

## **ПРОТОКОЛ № 6**

### **ИМУННИ РЕАКЦИИ С МАКИРАНИ АНТИГЕНИ И АНТИТЕЛА – ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТЕН МЕТОД, РАДИОИМУНЕН МЕТОД И ИМУНОЕНЗИМНИ МЕТОДИ**

Имунните реакции с маркирани антигени или антитела намират широко приложение в редица съвременни медикобиологични изследвания в областта на микробиологията, вирусологията, паразитологията. Те се отличават с висока чувствителност и специфичност. Подходящи са за откриване и количествено определяне на антигени от различен произход или антитела срещу инфекциозни причинители. Основната разлика между тях е начинът на маркиране - с флуорохром, радиоизотоп или ензим.

В микробиологичната лабораторна дейност се използват следните методи:

- Имунофлуоресцентен метод (IFA)
- Радиоимунен метод (RIA)
- Имуноензимни методи (ELISA, Western blot и др.)

#### **I. ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТЕН МЕТОД (IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY - IFA)**

**Определение:** Вид имунодиагностичен метод, при който посредством флуоресцентни антитела се откриват непознати антигени или антитела. Образуваните комплекси антиген-антитяло се визуализират с помощта на флуоресцентен микроскоп. Имунофлуоресценцията може да бъде **директна** или **индиректна**.

Флуоресцентните антитела се получават при свързване с флуоресцентни вещества (флуорохроми).

**1. Директен IFA** – служи за откриване на антигени от различен произход. Изисква широк набор от флуоресцентни антимикуробни серуми, което е трудно да се осигури. Това неудобство се избягва с индиректния метод, който работи с един флуоресцентен серум. В практиката методът се използва за откриване на антраксни бацили в материали от човешки или животински произход.

#### **Техника на директен IFA:**

1. От пробата, в която се търсят микроорганизми, се прави натривка.
2. Натривката се изсушава и се фиксира с етанол за 15 min.

3. Върху нея се капва специфичен флуоресцентен серум. Поставя се във влажна камера на стайна температура или в термостат на 37°C за 15-30 min.
4. Препаратът се промива щателно с физиологичен разтвор за отстраняване на несвързаните антитела, изсушава се и се включва в буфериран глицеринов разтвор (рН 8,0).
5. Микроскопира се с флуоресцентен микроскоп.

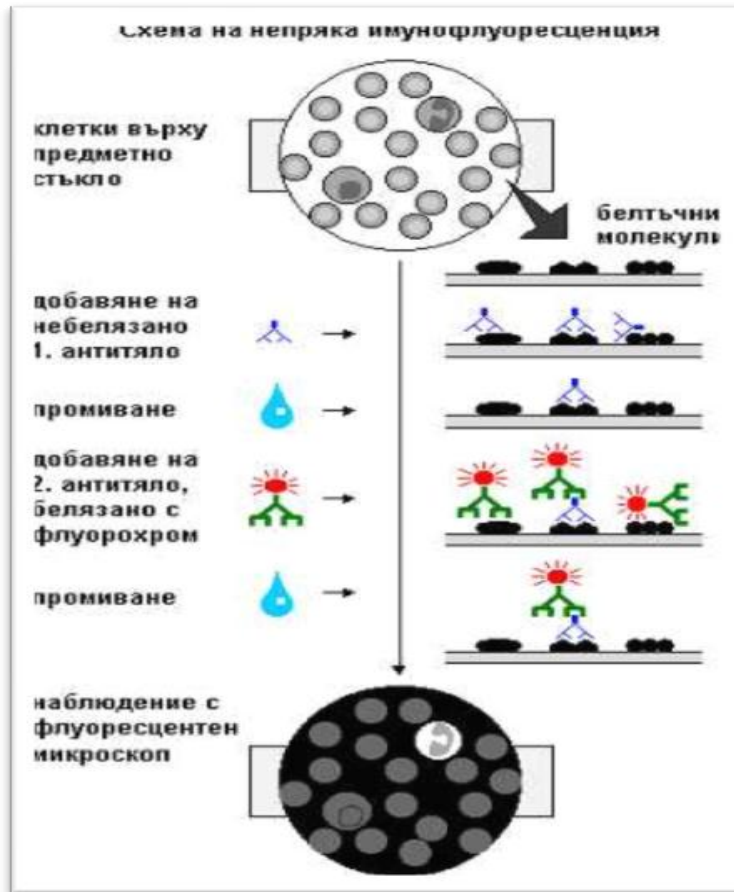
**Резултат:** При положителна реакция се виждат микроорганизми с характерна форма, флуоресциращи интензивно на тъмен фон.

**2. Индиректен IFA** – прилага се в 2 варианта: за доказване на антигени и на антитела. При взаимодействие на антигените със специфични антитела, получените комплекси антиген-антитяло се свързват с флуоресциращ антиглобулинов серум. Той съдържа антитела срещу  $\gamma$ -глобулините на животното, от което са получени антимикробните серуми (когато се търсят микробни антигени), или срещу човешките  $\gamma$ -глобулини (когато се търсят антитела в серум на болен).

**Техника на индиректен IFA:**

- Търсене на непознати микроорганизми – първоначално се поставя специфичен серум (антителата от серума взаимодействат с антигените на съответния микроорганизъм), а след промиване на препарата се добавя антиглобулинов флуоресцентен серум.
- Изследване на антитела в серум на болен – последователно се прилагат диагностични антигени (свързват се с антителата) и антиглобулинов флуоресцентен серум.

Високата чувствителност, голямата специфичност, бързина и демонстративност на IFA обуславят широкото му приложение за откриване на корпускуларни и разтворими антигени от различен микробен произход, както и за доказване на антитела срещу бактерии, вируси, гъбички и паразити.



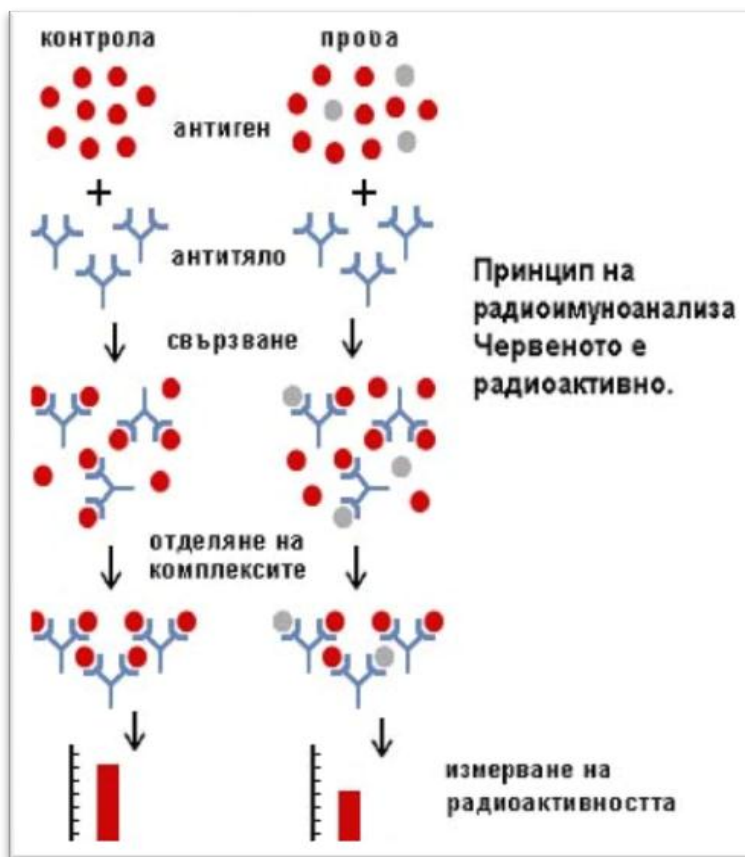
## ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТЕН МЕТОД

### II. РАДИОИМУНЕН МЕТОД (RADIOIMMUNOASSAY - RIA)

**Определение:** Вид имуен диагностичен метод, при който един от компонентите на системата антиген-антитяло е маркиран с радиоактивен изотоп ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{J}$ ). Отчитането се извършва радиометрично, чрез измерване гама-лъчението на изотопа.

**Принцип:** RIA се основава на конкурентното свързване с радиоактивно маркиран компонент. Ако радиоактивно маркиран антиген (напр. с изотоп  $^{125}\text{J}$ ) се прибави към проба с търсения антиген и специфично антитяло, двата антигена (маркиран и немаркиран) се конкурират за молекулата на антитялото. Колкото по-голямо е количеството на търсения (немаркиран) антиген, толкова по-малко количество радиоактивно маркиран антиген ще се свърже с антителата. След утаяване на комплексите антиген-антитяло се определя количеството на радиоактивния маркер и се сравнява със стандартната крива. По този начин се определя количеството антиген, присъстващ в анализирания проба.

Въпреки, че е един от най-чувствителните и специфични съвременни имунологични методи, RIA не се прилага в рутинната клинична микробиология поради ограничения, свързани с работата с радиоактивни изотопи, нетрайност на част от маркираните реагенти (сравнително къс период на разпад на някои изотопи) и скъпоструваща техника. Този метод се прилага за количествено измерване на хормони, невропептиди и други биологично активни съединения, чието съдържание в телесните течности е много ниско. В ограничена степен се използва за диагностика на хепатитни вирусни, доказване на токсини и др.



## РАДИОИМУНЕН МЕТОД

### III. ИМУНОЕНЗИМНИ МЕТОДИ

#### 1. Ензимно-свързан имуносорбентен тест (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-ELISA)

**Определение:** Вид имуноензимен диагностичен метод, при който един от компонентите на системата антиген-антитяло е маркиран с ензим. Като индикаторна система се добавя субстрат на ензима и хромогенно вещество за протичане на цветна реакция. Отчитането се извършва

спектрофотометрично, което позволява количествено измерване на компонентите.

**Принци:** Върху твърдофазов носител, натоварен с тест-антиген или тест-антитяло се поставя изследваният материал. (1) При наличие на хомоложност, образуваните комплекси антиген-антитяло се задържат върху твърдия носител. Следва промиване. Добавя се маркирано с ензим антитяло, което се свързва с комплексите антиген-антитяло и също остава фиксирано към твърдия носител. Следва промиване. Слага се субстрат и хромогенно вещество, за отчитане на цветна реакция. (2) При липса на хомоложност между антигена и антитялото, не се образуват фиксирани комплекси и отделните реагенти се отстраняват при промиването. Реакцията остава отрицателна.

Понастоящем са разпространени техники, при които тест-антигените или тест-антителата са адсорбирани върху твърдофазов носител – ямки на пластмасови плаки, епруветки или перли. Най-често се използват стандартни 96-гнездови плаки с обем на ямките 200-300  $\mu$ l. Като ензими се прилагат пероксидаза, алкална фосфатаза,  $\beta$ -галактозидаза и др. За визуализиране на реакцията служат хромогени (напр. орто-нитро-фенилендиамин), които под действие на ензимите се разграждат до цветни продукти.

В практиката се използват два основни варианта на ELISA: (1) Метод с двойно антитяло за доказване на антиген (double antibody sandwich ELISA); (2) Индиректен метод за откриване на антитела (indirect ELISA for detection of antibodies).

***а/Техника на ELISA за доказване на антиген:***

1. В плака, натоварена с тест-антитела се накапва разтвор на търсения антиген.
2. Плаката се инкубира 1 час на 37°C. При наличие на хомоложност антигенът се свързва с тест-антителата и остава фиксиран по повърхността на ямките.
3. Плаката се промива 4-5 кратно за отстраняване на несвързания антиген.
4. Накапват се антитела, конюгирани с ензим (напр. пероксидаза или алкална фосфатаза).
5. Плаката се инкубира 1 час на 37°C. При наличие на комплекс антитяло-антиген, конюгираните антитела се свързват с антигена.

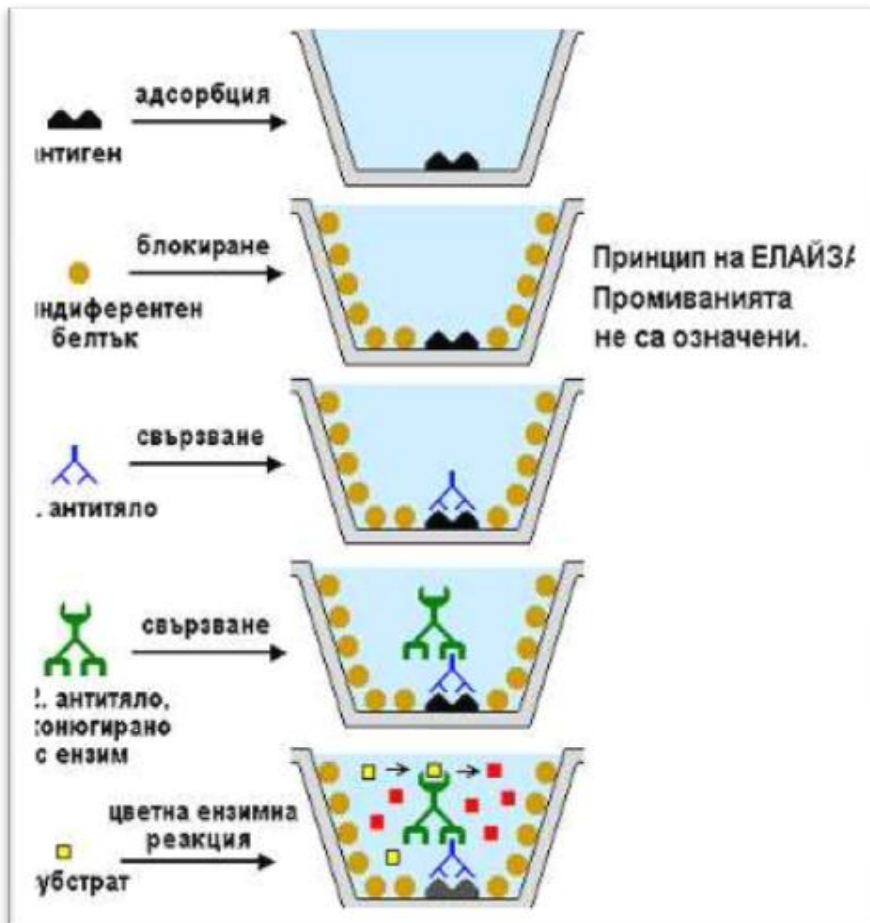
6. Плаката се промива 4-5 кратно за отстраняване на несвързаните конюгирани антитела.
7. Накапва се субстрат на ензима (напр.  $\text{H}_2\text{O}_2$  за ензима пероксидаза) и хромогенно вещество (напр. орто-нитро-фенилендиамин).
8. Плаката се инкубира 10-30 min на  $37^\circ\text{C}$ . Под действие на пероксидазата, от  $\text{H}_2\text{O}_2$  се отделя  $\text{O}_2$ , който окислява орто-фенилендиамин до образуване на цветен продукт с жълтокафяв цвят.
9. Накапва се разтвор на  $\text{H}_2\text{SO}_4$  или  $\text{NaOH}$  за спиране на ензимната реакция.
10. Резултатът се отчита спектрофотометрично и се определя оптичната плътност (optical density).

***б/Техника на ELISA за доказване на антитела:***

1. В плака, натоварена с тест-антигени, се накапва серум с неизвестни антитела.
2. Плаката се инкубира 1 час на  $37^\circ\text{C}$ . При наличие на хомоложни антитела в серума, те се свързват с тест-антигените и остават фиксирани към повърхността на ямките.
3. Плаката се промива за отстраняване на несвързаните антитела.
4. Накапват се антивидови антитела, конюгирани с ензим (напр. пероксидаза или алкална фосфатаза).
5. Плаката се инкубира 1 час на  $37^\circ\text{C}$ . При наличие на комплекси антиген-антитяло, конюгираните антивидови антитела се свързват с антитялото.
6. Плаката се инкубира 10-30 min на  $37^\circ\text{C}$ . Под действие на пероксидазата, от  $\text{H}_2\text{O}_2$  се отделя  $\text{O}_2$ , който окислява орто-фенилендиамин до образуване на цветен продукт с жълтокафяв цвят.
7. Накапва се разтвор на  $\text{H}_2\text{SO}_4$  или  $\text{NaOH}$  за спиране на ензимната реакция.
8. Резултатът се отчита спектрофотометрично и се определя оптичната плътност (optical density).

В микробиологичната диагностика ELISA намира много широко приложение. Чрез този метод могат да се определят качествено и количествено бактериални, вирусни, гъбични и паразитни антигени, а също и антитела срещу тях в кръв, фецес, ликвор. Рутинно ELISA се прилага за откриване на антитела срещу редица бактерии (хламидии,

микоплазми, борелии, рикетси и др.) и вируси (причинители на хепатити, СПИН, морбили, паротит, рубеола и др.). В обратния вариант, чрез познати тест-антитела, с ELISA могат да се докажат микробни агенти в клинични материали, т.напр *Clostridium difficile*, *Campylobacter spp.*, *Rotavirus* и др. във фецес



## ELISA метод

### 2.Имуноблот (Western blot)

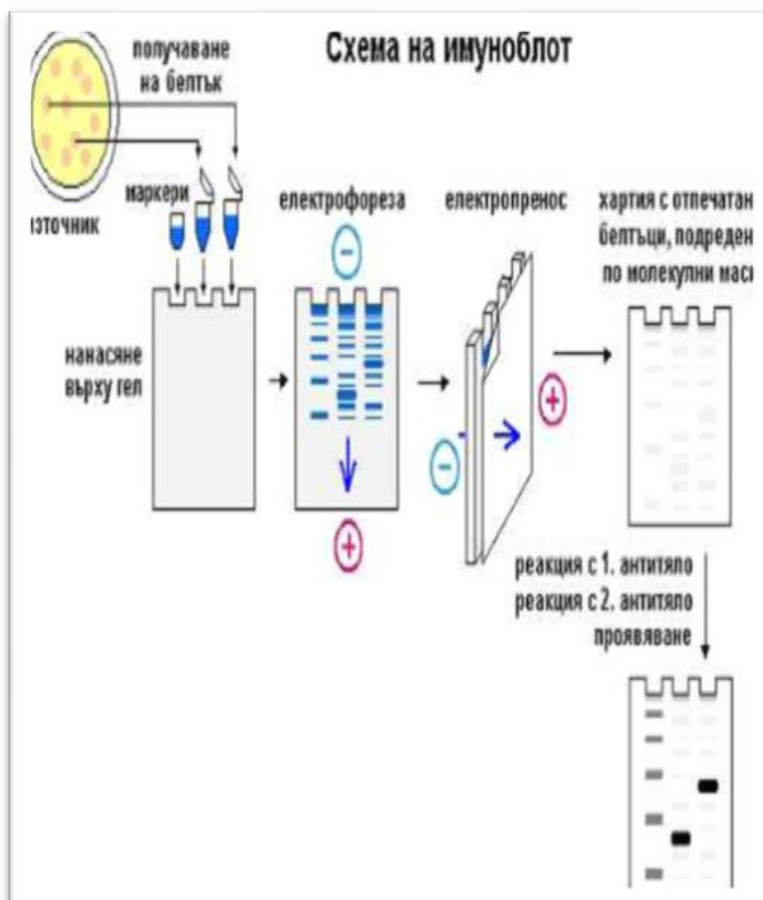
**Определение:** Иммуоензимен метод, който се използва като потвърдителен тест за диагноза на някои вирусни и бактериални инфекции – СПИН, Лаймска борелиоза и др.

**Принцип:** Принципът е сходен с ELISA, но вместо плаки, натоварени с антигени или антитела, се използват нитроцелулозни хартиени лентички (стрипове), върху които са адсорбирани сепарирани антигенни фракции. Тези фракции са получени чрез електрофоретично разделяне на

антигенната смес, след което са прехвърлени огледално (блотирани) от гела върху хартията.

**Технологична постановка:** Изследваният серум се поставя в специална пластмасова ваничка. Въвежда се стрип със сепарирани антигени фракции. При наличие на хомоложни антитела в серума, те се свързват със съответните фракции на сепарирания антиген. Образованите комплекси антиген-антитяло се визуализират посредством конюгирано с ензим антивидово антитяло и субстратен разтвор. Върху нитроцелулозната лентичка се наблюдават цветни линии, които се сравняват с линиите върху положителния контролен стрип. Резултатът се интерпретира като положителен (присъстват всички цветни линии), отрицателен (липсват цветни линии) и неопределен (присъстват само някои от линиите).

Имуноблотът дава възможност за прецизен анализ на антигените на даден микроорганизъм и съответно на антителата срещу тях. Методът е високо чувствителен и изключва възможност за фалшиво положителни серологични резултати.



## Имуноблот метод



#### **IV. Самостоятелна работа:**

1. Изгледайте филмите за метода ELISA.

<https://www.youtube.com/watch?v=QoK2xBn9fSc>

<https://www.youtube.com/watch?v=RRbuz3VQ100>

2. Направете презентация на Power-point /минимум 5 слайда/ за метода ELISA.