[] радіонукліди (наприклад, йод-125, тритій);
- 3)[] ферменти

7. Біозонд в імунному аналізі – це?

- 1)[] зчитувач;
- 2)[] сорбент;
- 3)[#]антиген або антитіло з міткою.

8. До прямих методів визначення утворення комплексів антиген-антитіло відносяться:

- 1)[#]реакції преципітації;
- 2)[#]реакції аглютинації;
- 3)[] імуоферментний аналіз;
- 4)[] радіоактивний аналіз.

9 Антигенні детермінанти це (знайдіть невірну відповідь):

1)[] ділянки антигенів, що здатні взаємодіяти зі специфічними рецепторами лімфоцитів та індукувати тим самим імунну відповідь;

- 2)[] ділянки антигенів, що взаємодіють з антигензв'язуючими центрами специфічних антитіл;
- 3)[] паратоп;
- 4) [#]всі відповіді вірні.

10. Валентність антигенів визначає?

- 1)[#]кількість антигенних детермінант (епітопів, сайтів);
- 2)[] молекулярна маса;
- 3)[] фізико-хімічний стан;

11. Антигензв'язуючий сайт антитіл це (найдіть невірну відповідь):

- 1)[] ділянки, що вибірково, специфічно взаємодіють з антигенною детермінантою, яка індукувала їхній синтез
- 2)[#]константний домен.

12. Валентність антитіл визначається(знайдіть невірну відповідь):

- 1)[] кількістю паратопів;
- 2)[] кількістю антигензв'язуючих сайтів;
- 3) [#]структурою важких ланцюгів.

13. Вторинні антитіла це?

- 1)[] антитіла як антигени при імунізації тварин;
- 2) [#]антитіла, які отримують при імунізації тварин імуноглобулінами іншого виду;

14. Вторинні антитіла специфічні до:

- 1)[] антигензв'язуючих сайтів антитіл ;
- 2)[#]Fc-фрагменту того класу імуноглобулінів, яким імунізували тварини;
- 3)до важких ланцюгів любого класу імуноглобулінів.

15.Антитіла проти IgG людини не здатні розпізнавати:

- 1)[#]IgM, IgA ;
- 2)IgG.

16. Антивидові антитіла (вторинні антитіла) використовуються:

- 1) [#]в непрямих методах імунного аналізу;
- 2)[] у прямих методах імунного аналізу.

17. Специфічність антитіл це показник чого?

- 1)[#]наскільки вибірково вони взаємодіють з молекулами антигенів певного типу;
- 2)[] утворювання їх при первинній або вторинній імунній відповіді;
- 3)[] який клас вони представляють.

18. Специфічність антисироватки визначається?

- 1)[#]безліччю специфічностей антитіл, які вона містить;
- 2)[] класом імуноглобулінів;
- 3)[] авідністю антитіл, які вона містить.

19. Як одержують антитіла?

- 1)[#]шляхом імунізації тварин відповідними антигенами;
- 2)[] виділяють з крові людини або тварини, що перенесли певне інфекційне захворювання;
- 3)[] їх синтезують з використанням генної інженерії.

20. Моноклональні антитіла-це?

- 1)[] антитіла, всі антигензв'язуючі центри яких взаємодіють тільки з одним антигеном, його детермінантами;
- 2) [#]антитіла, отримані за допомогою гібридомної технології.

21. Чому у деяких схемах імуноаналізу застосування поліклональних антитіл дозволяє досягти кращих результатів?

- 1)[#]поліклональні антитіла здатні пов'язувати не одну, а практично всі наявні на визначуваній молекулі речовини антигенні детермінанти;
- 2)[] представляється можливим значно підвищувати вміст таких антитіл у системі.

22. Що є єдиним свідченням взаємодії антиген-антитіло?

- 1)[#]утворення імунного комплексу антиген-антитіло;

2) [] зниження вмісту вільних антитіл та антигену.

23. Імунопреципітація – це?

1) [#] сполучення розчинних антитіл з розчинним антигеном з утворенням нерозчинних комплексів;

2) [] утворення осаду антигену або антитіл у розчині.

24. Агломінація – це?

1) [#] формування решітки з утворення великих, видимих агрегатів корпускулярними антигенами у присутності специфічних антитіл;

2) [] утворення осаду корпускулярним антигеном у розчині

25. Класичну реакцію преципітації характеризують наявністю (знайдіть невірну відповідь):

1) [] стану надлишку вмісту антитіл – прозона;

2) [] еквівалентного співвідношення вмісту антиген-антитіла зона еквівалентності;

3) [] стану надлишку вмісту антигену постзона;

4) [#] усі відповіді вірні.

25. Кількісний вимір реакцій преципітації у розчинах здійснюється за допомогою (знайдіть невірну відповідь):

1) [] нефелометрії;

2) [] турбодиметрії;

3) [#] спектрофотометрії.

26. Перераховані методи це методи преципітації в гелі (знайдіть невірну відповідь)?

1) [] радіальна імунодифузія за Манчини;

2) [] подвійна імунодифузія за Оухтерлоні;

3) [] імуоелектрофорез;

4) [#] всі відповіді вірні.

27. Назвіть метод преципітації, що дозволяє виявити наявність типу важких та легких ланцюгів при моноклональних гамапатіях:

1) [] електрофорез білків сироватки крові;

2) [] зональний імуоелектрофорез;

3) [] ракетний імуоелектрофорез;

4) [#] електрофорез з імуофіксацією.

28. Межа чутливості методів преципітації в гелі?

1) [#] 5 мкг/мл;

2) [] 1 мкг/мл;

3) [] 20 мг/мл.

29. Значення валентності імуноглобулінів в імуохімічному аналізі?

1) [#] валентність визначає преципітуючі, аглютиніруючі або лізуючі властивості антитіл по відношенню антигенів;

2) [] не має ніякого значення.

30. Міцність взаємодії антигенсднальних центрів і антигенних детермінант відображує поняття:

1) [] авідність;

2) [#] афінність.

31. Загальна сумарна характеристика зв'язування антитіл з антигеном у даній тест-системі, називається?

1) [#] авідність;

2) [] афінність.

32. Для більшості методів імуоаналізу використовують:

1) [#] тільки гама-глобулінову фракцію сироватки крові;

2) [] моноспецифічну сироватку;

3) [] моноклональні антитіла.

33. В основу якого методу кількісного визначення антигену покладене допущення: площа, обмежена кінцевою лінією преципітації, пропорційна кількості антигену, внесеного в гель?

1) [#] ракетний імуоелектрофорез, радіальна імунодифузія;

2) [] метод Оухтерлоні.

34. При визначенні імуноглобулінів методом РІД стандартна крива будується:

1) [#] для кожної пластинки щораз;

2) один раз для серії анти сироваток.

35. Чому імуоелектрофорез проводять при рН 8,6?

1) [] досягається максимальна електрофоретична рухливість антитіл і антигену;

2) [#] у цих умовах антитіла, що внесені до гелю, не переміщуються.

36. Що являє собою гемолітична система?

1) [] антитіла до еритроцитів;

2) [#] сенсibilізовані еритроцити, тобто еритроцити та антитіла до їхніх поверхневих антигенів;

3) [] еритроцити, антитіла до них і сироватка з комплементом.

Другий модуль

37. Як називається метод, у якому антитіла, зв'язані з твердою фазою, інкубують з визначеною кількістю міченого ферментом АГ у присутності й відсутності досліджуваної проби?

1) [] неконкурентний ІФА;

2) [#] конкурентний ІФА;

3) [] імуоферментний аналіз (ІФА).

38. Як називається метод, у якому антитіла, зв'язані з твердою фазою, інкубують із пробою, що містить антиген, відмивають, інкубують з кон'югатом антитіло-фермент?

- 1) [] конкурентний ІФА;
- 2) [] неконкурентний ІФА;
- 3) [#] сендвич-ІФА.

39. Чи маються розходження між методом "сендвич-ІФА і методом "подвійних антитіл?

- 1) [] так;
- 2) [#] ні.

40. Як називається метод, заснований на використанні специфічності імунологічної реакції і чутливості флуоресцентної мікроскопії?

- 1) [] хемілюменісценції;
- 2) [] флуориметрії;
- 3) [#] імунофлуориметричний.

41. Чутливість антиглобулінових сироваток залежить від?

- 1) її концентрації у тест-системі;
- 2) кінцевої концентрації специфічного антигену;
- 3) [#] від титру антисироватки.

42. При використанні комерційних наборів з антиглобуліновими антитілами однієї і тієї ж фірми, титри антитіл між партіями:

- 1) [] не відрізняються;
- 2) [#] відрізняються.

43. Розведені розчини антитіл стійкі при умовах зберігання при 4°С

- 1) [#] кілька днів
- 2) [] не підлягають збереженню,
- 3) [] на протязі доби

44. Відмінна риса імуноферментного аналізу:

- 1) [#] як індикаторна молекула, що дозволяє визначити наявність імунного комплексу, використовується фермент;
- 2) [] сорбція антигену або антитіл на твердій фазі;
- 3) [] відсутність аналітичних помилок.

45. У чому недоліки використання полістирольних або полівінілових багатолункових плашок у ІФА?

- 1) [] не дозволяють проводити фотометрію фарбованих сумішей;
- 2) [] не забезпечують можливість автоматизації всіх операцій методу;
- 3) [#] можливості прояву крайового ефекту, десорбції антигену або антитіл, нерентабельність використання для одиночних аналізів.

46. Які недоліки в кон'югатах з пероксидазою хрому?

- 1) [] відносна легкість очищення
- 2) [] досить висока стабільність,
- 3) [] велике число хромогенних і флуорохромних субстратів.
- 4) [#] токсичність деяких хромогенних субстратів, їхня дорожнеча

47. Які недоліки є в кон'югатах з лужною фосфатазою та бета галактозидазою?

- 1) [] слабка розчинність розчинність;
- 2) [] токсичність субстратів;
- 3) [] неможливість використання недорогих флуорогенних субстратів;
- 4) [#] обмежений вибір субстратів.

48. Чим слід керуватися при виборі субстрату у ІФА (найдіть невірну відповідь)?

- 1) [#] зовнішнім виглядом;
- 2) [] високою питомою хромофорною активністю (високий коефіцієнт молярної екстинкції пофарбованого кінцевого продукту);
- 3) [] розчинністю субстрату і продуктів його ферментативної модифікації в умовах проведення аналізу;
- 4) [] стабільністю субстратів при збереженні й у процесі експерименту;
- 5) [] токсичністю.

49. Зміни фізико-хімічних властивостей мембрани або іншого носія, зв'язаного з антитілами або антигенами при утворенні імунного комплексу, що виявляються за допомогою спеціального електрода або оптичного пристрою, лежать в основі:

- 1) [#] імуносенсорних методів;
- 2) [] імуноблотингу;
- 3) [] усі відповіді вірні.

50. Якому виду ІФА характерні перераховані переваги: , займає хвилини і навіть частки хвилин; має одну стадію; не вимагає трудомістких промивання; вимагає мінімальних обсягів і кількостей біологічного або клінічного зразка (8-50 мкл)?

- 1) [] [#] гомогенний;
- 2) [] [] гетерогенний.

51. Чутливість імуноферментного аналізу:

- 1) [] нижче за РІА;
- 2) [] нижче за ІФЛА;
- 3) [#] приблизно дорівнює РІА та ІФЛА.

52. Кількісна імунологічна процедура, в якій реакції Ag-Ab контролюється вимірюванням активності ферменту, називається:

- 1) [] IФА;
- 2) [] імунний аналіз.

53. Кількісна імунологічна процедура, в якій утворення реакції Ag-Ab контролюється вимірюванням радіаційної активності називається?

- 1) [] радіоімуноалергосорбентний тест;
- 2) [] IФЛА;
- 3) [] PIA.

54. Перший скринінг-тест для діагностики ВІЛ-інфекції?

- 1) [] РНГА;
- 2) [] латекс аглютинації;
- 3) PIA;
- 4) [] IФА

55. Основний принцип ELISA (знайдіть неправильне твердження)?

1) [] специфічна реакція антиген-антитіло на поверхні твердої фази детектується ферментом у складі комплексу;
 2) [] фермент перетворює безбарвний субстрат (хромоген) у кольоровий продукт, що свідчить про зв'язування антигену і антитіла;

3) [] кольорове фарбування тест системи - свідчення відсутності комплекс антиген-антитіло;

56. Матеріали, в яких немає необхідності при постановці IФА?

- 1) [] зразок, що тестується;
- 2) [] антитіла (1-і та 2-і);
- 3) [] імуносорбент;
- 4) [] дистильована вода.

57. За допомогою IФА можливо дослідити (найдіть невірну відповідь)?

- 1) [] сироватку;
- 2) [] СМР;
- 3) [] структурну організацію білків.

58. Види IФА (знайдіть помилку):

- 1) [] твердофазний, гетерогенний;
- 2) [] гомогенний;
- 3) [] конкурентний;
- 4) [] неконкурентний;
- 5) [] усі відповіді вірні;
- 6) [] усі відповіді невірні.

59. Назвіть вид IФА у якому, зміст комплексу антиген-антитіло-фермент у зворотній залежності від концентрації антигену в зразку:

- 1) [] прямий;
- 2) [] непрямий;
- 3) [] сендвич;
- 4) [] конкурентний.

60. Назвіть вид IФА у якому наявність антигену визначають за допомогою мічених антитіл, а наявність антитіл – за допомогою міченого антигену:

- 1) [] непрямий;
- 2) [] сендвич;
- 3) [] конкурентний;
- 4) [] прямий.

61. Назвіть вид IФА: антиген сорбується на твердій фазі, інкубують з сироваткою пацієнта, додаються мічені антитіла до імуноглобулінів людини; інтенсивність забарвлення прямо пропорційна змісту антитіл в зразку.

- 5) [] непрямий;
- 6) [] сендвич;
- 7) [] конкурентний;
- 8) [] прямий.

. Назвіть вид IФА: антиген зразку зв'язується з антитілами сорбованими на твердій фазі лунок планшету і іммобілізується; антитіло-фермент зв'язується з іммобілізованим в лунках антигеном, формується послідовність антитіла-антиген-антитіло-фермент; концентрація продукту ферментативної реакції прямо пропорційна концентрації антигену в стандартах або зразках?

- 1) [] Непрямий;
- 2) [] сендвич;
- 3) [] конкурентний;
- 4) [] прямий.

63. Який вид IФА використовують для визначення антигенів, представлених пухлинними маркерами, гормонами і білками сироватки крові

- 1) [] непрямий;
- 2) [] сендвич;

3) [] конкурентний;

4) [] прямиий.

64. Назвіть можливі джерела помилок при постановці ІФА:

1) [] час інкубації;

2) [] температура інкубації;

3) [] недостатнє відмивання лунок після операцій внесення реагентів;

4) [] надмірна відмивання лунок після внесення реагентів;

5) [#] усі відповіді вірні;

6) [] всі відповіді невірні.

65. Який з перерахованих ферментів не використовують у ІФА?

1) [] пероксидаза хрому (найбільш часто використовується);

2) [] лужна фосфатази у β -галактозидаза;

3) [#] супероксиддисмутаза.

66. Яка властивість субстратів виключає їхнє використання в ІФА?

1) [] після перетворення ферментом продукти реакції сильно забарвлює розчин;

2) [#] продукт реакції утворює забарвлений осад.

67. Позначте невірну вимогу до плейти у ІФА:

1) [#] лунки U-образні;

2) [] лунки плоскодонні;

3) [] 96 лунок

4) [] з одного боку плейти марковані літерами в алфавітному порядку, з іншого цифрами

5) поставляються в комплекті з китами.

68. Позначте помилку при підготовці сироватки для ІФА:

1) [] збір крові в пробірку, яка не містить жодних хімічних речовин або антикоагулянтів;

2) [#] збір крові в пробірку, яка містить комплексоми кальцію.

69. При кількісному визначенні якого класу імуноглобулінів за допомогою ІФА розраховують відношення оптичної щільності зразка до оптичної щільності позитивного контролю; тест позитивний, якщо відношення більш за 1, 0, при значенні відношення 0,8-1,0 – результат сумнівний?

1) [] gG;

2) [] IgA;

3) [#] IgM.

70. Що таке Кат-офф (Cut-off)?

1) [#] межі діапазону значень норми для 90% населення, значення вище - результат позитивний, нижче нижньої негативний, але у 10% населення позитивний;

2) [] значення зразка, що дорівнює значенню стандарту.

71. Чи вірно перераховані переваги ELISA, позначте пункт, з яким Ви не згодні:

1) [] реагенти відносно дешеві і мають тривалий термін зберігання;

2) [] ELISA досить специфічний і чутливий;

3) [] легко і швидко виконувати процедури;

4) [] обладнання може бути недорогим і широко доступним;

5) [#] ІФА не може бути використаний для діагностики збудників інфекцій.

72. В основі методів люмінесцентного аналізу лежить:

1) [] віддача енергії збудження у вигляді світла;

2) [] флуоресценція;

3) [] хемілюмінесценція;

4) [#] всі відповіді вірні;

5) [] всі відповіді невірні;

73. Імунофлуоресцентний аналіз базується на:

1) [] специфічної взаємодії антиген-антитіло (ключ-замок);

2) [] використанні у якості мітки антитіл або антигенів флуорохромів;

3) [] явищі флуоресценції;

4) [] всі відповіді невірні;

5) [#] всі відповіді вірні.

74. Посилення сигналу в ІФА з використанням люмінолу досягається завдяки:

1) [] флуоресценції;

2) [#] хемілюмінесценції;

3) [] фотоломінесценції.

75. Проточна цитометрія – метод, що дозволяє визначити (знайдіть невірну відповідь):

1) [] розмір клітин;

2) [] гранулярність;

3) [] фенотип;

4) [#] всі відповіді вірні.

ТЕМИ РЕФЕРАТІВ

1. Імунодіагностика вірусних гепатитів

2. Імунодіагностика інфекцій, що передаються статевим шляхом

3. Імунодіагностика TORCH інфекцій
4. Теоретичні основи методів преципітації та аглютинації; використання методів в медико-біологічних дослідах
5. Імунодіагностика туберкульозу
6. Імунодіагностика ВІЛ
7. Імунодіагностика алергій першого та другого типів
8. Імунодіагностика алергій третього та четвертого типів
9. Теоретичні основи імуноферментного аналізу
10. Теоретичні основи проточної цитометрії
11. Методи діагностики інфекційних захворювань
12. Методи діагностики автоімунних захворювань
13. Теоретичні основи імунофлуориметрії
14. Антитіла як головний інструмент імуного аналізу. Види антитіл. Поліспецифічні, моноспецифічні сироватки, одержання, властивості
15. Імуносенсорний аналіз. Імуносенсори. Принцип роботи, можливості, використання.

Питання до заліку

1. Завдання лабораторної імунології
2. Імунний аналіз. Визначення поняття, фактори, що визначають тип імуного аналізу (назвіть шість факторів)
3. Три основні групи методів сучасного імуного аналізу відповідно до принципів, що лежать в їхній основі: конкурентне зв'язування, неконкурентне зв'язування, нерівноважний режим
4. Загальна характеристика групи методів імуного аналізу, що засновані на принципі конкурентного зв'язування
5. Загальна характеристика групи методів імуного аналізу, що засновані на принципі неконкурентного зв'язування
6. Загальна характеристика методів імуного аналізу, що засновані на принципі нерівноважного режиму (нерівноважний імуноаналіз з контрольованим надлишком реагентів).
7. Стандартні препарати в імуному аналізі. Поняття
8. Антитіла як реагенти імуного аналізу (види антитіл, що використовують в імуному аналізі)
9. Поліклональні антисироватки як стандартний препарат у імуному аналізі (характеристика можливостей)
10. Моноклональні антитіла як стандартний препарат імуного аналізу (характеристика можливостей)
11. Гомогенні та гетерогенні методи імуного аналізу, носії у твердофазних методах.
12. Мітки, класифікація імуного аналізу за типом мітки
13. Методи визначення мічених сполук
14. Класифікація за способом здійснення аналізу
15. Подальший розвиток методів імуного аналізу
16. Класифікація методів імуного аналізу за способом детекції утворених комплексів антиген-антитіло
17. Прямі методи, з використанням мітки, імуносенсорні методи
18. 1 – а група – прямі методи визначення реакції антиген-антитіло (реакції преципітації та аглютинації)
19. 2-а група методів визначення реакції антиген-антитіло (методи з використанням мітки)
20. 3- група методів визначення реакції антиген-антитіло – імуносенсорні методи
21. Що визначають терміном «антиген» в імуному аналізі. Класи антигенів та їхнє походження.
22. Властивості антигенів як індукторів імуної відповіді
23. Детермінанти, епітопи, валентність антигенів. Гаптени
24. Антитіла. Природа та структура молекули антитіл
25. Типи антитіл
26. Характеристики антитіл: валентність антитіл, авідність, афінність антитіл, специфічність
27. Антитіла як імуногени. Вторинні антитіла.
28. Одержання антитіл. Методи імунізації тварин.
29. Динаміка синтезу антитіл. Первинна та вторинна імуна відповідь
30. Поліспецифічні та моноспецифічні сироватки. Перехресно-реагуючі антитіла
31. Властивості поліклональних антисироваток
32. Поняття титру антитіл
33. Загальні принципи роботи з антитілами
34. Моноклональні антитіла
35. Химерні та гуманізовані антитіла
36. Вибір методів імуноаналізу за участю антитіл
37. Загальна характеристика реакції антиген-антитіло. Фактори, що впливають на прояв реакцій антиген-антитіло
38. Феномени перебігу реакції антиген-антитіло (первинний, вторинний третинний) та методи їхнього дослідження
39. Фактори, що визначають можливість реакції зв'язування антиген-антитіла
40. Реакції преципітації й методи, засновані на реакції преципітації. Реакції преципітації в розчині
41. Реакція імуопреципітації в розчині. Теорія решіток. Зони утворення решітки. Крива реакції преципітації: прозона, зона еквівалентності, постзона. Практичне значення наявності зон преципітації.
42. Основні фактори, що впливають на утворення імуопреципітата. Копреципітація
43. Методи преципітації у розчинах. Недоліки методів прямої преципітації в розчинах
44. Вимірювання преципітації за розсіюванням світла. Нефелометрія та турбодиметрія
45. Імуопреципітація в гелі. Основний принцип імуопреципітації у гелі. Умови утворення смуг преципітації.
46. Основні варіанти імунодифузії в гелі
47. Фактори, що впливають на утворення преципітатів у гелі
48. Методи імунодифузії в гелі.

49. Проста одномірна дифузія за Уоденом. Метод подвійної радіальної імунодифузії за Оухтерлоні
50. Застосування методу подвійної радіальної імунодифузії
51. Радіальна імунодифузія: принцип постановки прямої і непрямой реакції, кількісна оцінка результатів, переваги і недоліки методу.
52. Імуноелектрофорез: принцип методу
53. Ракетний імуноелектрофорез Ракетний імуноелектрофорез
54. Імуноелектрофорез з імунофіксацією.
55. Метод імуного фарбування: вестер-блот: принцип методу, постановка, переваги і недоліки
56. Методи аглютинації. Теорія решіток відносно утворення аглютинатів.
57. Активна та пасивна аглютинація.
58. Реакції гемаглютинації, латекс аглютинації. Фактори, що впливають на прояви аглютинації
59. Якісні та кількісні аглютинаційні тести
60. Антиглобуліновий тест Кумбса (прямий)
61. Непрямий тест Кумбса
62. Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА)
63. Реакція пасивної, або непрямой, гемаглютинації
64. Реакція зв'язування комплементу (РЗК)
65. Реакція радіального гемолізу еритроцитів
66. Радіоімуний аналіз (RIA). Принцип методу. Можливості, переваги, недоліки
67. Імуноферментний аналіз. Загальні положення
68. Класифікація ІФА
69. Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА. Ферменти
70. Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА. Субстрати
71. Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА. Кон'югат, вимоги до кон'югату
72. Вимірювання ферментативної активності в ІФА
73. Інтерпретація результатів ІФА. Методи вираження концентрації антигену
74. Інтерпретація результатів ІФА. Методи вираження концентрації антитіл
75. Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА. Тверда фаза
76. Імуносорбент, поняття. Формування імуносорбенту в ІФА
77. Основні принципи постановки твердофазного імуноферментного аналізу
78. Прямий ІФА. Схема постановки, використання
79. Непрямий ІФА. Основні етапи непрямой ІФА для визначення антитіл
80. Непрямий ІФА. Схема постановки при визначенні IgG
81. Непрямий ІФА. Схема постановки при визначенні IgM
82. Схеми ІФА для виявлення антигенів. «Сендвич» – варіант ІФА для виявлення антигенів
83. Конкурентний ІФА, принцип постановки при визначенні антигенів
84. Методи визначення секреторної активності імунокомпетентних клітин. Метод імуноферментних плям (ELISPOT)
85. Системи посилення сигналу в ІФА. Системи на основі взаємодії авідін-біотин (ABC-метод)
86. Системи посилення сигналу в ІФА. Системи на основі взаємодії стрептавідин-біотин (SaBC-метод)
87. Системи посилення сигналу в ІФА, використання молекул декстану.
88. Практичне застосування ІФА
89. Імуноаналіз в кабінеті лікаря і вдома. Методи з використанням аглютинації
90. Імуноаналіз в кабінеті лікаря і вдома. Методи з використанням імунофільтрації.
91. Методи імунофлуоресценції. Імунофлуоресцентний аналіз. Використання.
92. Флуоресцентні барвники.
93. Прямий і непрямий імунофлуоресцентний аналіз. Використання. Переваги. Недоліки
94. Проточна цитометрія. Проточні цитофотометри, принцип роботи.
95. Проточна флуориметрія і сортування клітин. Основи методу.
96. Основні компоненти проточного цитометру.
97. Основні параметри, за якими проводиться імуноцитофлуориметричний аналіз клітин.
98. Принцип визначення фенотипу імунокомпетентних клітин за допомогою проточної цитофотометрії
99. Клінічне застосування проточної цитометрії.
100. Клінічне застосування проточної цитометрії: якісні визначення.
101. Основи імунохроматографічного аналізу. Використання у експрес-аналізах на дому.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна:

1. Антитела. Методи. Книга 1. / Под ред. Кетти. – М.: Мир, 1990. – 287 с.
2. Антитела. Методи. Книга 2. / Под ред. Кетти. – М.: Мир, 1990. – 384 с.
3. Михайлов АХ, Смирский В.Н. Методы иммунохимического анализа в биологии развития. – М.: Наука, 1991 – 279 с.
5. Новые методы иммуноанализа. / Тертон М., Бангхем Д.Р., Колкотт К.А. / Под ред. У.П. Коллинза. – М.: Мир, 1991. – 280 с.
6. Полак Дж., Ван Норден С. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. – М.: Мир, 1987. – 74 с.
7. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение. /Под ред. Н. Акцельсона, Й. Крелль, Б. Вееке. – М.: Мир, 1977. – 216 с.

8. Иммуноферментный анализ. /Под ред. Т. Нго и Х.М. Ленхоффа.– М.:Мир, 1988. – 223 с.
9. Теория и практика иммуноферментного анализа. / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.
9. Лакович Дж. Основы флуоресцентной микроскопии. – М.: Мир,1986. – 488с.
10. Биосенсоры: основы и положения. / Под ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. – М.: Мир, 1992. – 612с.

Додаткова

1. Карнаузов В.Н. Люминисцентный анализ клетки. – Пушкино, 2002. Электронный ресурс: <http://cam.psh.ru>: Р.В. Гуркин
2. Чард Т. Радиоиммунохимический анализ. – М.: Мир, 1981. 248 с.
3. Ярилин А. А. Основы иммунологии. – М.: Медицина, 1999. – 604 с.

Сторінки інтернет

1. <http://www.protocol-online.org/prot/Immunology/>
2. <http://mitchison.med.harvard.edu/Protocols.htm>
3. http://www.biolinks.net.ru/Methods_and_Protocols/Immunology/

ЕТАЛОНИ ВІДПОВІДЕЙ ДО ТЕСТОВИХ ПИТАНЬ

П	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
В	1	5	3	3	3	1	3	1,2	4	1
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
В	2	3	2	2	1	1	1	1	1	2
П	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
В	1	1	1	4	3	4	4	1	1	2
П	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
В	1	1	1	1	2	2	2	3	2	3
П	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
В	3	2	1	1	3	4	4	1	1	1
П	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
В	3	1	3	4	3	4	3	6	4	4
П	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
В	1	2	2	5	3	2	1	2	3	1
П	71	72	73	74	75					
В	5	4	5	2	4					

Навчальне видання
(українська мова)

Колісник Надія Василівна
Омельянчик Людмила Олександрівна

Методи лабораторної імунології

Навчальний посібник
для спеціалістів на магістрів біологічного факультету

Рецензент *В.О.Лях*
Коректор *Н.В. Колісник*
Відповідальний за випуск *Н.В. Колісник*