

Рабочая методика

Реакция торможения гемагглютинации для тестирования сывороток

Подготовка сывороток, антигенов и эритроцитов

Подготовка сывороток

Сыворотки крови животных и людей содержат различные полисахариды, включающие сиаловые кислоты, которые могут прикрепляться к гемагглютинину вируса гриппа и затруднять связывание специфических в отношении гриппа гемагглютинирующих антител. Для удаления этих неспецифических ингибиторов гемагглютинации образцы сыворотки обрабатываются ферментом, разрушающим рецептор (RDE).

1. Быстро разморозьте исследуемые сыворотки крови при +37 °С на водяной бане. Сразу после разморозки поместите сыворотки в лед и держите на льду во время использования.
2. Добавьте 40 мкл образца сыворотки в пробирку.
3. Добавьте 120 мкл RDE в каждую пробирку.
4. Закройте пробирки пробками.
5. Выдерживайте на водяной бане при +37 °С от 18 до 20 часов.
6. Затем поместите пробирки в водяную баню при +56 °С на 30 минут.
7. Добавьте 240 мкл ФСБ, рН = 7,2 в каждую пробирку. Конечное разведение сыворотки имеет соотношение 1 : 10. Конечный объем ≈ 400 мкл.
8. Оставьте на ночь при +4 °С. Если необходимо более долгое хранение, заморозьте до – 20 °С или ниже.

Подготовка эритроцитов

1. Аккуратно наберите, используя пипетку объемом 10 мл, примерно 5 мл эритроцитов со дна колбы. Профильтруйте через стерильную хлопковую марлевую салфетку в коническую центрифужную пробирку объемом 50 мл.
2. Осторожно наполните коническую пробирку холодным ФСБ, закройте пробкой и слегка перемешайте, переворачивая пробирку.
3. Центрифугируйте при 1200 об./мин в течение 10 минут при +4 °С.
4. Удалите надосадочную жидкость, используя пипетку объемом 10 мл. Будьте внимательны: не всколыхните осадок эритроцитов.

5. С осторожностью повторите промывку холодным ФСБ (пункты 2–4) еще два раза, чтобы всего было три промывки эритроцитов. Для предотвращения гемолиза всегда бережно обращайтесь с эритроцитами, держите ФСБ на льду при температуре +4 °С и не промывайте эритроциты больше трех раз.
6. Удалите оставшийся супернатант при помощи микропипетки и храните уплотненные эритроциты на льду.
7. Приготовьте раствор суспензии эритроцитов 1 : 100. Для этого добавьте 100 мкл эритроцитов к 9,9 мл холодного ФСБ в конической пробирке объемом 15 мл. Осторожно перемешайте, переворачивая пробирку.

Приготовление рабочего раствора антигена

1. На V-образных планшетах подпишите названия двух вирусов, которые вы будете использовать в тесте. Каждый вирус тестируется дважды (см. рис. 5).
2. Добавьте 50 мкл холодного ФСБ в лунки со 2-й по 12-ю в рядах А и В для первого вируса и в лунки со 2-й по 12-ю в рядах D и E для второго вируса.
3. Добавьте 50 мкл холодного ФСБ во весь ряд Н. Этот ряд будет выполнять функцию контроля эритроцитов.
4. Добавьте 100 мкл первого вируса для тестирования в лунки А1 и В1. Добавьте 100 мкл второго тестируемого вируса в лунки D1 и E1.
5. Проведите серию двукратных разведений, перенеся 50 мкл из первой лунки в каждую последующую до 12-й лунки. Из 12-й лунки удалите 50 мкл.
6. Добавьте 50 мкл 0,5 %-й суспензии эритроцитов во все лунки в рядах А, В, D, E и Н на планшете.
7. Аккуратно постучите по планшету, чтобы перемешать содержимое.
8. Выдержите при комнатной температуре или при + 4° С в течение 30 минут.
9. Определите титры гемагглютининов, наклонив планшет под углом от 45° до 60°. Осевшие эритроциты в ряду Н должны «потечь» и образовать каплю. Дождитесь, пока эти эритроциты не перестанут течь, после чего отметьте те лунки, в которых эритроциты образовали «пуговики» и потекли. Наибольшее разведение вируса, которое дает полную гемагглютинацию («зонтик»), считается титром гемагглютинина.
10. Разведите вирус в холодном ФСБ таким образом, чтобы приготовить рабочий раствор, содержащий 8 ГАЕ/50 мкл. Например, у Вас получился титр НА, равный 160. Разделите его на 8, получите 20. Следовательно, вам необходимо разбавить исходный вирус в 20 раз, т. е. смешать 1 часть вируса с 19 частями холодного ФСБ.

11. Убедитесь в том, что разведенный вирус содержит 8 ГАЕ на 50 мкл, проведя вторую реакцию гемагглютинации (РГА), как описано выше. Титр вируса должен равняться 8. Если у Вас получилось другое число, использовать этот рабочий раствор вируса нельзя!
12. Храните рабочее разведение вируса на льду и используйте в тот же день.

Примечание. Стандартное рабочее разведение вируса должно иметь титр НА, равный 8 ГАЕ в 50 мкл. Это то же самое, что и 4 ГАЕ в 25 мкл. При таком титре наблюдается гемагглютинация в первых четырех лунках при титровании вируса в РГА. Если полная гемагглютинация наблюдается в 5 лунках, вирус имеет титр 16 ГАЕ/50 мкл и тестовый антиген должен быть разбавлен в 2 раза. И наоборот, если гемагглютинация наблюдается только в 3 лунках, то антиген имеет титр 4 ГАЕ/50 мкл. В этом случае к рабочему разведению вируса надо добавить такой же объем исходного вирусного раствора, какой был взят вначале. Это удвоит концентрацию вируса в рабочем разведении, чтобы дать титр 8 ГАЕ/50 мкл. Если после 1–2 исправлений у вас так и не получился титр 8 ГАЕ/50 мкл, процедуру приготовления рабочего раствора вируса лучше повторить сначала с постановки реакции гемагглютинации.

Реакция торможения гемагглютинации (протокол)

1. Быстро разморозьте сыворотки на водяной бане при +37 °С. Как только сыворотки растают, держите их на льду во время работы.
2. Пронумеруйте планшеты и подпишите названия двух тестируемых вирусов. Сыворотки тестируются в повторях на двух идентичных планшетах (см. рис. 5).
3. Добавьте 25 мкл холодного ФСБ в ряды от В до Н (от В1–В11 до Н1–Н11).
4. Добавьте 50 мкл каждого образца сывороток в первую лунку (А1–А10).
5. Внесите 50 мкл положительного контроля в лунку А11 одного планшета и отрицательного контроля в лунку А11 второго планшета.
6. Проведите серию двукратных разведений, перемещая 25 мкл сыворотки из А1–11 в лунки последующих рядов. Последние 25 мкл сыворотки из ряда Н утилизируйте.
7. Добавьте 25 мкл рабочего раствора вируса, содержащего 4 ГАЕ, в лунки, содержащие сыворотки. Обратите внимание на то, что это то же самое, что 50 мкл, содержащих 8 ГАЕ.
8. Аккуратно постучите по планшету, чтобы перемешать содержимое.
9. Выдержите при комнатной температуре в течение 30 минут.
10. Добавьте 50 мкл ФСБ в колонку 12, что послужит контролем эритроцитов.
11. Добавьте 50 мкл 0,5 %-й суспензии эритроцитов в каждую лунку.
12. Аккуратно постучите по планшету, чтобы перемешать содержимое.
13. Выдержите при комнатной температуре или при + 4° С в течение 30 минут.

14. Учтите титры сыворотки через 30 минут инкубирования, наклонив планшет под углом от 45° до 60°. Осевшие эритроциты в колонке 12 должны «потечь» и образовать каплю. Дождитесь, пока эти эритроциты не перестанут течь, после чего отметьте те лунки, в которых эритроциты образовали «пуговики» и потекли так же, как в 12-й колонке. Лунки, где произошло полное торможение гемагглютинации, будут выглядеть как контрольные.

Интерпретация. Если произошло взаимодействие антиген / антитело, гемагглютинация эритроцитов будет ингибирована. Для записи данных следует пользоваться следующими знаками: знак «+» – для полной гемагглютинации («зонтик»), знак «+/-» – для частичной гемагглютинации и знак «-» – для торможения гемагглютинации («пуговка»). Титр в РТГА соответствует наибольшему разведению сыворотки, которое полностью тормозит гемагглютинацию (последняя «пуговка»). Необходимо внимательно следить за инкубацией. Если реакция проведена при комнатной температуре результат следует прочитать сразу после того, как эритроциты в контроле полностью осядут. Если реакция проведена при температуре + 4° С результат можно прочитать в течение 0,5-1 часа после того, как эритроциты в контроле полностью осядут.

15. **Титр сыворотки в РТГА** – это разведение сыворотки в последней лунке с полным торможением гемагглютинации, например 1:640.
16. **Обратный титр сыворотки** – это величина, обратная титру, например 640.
17. **Серонегативными** считаются лица, у которых обратный титр сыворотки в РТГА равен или меньше 20
18. **Серопозитивными** считаются лица, у которых обратный титр сыворотки в РТГА равен или больше 40

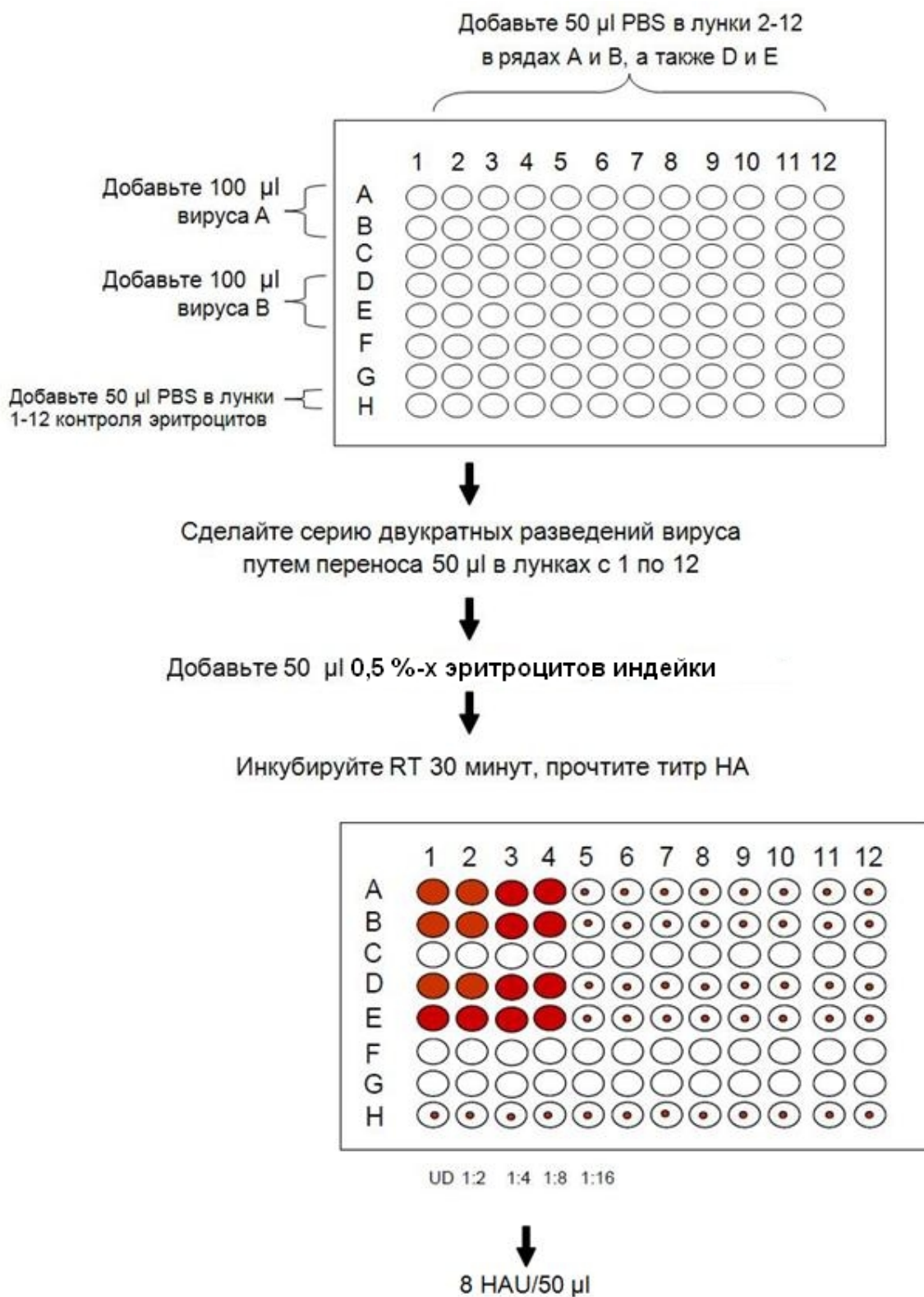
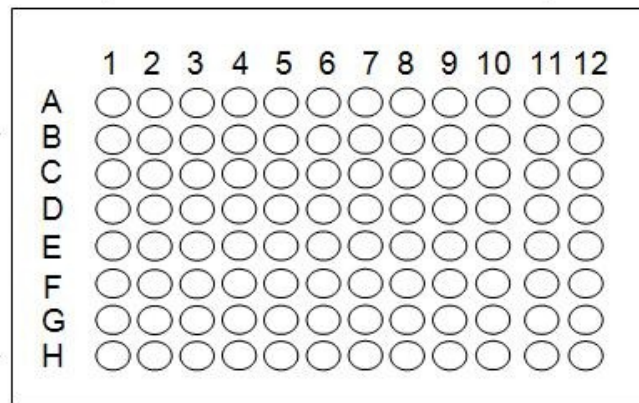


Рис. 4. Реакция гемагглютинации и приготовление рабочего раствора вируса

Добавьте 50 μ l сывороток в лунки A1 - A11

Добавьте 25 μ l PBS
в лунки B-H



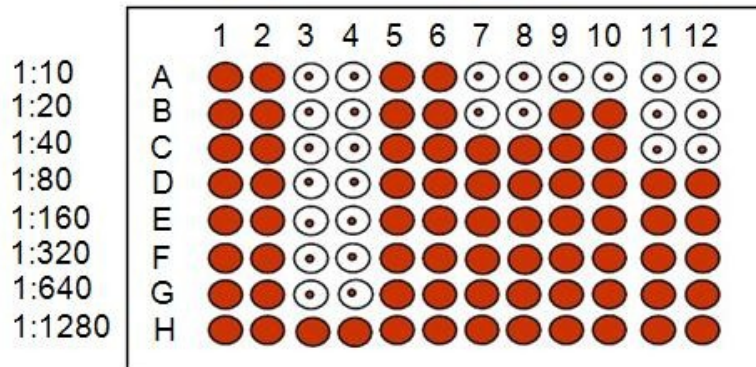
Двукратное
разведение

Добавьте 25 μ l вируса (= 4 HAU)

Инкубируйте RT 30 минут

Добавьте 50 μ l 0,5 %-х эритроцитов индейки

Инкубируйте RT 30 минут, прочтите титры HI



Для иллюстрации
двойные образцы
сыворотки показаны
на том же планшете

< 10 640 < 10 20 10 40
или 5 или 5

Рис. 5. Реакция торможения гемагглютинации