

ПРОТОКОЛ № 4

ЕНЗИМНИ МЕТОДИ, ОСНОВАНИ НА ФЕНОМЕНА ПРЕЦИПИТАЦИЯ - РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИЯ

1.Определение – вид имунна диагностична реакция, при която разтворими антигени се свързват с хомоложни антитела, като получените комплекси антиген-антитяло в присъствие на електролит (0,9% NaCl) образуват видими преципитати (неразтворими утайки). Този феномен се наблюдава в зоната на еквивалентни съотношения между реагиращите молекули на антигените и антителата. Антигените се нарича преципитогени, съответните антитела – преципитини, комплексите антиген-антитяло – преципитати, а реакцията – преципитация.

ВАЖНО:Основните различия между реакция аглутинация и преципитация са свързани със свойствата на антигена и с видимия феномен. При реакция преципитация антигените са с големина на белтъчни молекули, намиращи се в колоидно състояние. Взаимодействието между преципитогените и преципитините протича с голяма скорост (секунди), но е необходимо много по-дълго време (24-48 часа) за пълно утаяване на комплексите антиген-антитяло и визуализиране на реакцията. За да се избегнат грешки при отчитане на крайния продукт всички реактиви (антигени и антитела) трябва да са напълно бистри.

2.Видове преципитационни реакции:

Реакция преципитация може да се извърши в течна среда или в агар, спонтанно или под влияние на електрическо поле, поради което са възможни различни технически постановки.

А.ПРЕЦИПИТАЦИЯ В ТЕЧНА СРЕДА

●Реакция преципитация в епруветка

Технологична постановка: Разтвор на антиген се наслоява внимателно върху серум, поставен в тясна епруветка (с диаметър 4 mm). При положителна реакция на границата между двете течности се появява бял преципитационен пръстен.

Понастоящем този метод има ограничено приложение, поради проблеми при техническото изпълнение на реакцията. Използван е във ветеринарната медицина под названието пръстенна термопреципитация по Асколи (Ring-тест) за диагностика на антракс, в съдебната медицина при определяне на видовата принадлежност на кръвни петна, сперма и други биологични материали, както и в санитарната практика за доказване на примеси в мляко, месни продукти и тестени изделия.

Б.ПРЕЦИПИТАЦИЯ В АГАР (ИМУНОДИФУЗИЯ)

Основната функция на агара е локализация на преципитата в инертен носител. Отделните компоненти на реакцията дифундират в агара с различна скорост, в зависимост от големината на молекулите и тяхната концентрация. Там, където антигените и антителата се срещат в оптимално количествено съотношение (еквивалентни концентрации) се образуват преципитационни линии.

За количествено и качествено определяне на антигени се използва проста или двойна имунодифузия. В първия случай дифундира един от компонентите, а във втория – и двата компонента. В зависимост от това дали дифузията се извършва по една обща ос или във всички посоки, реакцията се означава като линейна или радиална дифузия.

●Проста линейна имунодифузия в епруветка

Технологична постановка: Реакцията се извършва в епруветка с прав слой агаров гел, съдържащ антитела. Разтвор на изследвания антиген се наслоява внимателно по стената на епруветката. Антигените дифундират в агара, свързват се с хомоложни антитела и се образуват мътно бели преципитати.

●Двойна имунодифузия по Ухтерлони

Технологична постановка: В равномерен слой агаров гел се изрязва един централен резервоар (ямка с диаметър 2 mm), а около него на равни разстояния още няколко периферни ямки със същата големина. Обикновено в централната ямка са накапват антитела, а в периферните – разтвори на различни антигени, но е възможна и обратната постановка. Антигените и антителата дифундират радиерно в агара и при наличие на хомоложност се образуват преципитационни линии. Наличието на пространствено разделени преципитати дава възможност за анализ на многокомпонентни антигени.

Важно предимство на метода е възможността за сравнителен анализ на антигените. Възможни са три варианта на преципитационните линии: (А) Двете линии напълно се сливат – идентичност на антигените. (Б) Двете линии се пресичат – неидентичност на антигените. (В) Едната от преципитационните линии е по-дълга от другата и образува т. н. „шпора” – частична идентичност, т.е. двата антигена имат някои общи детерминанти.

Двойна имунодифузия по Ухтерлони се използва за качествени анализи, напр. за проверка чистотата на биопрепарати, за оценка ефективността на имунизациите и др.

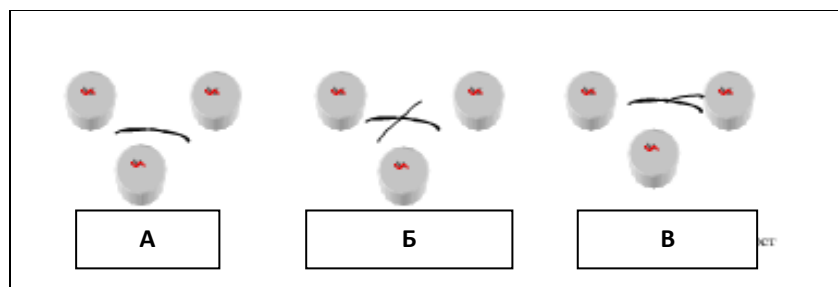


Схема на двойна имунодифузия по Ухтерлони: А – зона на идентичност; Б – зона на неидентичност; В – зона на частична идентичност

●Радиална имунодифузия по Манчини

Технологична постановка: В равномерен слой агаров гел, съдържащ специфични антитела, се изрязват ямки с диаметър 2 mm. В тях се накапват различни антигени. Антигените дифундират в агара и взаимодействат с намиращите се в него специфични антитела. Около ямките се образуват различни по големина преципитационни пръстени. Разстоянието, което изминава даден антиген при постоянна концентрация на антителата в агара, зависи от количеството антиген. Колкото по-голямо е количеството на антигена в тествания материал, толкова по-голям е диаметърът на пръстена.

При подходяща калибрация, може да се определи точното количество на антигените на базата на диаметрите на преципитационните пръстени. За калибрация се използва антиген с позната концентрация (тест-Ag), който приложен в различни разреждания служи за построяване на стандартна калибрационна крива.

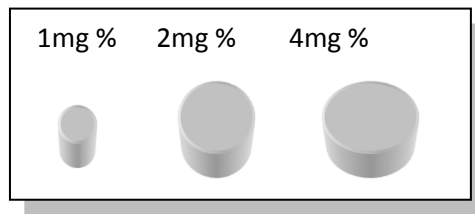


Схема на радиална имунодифузия по Манчини

Радиалната имунодифузия по Манчини се прилага за количествено измерване на IgA, IgM, IgG, компоненти на комплемента и други вещества в серум и други биологични течности.

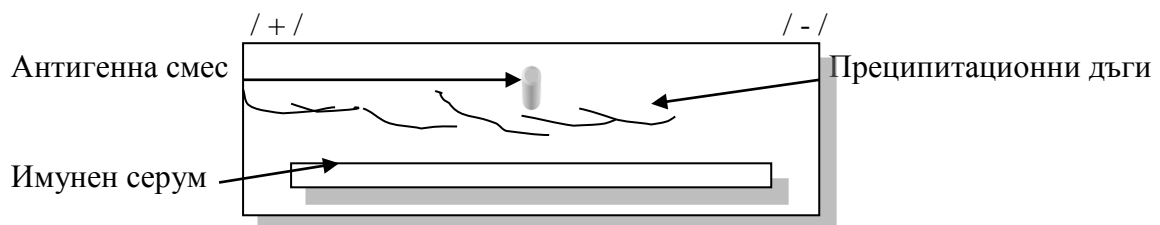
В. ПРЕЦИПИТАЦИЯ В АГАР С ЕЛЕКТРИЧЕСКО ПОЛЕ

• Имуноелектрофореза тип Грабар

Принцип: Този метод е комбинация от електрофореза в агаров гел и двойна имунодифузия. Използва се за разделяне и идентифициране на антигени в сложни смеси. Изследваните антигени се характеризират чрез два признака – електрохимични свойства и имунна специфичност.

Технологична постановка: Имуноелектрофореза тип Грабар се извършва в два етапа: (1) Върху стъклена плоча се разлива равномерен слой агаров гел. Изрязва се малък резервоар, в който се поставя тестваната антигенна смес. Провежда се електрофореза чрез поставяне на агаровия слой в електрическо поле с прав ток за 1-2 часа. При преминаване на електрическият ток през агара антигените се придвижват към катода или анода, според заряда и молекулното си тегло, и така се разделят. (2) В агаровия гел, успоредно на оста на електрофоретичната миграция се изрязва улей, в който се въвежда имунен серум. Антигените и антителата дифундират едни срещу други и в местата на срещата се получават преципитационни линии.

За анализ на имунните преципитати се използват специфични оцветителни методи, ензимни реакции, автордиография и др.



Имуноелектрофореза тип Грабар

• Насрещна имуноелектрофореза

Принцип: Този метод съчетава предимствата на електрофорезата и имунодифузията. Използва се за бързо доказване както на антигени, така и на антитела. Принципът е, че при подходящи условия (буфер, определено рН, подбран волтаж и концентрация на

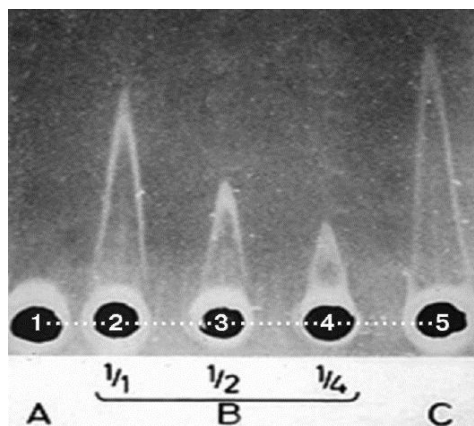
гелната среда), антигените са отрицателно заредени и се придвижват към анода. Антителата са по-малко отрицателно заредени и под влияние на електроендоосмозата (потока на течността към катода) се пренасочват в обратно направление – към катода.

Технологична постановка: Антигените се поставят в резервоар от страната на катода, а антителата – от страната на анода. При преминаване на електрически ток през агара двата компонента се придвижват едни към други и се постига имунопреципитация за 30-60 min, вместо за няколко денонощия, както е при имунодифузията по Ухтерлони.

●Ракетна имуноелектрофореза – метод на Лаурел

Принцип: Този метод също е съчетание на електрофореза и имунодифузия. Използва се за бързо количествено определяне на антигените.

Технологична постановка: В равномерен слой агаров гел, съдържащ специфични антитела, от страната на катода се изрязват ямки с диаметър 2 mm. Във всяка ямка се налива разтвор на антиген. Провежда се електрофореза. При движението си в електрическо поле антигените се свързват с антителата и в рамките на 30-60 min се образуват преципитационни ивици, наподобяващи ракети. Височината на ивиците е пропорционална на концентрацията на антигена.



Ракетна имуноелектрофореза

3. Самостоятелна работа:

- Видеофилм - <https://www.youtube.com/watch?v=h-KptLVJpU0>
- Решете теста на базата на информацията от практическите упражнения и лекциите до тук.

Дидактически тест *II семестър* *„ИМУНОЛОГИЯ“*

1. Посочете верните отговори:

Реакция преципитация е имунна реакция, която протича с участието на:

- A/ Разтворими антигени
- Б/ Екстракт или автолиза от бактерии
- В/ Белтъчни разтвори от животински произход
- Г/ Екстракт от растения

100

2. Реакция термопреципитация по АСКОЛЛИ се използва за доказване на:

- А/ Фитопреципитогени
- Б/ Зоопреципитогени
- В/ Антраксни преципитогени

1CO

3. Посочете имунни реакции, основани на взаимодействието антиген-антитяло.

- А/.....
- Б/.....
- В/.....
- Г/.....
- Д/.....

5CO

4. Посочете разновидности на реакция преципитация в агаров гел:

- А/.....
- Б/.....
- В/.....
- Г/.....

4CO

5. Свържете реакциите от А до Д с отговорите от 1 до 3:

- | | |
|----------------------------------|-----------------|
| А/ Реакция тип Грубер | 1. Преципитация |
| Б/ Реакция тип Видал | 2. Аглутинация |
| В/ Реакция на Васерман● | 3. РСК● |
| Г/ Насрещна дифузия по Ухтерлони | |
| Д/ Имуноелектрофореза по Грабър | |

5CO

6. Посочете разликите между реакция аглутинация и реакция преципитация:

.....
.....

2CO

7. Свържете типовете реакции, посочени от А до Г със съответните им характеристики от 1 до 4.

- А/ Реакция Видал
- Б/ Реакция Грубер
- В/ Реакция на Райт
- Г/ Реакция на Вайл-Феликс

- 1. Серологична диагностика на бруцелоза
- 2. Установяване на неизвестни аглутинини в серум на болен
- 3. Определяне на вида на неизвестен м.о. с помощта на познат специфичен серум
- 4. Серологична диагностика на петнист тиф

4CO

8. Посочете разновидностите на реакция аглутинация тип Грубер.

- А/ Пробна и степенна
- Б/ Ориентировъчна и разгъната
- В/ Проста и сложна

2CO

9. Пробната аглутинация тип Грубер се използва за диагностика на:

- А/ патогенни коки

Б/ условно патогенни бактерии
В/ безусловно патогенни бактерии
Г/ за доказване на неизвестни антитела в серума на болен **1CO**

10. Посочете компонентите, които участват в РСК:

А/ В диагностичната система

...известни Ag...

...неизвестни At...

...комплемент...

Б/ В индикаторната система

...овнешки Ег – Ag...

...хемолизини – At...

5CO

11. Какъв феномен се отчита при положителна РСК?

А/ помътняване на пробата

Б/ хемолиза

В/ аглутинация

Г/ задръжка на хемолизата на еритроцитите●

1CO

12. Посочете диагностичния титър на **O-Ag** при реакция тип Видал:

А/ $T \geq 1:50$

Б/ $T \geq 1:100$

В/ $T \geq 1:200$

Г/ $T \geq 1:800$

1CO

13. Посочете диагностичните титри при степенна аглутинация тип Грубер :

А/ за жива култура -

Б/ за варена култура -

2CO

14. Степенната аглутинация тип Грубер се използва в диагностиката на:

А/ Дизинтерия

Б/ Кореман тиф

В/ ЕРЕС

1CO

15. Коя от посочените имунологични реакции се използва при диагностика на ревматизъм?

А/ Видал

Б/ АСТ

В/ Грубер

1CO

Критерии за оценка:

МИНК = 60%

От 36 до 32 CO – Отличен /6/

От 31 до 28 CO – Мн. добър /5/

От 27 до 25 CO – Добър /4/

От 24 до 21 CO – Среден /3/

Под 21 CO – Слаб /2/