

Chương 19. Phản ứng kháng nguyên - kháng thể

Mục lục

Chương 19. Phản ứng kháng nguyên - kháng thể	1
19.1. Giới thiệu.....	3
19.2. Đặc điểm chung của kháng nguyên - kháng thể	3
19.2.1. Đặc điểm hoá lý	3
19.2.2. Ái lực	3
19.2.3. Khả lực.....	4
19.2.4. Tính chuyên biệt	4
19.2.5. Phản ứng chéo.....	4
19.3. Các giai đoạn của phản ứng kháng nguyên - kháng thể.....	5
19.3.1. Giai đoạn sơ cấp.....	5
19.3.2. Giai đoạn thứ cấp.....	5
19.4. Các kiểu phản ứng khác nguyên - kháng thể	5
19.4.1. Sự trầm hiện.....	7
19.4.2. Hiện tượng prozone	7
19.4.3. Các kiểu phản ứng trầm hiện	9
19.4.4. Ngưng kết	16
19.4.5. Thử nghiệm đông tụ.....	22
19.4.6. Thử nghiệm cố định bổ thể	22
19.4.7. Thử nghiệm kết dính miễn dịch.....	25
19.4.8. Thử nghiệm sự bất động	25
19.4.9. Phản ứng phân huỷ tế bào hay tiêu diệt tế bào	25
19.4.10. Thử nghiệm trung hoà.....	26
19.4.11. Opsonin hoá	26
19.4.12. Miễn dịch huỳnh quang	27

19.4.13. Phương pháp miễn dịch enzyme.....	29
19.4.14. Phương pháp ELISPOT	33
19.4.15. Phương pháp miễn dịch phóng xạ	33
19.4.16. Western Blotting	34
19.4.17. Phương pháp phát quang hoá học	36
19.5. Kiểm tra miễn dịch bằng kính hiển vi điện tử.....	36
19.5.1. Sử dụng kính hiển vi điện tử miễn dịch.....	36
19.5.2. Thử nghiệm enzyme miễn dịch	36
19.5.3. Thử nghiệm ferritin miễn dịch.....	37

19.1. Giới thiệu

Sự tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể tạo ra phản ứng kháng nguyên - kháng thể. Các phản ứng này có tính chuyên biệt cao và kháng nguyên chỉ phản ứng với kháng thể được tạo ra bởi chính kháng nguyên đó hoặc chỉ với kháng nguyên có quan hệ gần. Do những phản ứng này rất đặc trưng, nên chúng được sử dụng trong nhiều thử nghiệm chẩn đoán để phát hiện hoặc là kháng nguyên hoặc là kháng thể trong điều kiện thí nghiệm (*in vitro*). Phản ứng kháng nguyên và kháng thể cũng hình thành sự miễn dịch chống lại bệnh do vi sinh vật có trong cơ thể (*in vivo*) gây ra. Trong cơ thể chủ, phản ứng kháng nguyên - kháng thể có thể gây tổn thương mô ở những trường hợp siêu nhạy cảm và trong các bệnh tự miễn dịch.

19.2. Đặc điểm chung của kháng nguyên - kháng thể

Kháng nguyên và kháng thể liên kết qua các cầu nối không cộng hoá trị có đặc điểm tương tự như đặc điểm protein liên kết với các thụ thể tế bào dành cho chúng, hoặc như enzyme liên kết với cơ chất của chúng. Các phản ứng giữa protein với thụ thể và phản ứng giữa enzyme với cơ chất là những phản ứng gây ra sự biến đổi hoá học không thể đảo ngược. Ngược lại liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể có tính đảo ngược và có thể được ngăn chặn hoặc phân tách nhờ lực có tính ion cao hay pH quá cao hoặc quá thấp. Một số đặc điểm chung của tương tác này như sau: (1). Đặc điểm lý hoá, (2). Ái lực, (3). Khả lực, (4). Tính chuyên biệt và (5). Phản ứng chéo.

19.2.1. Đặc điểm hoá lý

Liên kết tĩnh điện, liên kết hydrogen, liên kết van der Waals và tương tác kỵ nước là các lực nội phân tử liên quan trong phản ứng kháng nguyên - kháng thể. Tất cả các kiểu nội lực phân tử này phụ thuộc vào mức độ gần kề của các phân tử kháng nguyên và kháng thể. Vì lý do này nên việc xác định sự bền vững của phản ứng kháng nguyên - kháng thể phụ thuộc vào việc cố định giữa yếu tố quyết định kháng nguyên và vị trí kết hợp kháng thể. Đa liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể nhằm đảm bảo cho kháng nguyên được gắn kết chặt với kháng thể.

19.2.2. Ái lực

Ái lực biểu thị cường độ hấp dẫn giữa kháng nguyên và kháng thể, như: (a).

Kháng thể có ái lực thấp liên kết với kháng nguyên yếu và sẽ dễ dàng tách ra, ngược lại kháng thể có ái lực cao liên kết chặt hơn với kháng nguyên và vì vậy sẽ kết hợp lâu hơn.

(b). Liên kết ái lực cao được cho là kết quả của sự cố định rất gần giữa vị trí liên kết kháng nguyên và tương ứng với yếu tố quyết định kháng nguyên, tạo thuận lợi cho tương tác không cộng hoá trị diễn ra mạnh giữa kháng nguyên và kháng thể.

19.2.3. Khả lực

Khả lực (avidity) là sự đo lường về sức mạnh liên kết tổng thể của một kháng nguyên có nhiều yếu tố quyết định kháng nguyên và kháng thể đa hoá trị. Khả lực là một chỉ thị tốt hơn về sức mạnh tương tác trong hệ thống sinh học so với tính ái lực. Vì vậy khả lực của phản ứng kháng nguyên - kháng thể thì phụ thuộc vào hoá trị của cả kháng nguyên và kháng thể, nó lớn hơn tổng ái lực của cá thể.

19.2.4. Tính chuyên biệt

Tính chuyên biệt là khả năng vị trí kết hợp ở kháng thể của cá thể chỉ phản ứng với một yếu tố quyết định kháng nguyên hay khả năng của một tập hợp các phân tử kháng thể chỉ phản ứng với một kháng nguyên. Phản ứng kháng nguyên - kháng thể thường biểu hiện tính chuyên biệt ở mức độ cao.

Kháng thể có thể nhận biết sự khác biệt một cách chuyên biệt trong: (a) cấu trúc sơ cấp của kháng nguyên, (b) dạng đồng phân (isomer) của kháng nguyên và (c) cấu trúc bậc hai và bậc bốn của kháng nguyên.

Mặc dù phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể mang tính chuyên biệt, nhưng đôi khi phản ứng chéo giữa chúng cũng có thể xảy ra và khi đó phản ứng chéo giữa chúng là nguyên nhân gây bệnh cho cơ thể chủ và có thể làm sai lệch kết quả phân tích.

19.2.5. Phản ứng chéo

Mặc dù phản ứng kháng nguyên - kháng thể có tính chuyên biệt cao, nhưng trong một số trường hợp kháng thể được tạo ra từ một kháng nguyên có thể phản ứng chéo với một kháng nguyên khác không có liên quan. Phản ứng chéo như vậy xảy ra nếu hai kháng nguyên khác nhau có epitope (yếu tố quyết định kháng nguyên) giống hệt nhau hoặc tương tự nhau. Tính ái lực của kháng thể có epitope tương tự thường có phản ứng chéo ít hơn so với epitope nguyên thủy.

19.3. Các giai đoạn của phản ứng kháng nguyên - kháng thể

Phản ứng kháng nguyên - kháng thể xảy ra trong hai giai đoạn sơ cấp và thứ cấp.

19.3.1. Giai đoạn sơ cấp

Giai đoạn sơ cấp là sự tương tác ban đầu giữa kháng nguyên và kháng thể. Tương tác này nhanh và có thể bị đảo ngược nhưng không có bất kỳ hiệu ứng nào thấy được. Các cầu nối ion, cầu nối hydrogen, lực van der Waals và tương tác kỵ nước (các lực này yếu hơn so với lực nội phân tử) làm kháng nguyên và kháng thể liên kết lại với nhau trong giai đoạn sơ cấp này. Tuy nhiên liên kết cộng hoá trị là một lực phân tử mạnh hơn giữa kháng nguyên và kháng thể thì không xuất hiện trong giai đoạn này.

19.3.2. Giai đoạn thứ cấp

Giai đoạn thứ cấp là một tương tác không thể đảo ngược giữa kháng nguyên và kháng thể, với hiệu ứng thấy được như ngưng kết, trầm hiện, trung hoà, cố định bổ thể và làm bất động vi sinh vật di động. Liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể trong giai đoạn này xảy ra nhờ liên kết cộng hoá trị.

Một kháng thể thì có khả năng gây ra các kiểu phản ứng kháng nguyên - kháng thể khác nhau và một kháng thể đơn lẻ thì có khả năng cảm ứng sản sinh các nhóm khác biệt của immunoglobulin có những đặc điểm sinh học khác biệt.

Kết quả của sự ngưng kết, trầm hiện, trung hoà và thử nghiệm khác, thường được biểu thị bằng hàm lượng. Hàm lượng được định nghĩa là nồng độ pha loãng cao nhất của huyết thanh cho phản ứng dương tính trong thử nghiệm. Hàm lượng cao hơn nghĩa là mức độ kháng thể lớn hơn trong huyết thanh. Ví dụ huyết thanh có một lượng là 1/128 chứa nhiều kháng thể hơn huyết thanh có lượng theo tỷ lệ 1/8.

19.4. Các kiểu phản ứng kháng nguyên - kháng thể

Thử nghiệm huyết thanh được sử dụng rộng rãi để phát hiện hoặc kháng thể trong huyết thanh hoặc kháng nguyên, được sử dụng phổ biến để phát hiện, chẩn đoán nhiều đối tượng gây bệnh xâm nhiễm (Bảng 19.1). Thử nghiệm huyết thanh cũng được sử dụng để chẩn đoán bệnh tự miễn dịch (autoimmune) và phân kiểu (typing) nhóm máu và mô trước khi cấy ghép.

Sau đây là các ví dụ phản ứng kháng nguyên - kháng thể, phản ứng kháng nguyên

và kháng thể được sử dụng để: (a) tạo ra sự trầm hiện, (b) làm ngưng kết, (c) thử nghiệm huyết thanh phụ thuộc bổ thể, (d) thử nghiệm trung hoà, (e) tạo ra sự opsonin hoá, (f) miễn dịch huỳnh quang (g) miễn dịch sử dụng enzyme, (h) miễn dịch phóng xạ, (i) western blot, (j) phát quang hoá học và (k) thử nghiệm quan sát miễn dịch bằng kính hiển vi điện tử.

Bảng 19.1. Thử nghiệm thường được sử dụng để phát hiện vi sinh vật gây bệnh.

Thử nghiệm	Sử dụng
Thử nghiệm sự keo tụ	Phát hiện kháng thể reagin trong bệnh giang mai do xoắn khuẩn bằng thử nghiệm VDRL
Thử nghiệm khuếch tán miễn dịch vòng	Phát hiện kháng nguyên và kháng thể của nấm
Điện di miễn dịch đôi dòng	Phát hiện cả kháng nguyên và kháng thể do vi khuẩn, virus, nấm và ký sinh trùng
Thử nghiệm ngưng kết trên lam kính	Xác định các chủng vi khuẩn phân lập như <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , ...
Thử nghiệm ngưng kết trong ống nghiệm	Phát hiện kháng thể trong các bệnh do vi khuẩn, ví dụ như thử nghiệm Widal khi sốt do vi khuẩn đường ruột
Thử nghiệm ngưng kết latex	Định lượng và phát hiện kháng nguyên và kháng thể
Thử nghiệm ngưng kết hồng cầu	Phát hiện cả kháng nguyên và kháng thể do virus và ký sinh trùng gây ra
Thử nghiệm ngưng tụ	Phát hiện kháng nguyên vi sinh vật
Thử nghiệm cố định bổ thể	Định lượng và phát hiện kháng thể
Thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang trực tiếp	Phát hiện và định vị kháng nguyên trong tế bào hay trong mô
Thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang bán trực tiếp	Phát hiện kháng nguyên chuyên biệt trong huyết thanh
ELISA kẹp (sandwich)	Phát hiện kháng nguyên và kháng thể
ELISA gián tiếp	Phát hiện và định lượng kháng thể

Miễn dịch phóng xạ	Định lượng, kháng sinh,
Western blot	Phát hiện kháng nguyên - kháng thể chuyên biệt

19.4.1. Trầm hiện

Thử nghiệm trầm hiện có những đặc điểm sau: (a). Là một kiểu phản ứng kháng nguyên - kháng thể, trong đó kháng nguyên xuất hiện ở dạng hoà tan. (b). Là một phép thử mà theo đó kháng thể tương tác với kháng nguyên hoà tan khi có mặt của chất điện giải tại pH và nhiệt độ xác định để tạo ra sự trầm hiện. Một mạng lưới được hình thành giữa kháng nguyên và kháng thể; trong một số trường hợp thấy được sự trầm hiện không hoà tan.

(i). Kháng thể gắn kết với các kháng nguyên hoà tan hình thành phức hợp trầm hiện (precipitin).

(ii). Thay vì lắng xuống dưới đáy, trầm hiện lơ lửng kết bông lại với nhau, khi đó phản ứng này được gọi là sự kết bông.

(iii). Hình thành mạng lưới kháng nguyên - kháng thể phụ thuộc vào hóa trị của cả kháng nguyên và kháng thể.

(iv). Kháng thể phải có hóa trị hai; trầm hiện sẽ không hình thành với đoạn Fab có hóa trị một.

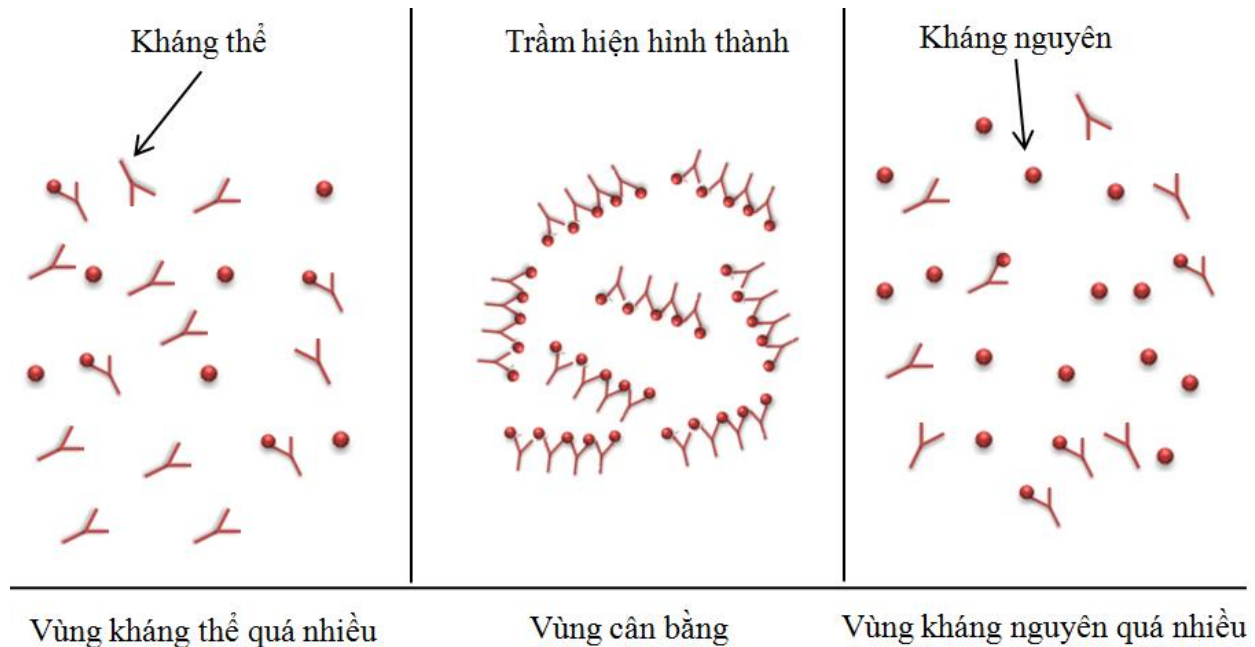
(v). Kháng nguyên phải có hoặc là hóa trị hai hoặc là đa hóa trị. Theo đó nó phải có ít nhất hai bản sao có cùng epitope hoặc có các epitope khác nhau, phản ứng với các kháng thể khác nhau hiện diện trong kháng huyết thanh đa dòng.

19.4.2. Hiện tượng prozone

Phản ứng kháng nguyên và kháng thể xảy ra chỉ khi nào mà tỷ lệ kháng nguyên và kháng thể là tối thích trong hỗn hợp phản ứng cân bằng gọi là vùng cân bằng. Ngoài vùng cân bằng này, sự trầm hiện sẽ không xuất hiện bởi vì có quá nhiều kháng nguyên hoặc là kháng thể. Vùng kháng thể quá nhiều được gọi là hiện tượng prozone và vùng kháng nguyên quá nhiều được gọi là hiện tượng postzone (Hình 19.1).

Năm 1934, Marrack đã đề xuất "giả thuyết mạng lưới" để lý giải thích hiện tượng prozone. Giả thuyết của Marrack dựa trên sự thừa nhận rằng mỗi phân tử kháng thể phải có ít nhất hai vị trí liên kết và kháng nguyên phải là đa hóa trị. Trong vùng cân bằng khi

có sự trầm hiện tối thích xảy ra, thì số lượng các vị trí đa hóa trị của kháng nguyên và kháng thể tương đối bằng nhau. Trong vùng này, sự trầm hiện xảy ra là kết quả của phản ứng ngẫu nhiên, thuận nghịch do đó mỗi kháng thể liên kết với nhiều hơn một kháng nguyên và ngược lại, hình thành nên một mạng lưới bền vững. Khi chúng kết hợp lại với nhau sẽ hình thành nên mạng lưới nội phân tử làm tăng kích thước cho đến khi khối này trầm hiện hay kết tủa tách ra khỏi dung dịch.



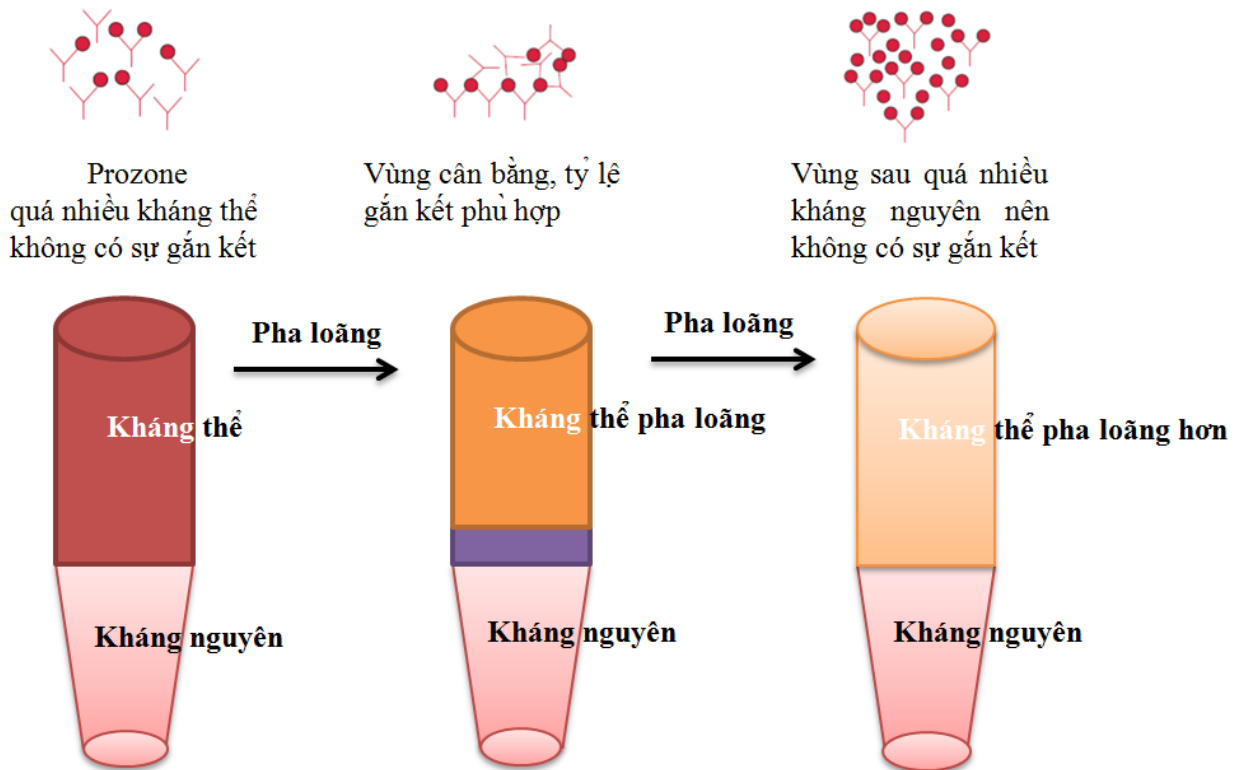
Hình 19.1. Minh họa hiện tượng prozone

Ở hiện tượng prozone (vùng trước cân bằng phản ứng kháng nguyên - kháng thể), có quá nhiều kháng thể nên khó có thể hình thành nên mạng lưới hiệu quả. Điều này là do kháng nguyên chỉ kết hợp với một số ít kháng thể và không có liên kết chéo được hình thành (Hình 19.2).

Ở hiện tượng postzone (vùng sau cân bằng phản ứng kháng nguyên - kháng thể), các khối tập hợp nhỏ được các kháng nguyên dư thừa bao xung quanh và ngược lại không có mạng lưới được hình thành. Vì vậy để có thể phát hiện được phản ứng trầm hiện, chúng phải được tiến hành trong vùng cân bằng (Hình 19.2).

Hiện tượng prozone và postzone được sử dụng để xem xét trong việc tổng hợp kết quả thử nghiệm huyết thanh, bởi vì phản ứng âm tính giả có thể xảy ra trong những

trường hợp này. Khi nghi ngờ phản ứng âm tính giả do hiện tượng prozone có thể điều chỉnh lại bằng cách pha loãng kháng thể và tiến hành thử nghiệm lại. Trong hiện tượng postzone, kháng nguyên quá nhiều có thể che khuất sự hiện diện của một lượng nhỏ kháng thể.



Hình 19.2. Sơ đồ minh họa giả thuyết mạng lưới của Marrack.

19.4.3. Các kiểu phản ứng trầm hiện

Các phản ứng trầm hiện có thể có ba kiểu chính như sau: (1). Trầm hiện trong dung dịch. (2). Trầm hiện trong thạch. (3). Trầm hiện trong thạch có điện trường.

(1). Trầm hiện trong dung dịch: như (i) thử nghiệm vòng và (ii) thử nghiệm kết bông (keo lắng) là những ví dụ về trầm hiện trong dung dịch.

(i) thử nghiệm vòng: trong thử nghiệm này, dung dịch kháng nguyên được phủ lên kháng huyết thanh có trong ống nghiệm. Sự trầm hiện giữa kháng nguyên và kháng thể trong dung dịch kháng huyết thanh được đánh dấu bằng sự xuất hiện vòng trầm hiện tại vị trí nối giữa hai lớp dung dịch lỏng. Ví dụ, thử nghiệm vòng được dùng để xác định protein phản ứng C (CRP) và sử dụng để phân nhóm vi khuẩn streptococcus bằng

phương pháp Lancefield.

(ii) thử nghiệm kết bông: thử nghiệm kết bông có thể được tiến hành trên lam kính hoặc trong ống nghiệm, ví dụ thử nghiệm VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) dùng để phát hiện kháng thể reagin trong bệnh giang mai. Trong thử nghiệm này, một giọt dịch huyền phù kháng nguyên VDRL được thêm vào huyết thanh của bệnh nhân có sẵn trên lam kính và ghi nhận kết quả sau khi lắc lam kính trên thiết bị lắc VDRL. Ở thử nghiệm dương tính, xuất hiện kết bông dễ dàng thấy được dưới kính hiển vi. Thử nghiệm Kahn cho bệnh giang mai là một ví dụ về thử nghiệm kết bông trong ống nghiệm. Thử nghiệm kết bông trong ống nghiệm đã được chuẩn hoá để phát hiện độc tố và biến độc tố.

(2). Trầm hiện trong thạch: thử nghiệm trầm hiện trong thạch gel được gọi là thử nghiệm khuếch tán miễn dịch. Trong thử nghiệm này, chất phản ứng được thêm vào gel và sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể xảy ra nhờ khuếch tán. Tốc độ khuếch tán bị ảnh hưởng bởi kích thước của các hạt, nhiệt độ, độ nhớt gel, số lượng thuỷ hoá (hydration) và sự tương tác giữa chất nền (matrix) và chất phản ứng.

Hàm lượng thạch khoảng 0,3 - 1,5% cho phép phân tán hầu hết các chất phản ứng. Agarose thường phù hợp hơn so với thạch (agar) bởi vì thạch có điện tích âm lớn trong khi agarose hầu như không có, vì vậy tương tác giữa gel và các chất phản ứng là tối thiểu nhất.

Phản ứng khuếch tán miễn dịch có những thuận lợi sau: (a). Trong thử nghiệm này, sự trầm hiện là thấy được là một vạch (band), vạch này cũng có thể nhuộm để bảo quản lại. (b). Thử nghiệm có thể được sử dụng để phát hiện sự giống nhau, phản ứng chéo và không giống nhau giữa các kháng nguyên trong hỗn hợp phản ứng.

Các kiểu phản ứng khuếch tán miễn dịch: phản ứng khuếch tán miễn dịch được phân nhóm dựa trên (a) số lượng chất phản ứng khuếch tán và (b) hướng khuếch tán, cụ thể như sau:

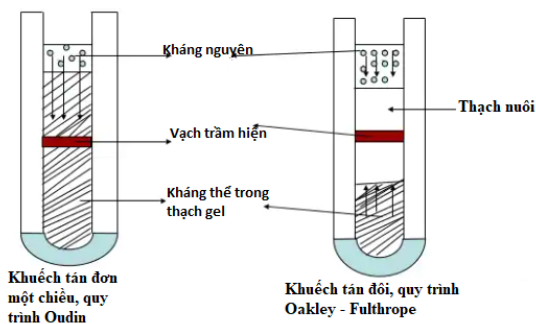
Khuếch tán đơn một chiều: khuếch tán đơn một chiều là sự khuếch tán của kháng nguyên trong thạch theo một chiều. Khuếch tán đơn một chiều này còn được gọi là quy trình *Oudin*. Kỹ thuật này được Oudin là người tiên phong phát triển. Lần đầu tiên

ông sử dụng gel cho phản ứng trầm hiện. Trong phương pháp này, kháng thể được kết hợp trong thạch gel có trong ống nghiệm và dung dịch kháng nguyên được đổ qua ống nghiệm này. Trong thời gian thí nghiệm, kháng nguyên khuếch tán kháng thể theo hướng đi xuống trong thạch gel và ranh giới trầm hiện được hình thành. Số lượng vạch trầm hiện biểu thị cho số lượng kháng nguyên khác nhau hiện diện trong dung dịch kháng nguyên.

Khuếch tán đơn theo hai chiều: khuếch tán đơn theo hai chiều còn được gọi là khuếch tán miễn dịch vòng. Trong phương pháp này, dung dịch kháng huyết thanh chứa kháng thể được kết hợp trong thạch gel trên bề mặt lam kính hay đĩa Petri. Cắt các giếng trên bề mặt gel. Sau đó kháng nguyên được cho vào trong giếng gel. Khi kháng thể hiện diện trong gel phản ứng với kháng nguyên, chúng sẽ khuếch tán ra khỏi giếng, một vòng trầm hiện được hình thành xung quanh giếng. Kích thước của vòng này tỷ lệ trực tiếp với nồng độ kháng nguyên. Số lượng kháng nguyên trong giếng càng lớn thì khoảng cách của vòng càng xa khỏi giếng.

Miễn dịch khuếch tán vòng được sử dụng để ước lượng kháng thể và kháng nguyên trong huyết thanh. Nó được sử dụng để đo: (a) kháng thể IgG, IgM, IgA và các thành phần bổ thể trong huyết thanh, (b) kháng thể trong huyết thanh do virus gây bệnh cúm và (c) xác định yếu tố chuyển transferrin trong huyết thanh và α -fetoprotein.

Tuy nhiên hiện nay thử nghiệm này không được sử dụng nữa và được thay thế



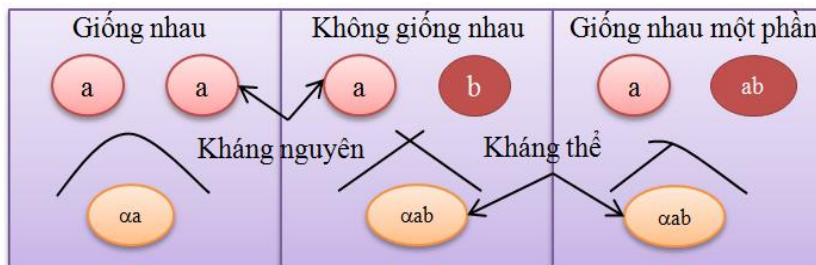
bằng những phương pháp tự động và nhạy hơn như phép đo định lượng qua độ đục (nephelometry) và phương pháp miễn dịch dựa trên enzyme liên kết (ELISA).

Hình 19.3. Hình ảnh minh họa khuếch tán miễn dịch đơn và miễn dịch đôi.

Khuếch tán đôi theo một chiều: phương pháp này còn được gọi là quy trình Oakley - Fulthrope. Theo đó kháng thể được kết hợp trong thạch gel ở ống nghiệm, phía trên là lớp thạch nuôi (plain agar). Sau đó kháng nguyên được trải lên trên cùng lớp thạch nuôi này. Trong quá trình thử nghiệm, kháng nguyên và kháng thể di chuyển về hướng lẫn nhau xen qua lớp thạch nuôi. Trong vùng thạch nuôi này, cả kháng nguyên và kháng

thể phản ứng với nhau để hình thành vạch trầm hiện tại nồng độ tối thích (Hình 19.3).

Khuếch tán đôi theo hai chiều: phương pháp này còn gọi là quy trình *Ouchterlony*. Trong phương pháp này cả kháng nguyên và kháng thể khuếch tán qua thạch gel theo hai hướng độc lập nhau đó là theo chiều ngang và chiều dọc (Hình 19.4).



Thử nghiệm được tiến hành bằng cách cắt các giếng trong thạch gel đã được đổ lên lam kính hay đĩa Petri trước đó.

Hình 19.4. Sơ đồ minh họa quy trình Ouchterlony.

Kháng huyết thanh gồm có kháng thể được cho vào giữa giếng và các kháng nguyên khác nhau được thêm vào giếng bao xung quanh tâm giếng. Sau khi ủ 12 - 48 giờ trong bình âm, ranh giới của chất trầm hiện precipitin được hình thành tại các vị trí có sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể (Hình 19.4). Có ba kiểu phản ứng được chứng minh như sau:

(1). Ranh giới trầm hiện tại chỗ gặp nhau của chúng hình thành cầu lõm biểu thị cho sự giống nhau của về huyết thanh hay sự hiện diện của epitope chung trong kháng nguyên.

(2). Kiểu hai đường chéo nhau chứng minh hai phản ứng tách biệt nhau và biểu thị rằng các kháng nguyên không có quan hệ với nhau và cũng không có các epitope chung.

(3). Sự dung hợp của hai đường biểu thị cho phản ứng chéo nhau hay có sự giống nhau một phần. Trong trường hợp này, hai kháng nguyên có cùng một epitope chung nhưng một số phân tử kháng thể không bị kháng nguyên bắt được và đi ngang qua đường của chất trầm hiện precipitin ban đầu để kết hợp với epitope phụ được tìm thấy ở nhiều phức hợp kháng nguyên.

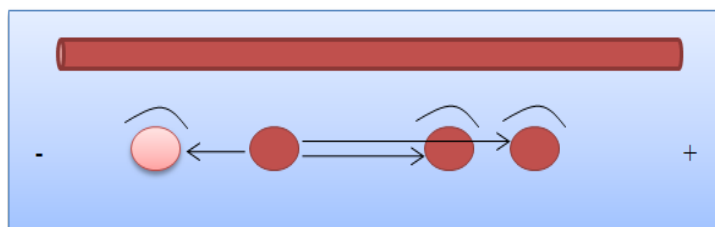
Khuếch tán đôi theo hai hướng được sử dụng để: (a) chứng minh kháng thể trong chẩn đoán huyết thanh bệnh đậu mùa, (b) định danh kháng nguyên nấm và (c) phát hiện kháng thể để có thể ly trích được kháng thể bệnh nhân.

Thử nghiệm trầm hiện Elek trong gel là một thử nghiệm đặc biệt, được sử dụng để

chứng minh tính sinh độc tố của *Corynebacterium diphtheriae*.

Trầm hiện trong thạch có điện trường: gồm: (a) điện di miễn dịch, (b) điện di miễn dịch đối dòng, (c) điện di tên lửa, (d) điện di miễn dịch theo hai hướng.

Điện di miễn dịch: điện di miễn dịch là một quá trình có sự kết hợp giữa khuếch tán miễn dịch và điện di miễn dịch. Đó là một phương pháp sử dụng điện trường để tách các kháng nguyên khác nhau trong huyết thanh dựa trên điện tích của chúng. Trong phương pháp này, một giọt kháng nguyên được đặt vào giếng ở trong thạch trên lam kính. Sau đó một dòng điện được chạy qua thạch. Trong quá trình điện di kháng nguyên di chuyển trong điện trường theo điện tích và kích thước của chúng. Sau khi điện di, phần lõm được cắt vào trong thạch và được phủ đầy kháng thể và theo dõi khuếch tán xảy ra. Khi kháng nguyên và kháng thể khuếch tán theo hướng với nhau, chúng hình thành nên



một chuỗi các dòng trầm hiện (Hình 19.5).

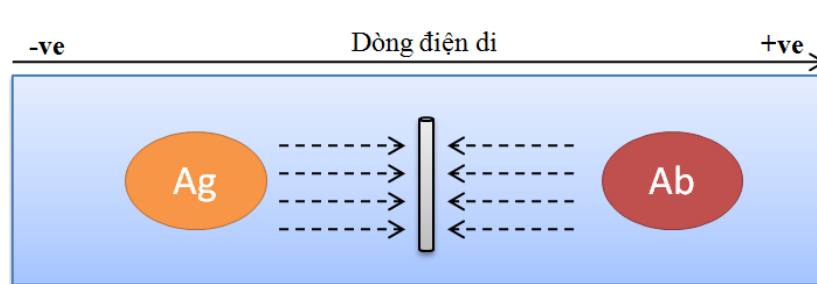
Hình 19.5. Sơ đồ minh họa điện di miễn dịch.

Thuận lợi chính của điện di miễn dịch là có thể xác định được số lượng kháng nguyên có trong huyết thanh. Phương pháp này được sử dụng để phát hiện các protein thông thường cũng như protein khác thường như myeloma protein trong huyết thanh người.

Điện di miễn dịch đối dòng: điện di miễn dịch đối dòng phụ thuộc vào sự di chuyển của kháng nguyên về hướng cực dương (anode) và kháng thể về hướng cực âm (cathode) xuyên qua thạch trong điều kiện có điện trường. Thử nghiệm được tiến hành trên lam kính có agarose với hai giếng được đục lỗ. Trong đó một giếng được lấp đầy kháng nguyên, giếng còn lại là kháng thể. Sau đó cho dòng điện đi qua gel. Sự di chuyển của kháng nguyên và kháng thể thật sự được thuận lợi dưới tác dụng điện trường và vạch trầm hiện thấy được trong 30 - 60 phút (Hình 19.6).

Điện di miễn dịch đối dòng được sử dụng trong nhiều trường hợp vì nó là phương pháp nhanh và có tính chuyên biệt cao dùng để phát hiện cả kháng nguyên và kháng thể trong huyết thanh, dịch não tủy và các dịch cơ thể khác được sử dụng để phát hiện nhiều

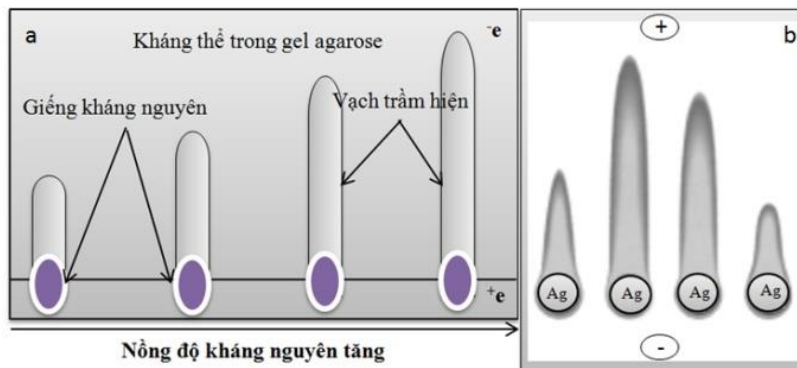
bệnh xâm nhiễm do vi khuẩn, virus, nấm và ký sinh trùng. Phương pháp điện di miễn dịch đối dòng thường được sử dụng để phát hiện kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg), α -fetoprotein, kháng nguyên của nang ấu trùng sán lá (hydatid) và



kháng nguyên amip trong huyết thanh, kháng nguyên của cryptococcus và kháng nguyên trong dịch não tủy (CSF).

Hình 19.6. Sơ đồ minh họa điện di miễn dịch đối dòng.

Điện di tên lửa: kỹ thuật này là mô phỏng theo khuếch tán miễn dịch vòng do Laurell phát triển. Nó được gọi như vậy là do hình dạng của các vạch chất trầm hiện tại đầu cuối của phản ứng có dạng giống như cấu trúc của hình nón hay còn gọi là hình dạng tên lửa (Hình 19.7). Trong phương pháp này, kháng thể được kết hợp trong gel và kháng nguyên được đặt vào trong giếng của gel. Sau đó cho dòng điện chạy qua gel, dòng điện này sẽ tạo thuận lợi cho sự di chuyển kháng nguyên vào trong thạch. Kết quả hình thành dòng chất trầm hiện có dạng hình nón, giống như tên lửa. Chiều cao của tên lửa được đo



từ giếng đến đỉnh thì tỷ lệ trực tiếp với lượng kháng nguyên có trong mẫu. Điện di tên lửa chủ yếu được sử dụng để ước lượng định lượng kháng nguyên có trong huyết thanh.

Hình 19.7. Ví dụ minh họa về điện di tên lửa.

Điện di miễn dịch theo hai hướng: điện di miễn dịch theo hai hướng là một biến thể của điện di tên lửa. Nó là kỹ thuật khuếch tán đôi được sử dụng để phân tích định tính cũng như phân tích định lượng khoảng rộng kháng nguyên có trong huyết thanh. Quy trình thử nghiệm này có hai giai đoạn. Giai đoạn thứ nhất, kháng thể trong dung dịch được tách bằng điện di. Giai đoạn thứ hai, điện di lại một lần nữa, nhưng vuông góc với

bước đầu để thu nhận sự trầm hiện giống như tên lửa.

Trong thử nghiệm này, trước tiên cắt một lỗ nhỏ vào thạch gel được đổ trên khay thủy tinh và lấp đầy dung dịch kháng thể. Sau đó cho dòng điện chạy qua gel này, các kháng nguyên di chuyển trong gel với tốc độ phù hợp với điện tích của chúng. Ở giai đoạn hai sau khi điện di, miếng gel chứa kháng nguyên được tách ra, đặt vào khay thủy tinh thứ hai và thạch có chứa kháng thể được rót xung quanh miếng gel này. Điện thế thứ hai được áp dụng vuông góc với hướng di chuyển ban đầu. Sau đó các kháng nguyên tách lại này được di chuyển vào gel có kháng thể ở tốc độ phù hợp với điện tích của chúng và trầm hiện với kháng thể có trong gel, hình thành nên vùng trầm hiện. Phương pháp này vừa có cả định tính dùng để xác định các kháng nguyên khác nhau hiện diện trong dung dịch huyết thanh vừa có cả định lượng xác định số lượng kháng nguyên khác nhau có trong dung dịch.

Đo độ đục miễn dịch: phương pháp đo độ đục bằng cách đo ánh sáng hấp thụ (turbidimetry) và đo độ đục bằng ánh sáng phân tán (nephelometry) là hai phương pháp được sử dụng để định lượng phản ứng trầm hiện trong huyết thanh dựa trên hiện tượng phân tán ánh sáng do các chất trầm hiện trong dung dịch tạo ra.

Đo độ đục bằng ánh sáng hấp thụ là sự đo lường độ đục hay sự vẩn đục do các chất trầm hiện có trong dung dịch. Trong phương pháp này, thiết bị phát hiện được đặt trực tiếp tại đường có ánh sáng tới để thu nhận ánh sáng sau khi nó đi qua dung dịch. Vì vậy nó sẽ đo được sự sụt giảm về cường độ ánh sáng do phản xạ, hấp thụ hay phân tán. Phân tán ánh sáng xảy ra tương ứng với kích thước, hình dạng và nồng độ của các chất trầm hiện có trong dung dịch.

Đo độ đục bằng cách đo ánh sáng phân tán là sự cải tiến về kỹ thuật đo độ đục, phương pháp này đo ánh sáng bị phân tán tại một góc cụ thể từ chùm ánh sáng tới khi chùm này đi qua dịch huyền phù có chứa các chất trầm hiện kháng nguyên - kháng thể. Lượng ánh sáng bị phân tán là một chỉ số về nồng độ của dung dịch. Khởi đầu với một lượng không đổi kháng thể, số lượng tăng lên của kháng nguyên sẽ làm phức hợp kháng nguyên - kháng thể tăng lên. Vì vậy mối quan hệ giữa nồng độ kháng nguyên được biểu thị bằng sự hình thành phức hợp - kháng nguyên kháng thể và ánh sáng phân tán gần như

là tuyến tính. Bằng cách sử dụng máy tính, giá trị chính xác của kháng nguyên hay kháng thể trong huyết thanh có thể được ước lượng qua hệ thống này. Để cải thiện độ nhạy của hệ thống này, chùm laser được sử dụng làm nguồn ánh sáng tới.

Đo độ đục bằng cách đo ánh sáng phân tán hiện nay đang trở thành là phương pháp lựa chọn trong nhiều phòng thí nghiệm để đo lường protein huyết tương gồm IgG, IgM và IgA, các thành phần bổ thể, yếu tố gây bệnh thấp khớp (RA), yếu tố kháng streptolysin O,

19.4.4. Ngưng kết

Ngưng kết là phản ứng kháng nguyên - kháng thể mà theo đó kháng nguyên kết hợp với kháng thể của nó khi có mặt của các chất điện giải ở nhiệt độ và pH đặc trưng để hình thành sự đông tụ thấy được bằng mắt thường. Sự ngưng kết xảy ra tối thích khi tỷ lệ giữa kháng nguyên và kháng thể bằng nhau.

Phản ứng ngưng kết cơ bản tương tự như phản ứng trâm hiện và cùng có các đặc tính tương tự nhau. Phản ứng này thì tương tự như phản ứng trâm hiện ở chỗ kháng thể hoạt động như một cầu nối để hình thành mạng lưới kháng thể và tế bào mang kháng nguyên trên bề mặt của chúng. Do các tế bào này lớn hơn nhiều so với kháng nguyên hòa tan dẫn đến làm cho các tế bào gắn kết thành các khối tụ lại nên dễ dàng thấy được.

Ngưng kết khác với phản ứng trâm hiện chỗ phản ứng ngưng kết diễn ra tại bề mặt của hạt có liên quan, kháng nguyên phải được phơi ra và có thể liên kết với kháng thể để tạo ra các khối gắn kết nhìn thấy được. Trong phản ứng ngưng kết, chuẩn bị dãy pha loãng dung dịch kháng thể và cho vào dãy dung dịch pha loãng này một lượng không đổi kháng nguyên. Sau một vài giờ ủ ở 37°C, sự kết tụ được ghi nhận bằng mắt thường. Số lượng kháng huyết thanh ghi nhận được phản ánh sự nghịch đảo của sự pha loãng cao nhất gây ngưng tụ.

Do tế bào có nhiều yếu tố quyết định kháng thể trên bề mặt, nên hiện tượng kháng thể dư thừa hiếm khi xảy ra. Đôi khi kháng thể được hình thành phản ứng với yếu tố quyết định kháng nguyên của tế bào nhưng không gây ra sự ngưng kết. Sau đó chúng ức chế sự ngưng kết bằng cách bổ sung thêm các kháng thể hoàn chỉnh vào. Các kháng thể như vậy được gọi là kháng thể kìm hãm. Kháng thể kháng Rh và kháng thể kháng

brucella là một số ít ví dụ về các kháng thể kìm hãm.

Phản ứng ngưng kết được ứng dụng rộng rãi để phát hiện cả kháng nguyên và kháng thể trong huyết tương và các dịch cơ thể khác. Phản ứng ngưng kết này cũng rất nhạy và kết quả thử nghiệm dễ dàng đọc được bằng mắt thường.

Các loại phản ứng ngưng kết: phản ứng ngưng kết xảy ra khi kháng nguyên được phát hiện một cách tự nhiên trên một hạt được biết là sự ngưng kết trực tiếp. Kiểu ngưng kết này khác với ngưng kết thụ động ở chỗ sử dụng các hạt được phủ với kháng nguyên thường không được phát hiện trên bề mặt của chúng.

Ngưng kết trực tiếp: ngưng kết trực tiếp có thể có các kiểu như sau: (a) ngưng kết trên lam kính, (b) ngưng kết trong ống nghiệm, (c) ngưng kết dị ái và (d) thử nghiệm globulin kháng hay thử nghiệm Coombs.

Thử nghiệm ngưng kết trên lam kính: đây là kiểu cơ bản của phản ứng ngưng kết được tiến hành trên lam kính. Xác định các type vi khuẩn là một ví dụ kinh điển về sự ngưng kết trực tiếp vẫn được sử dụng đến ngày nay. Trong thử nghiệm này, dịch huyền phù vi khuẩn được chuẩn bị và thêm vào giọt kháng huyết thanh tiêu chuẩn đã được chuẩn bị trước trên lam.

Phản ứng dương tính được biểu thị bằng sự ngưng kết khối của vi khuẩn và dung dịch nền trong lại. Thử nghiệm dương tính khi ngưng kết xảy ra ngay hoặc trong vòng vài giây. Thử nghiệm kiểm soát dùng để đánh giá kết quả thử nghiệm gồm dịch huyền phù kháng nguyên trong nước muối nhưng không thêm huyết thanh kháng được thực hiện tương tự trên lam kính. Thử nghiệm kiểm soát này cũng có thể cho kết quả dương tính giả do sự tự ngưng kết của kháng nguyên.

Thử nghiệm ngưng kết trên lam được sử dụng: (i) như là quy trình thường quy để xác định các chủng vi khuẩn như *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, ... được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm và thực phẩm. (ii) dùng để xếp nhóm máu và xác định phản ứng chéo.

Thử nghiệm ngưng kết trong ống nghiệm: thử nghiệm ngưng kết trong ống nghiệm được tiến hành trong ống nghiệm thủy tinh. Trong thử nghiệm này, huyết thanh bệnh nhân được pha loãng thành một dãy ống nghiệm và kháng nguyên vi khuẩn chuyên biệt của bệnh nghi ngờ được thêm vào. Phản ứng kháng nguyên và kháng thể được chứng

minh nhờ sự ngưng tụ thấy được bằng mắt thường. Đây là phương pháp chuẩn được sử dụng để ước lượng định lượng kháng thể trong huyết thanh. Thử nghiệm ngưng kết trong ống nghiệm là phương pháp thường quy dùng để chứng minh kháng thể trong huyết thanh dùng cho chuẩn đoán huyết thanh kháng số do vi khuẩn đường ruột và bệnh do brucella như sau:

- Thử nghiệm widal được sử dụng để chẩn đoán sốt do vi khuẩn đường ruột và sử dụng để phân biệt các kháng nguyên khác nhau của *Salmonella* là TO, TH, AH và BH để phát hiện sự hiện diện của các kháng thể đối với *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* A và *S. paratyphi* B trong huyết thanh của bệnh nhân.
- Thử nghiệm ngưng kết tiêu chuẩn là thử nghiệm thường được sử dụng phổ biến để chẩn đoán huyết thanh kháng bệnh do brucella. Tuy nhiên thử nghiệm ngưng kết trong ống nghiệm đối với bệnh do brucella thì phức tạp do hiện tượng prozone. Điều này là do nồng độ kháng thể brucella cao trong huyết thanh của bệnh nhân dẫn đến làm cho phản ứng âm tính giả. Vấn đề này được loại bỏ bằng cách pha loãng huyết thanh để ngăn chặn phản ứng dương tính giả. Sự hiện diện của kháng thể gây ức chế hoặc kháng thể chưa hoàn toàn trong huyết thanh là một vấn đề khác. Vấn đề này có thể tránh được bằng cách sử dụng globulin kháng hay thử nghiệm Coombs để phát hiện các kháng thể này.

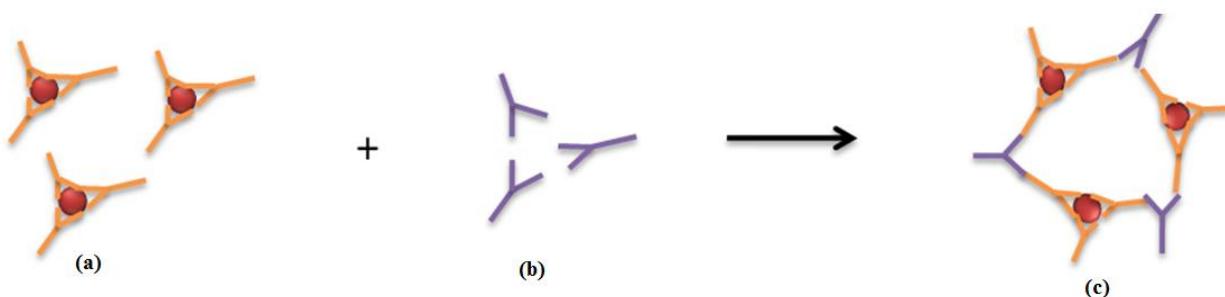
Thử nghiệm ngưng kết dị ái (Heterophile agglutination): thử nghiệm này phụ thuộc vào kháng thể dị ái trong huyết thanh ở một số bệnh do vi khuẩn:

- Thử nghiệm Weil–Felix là một ví dụ về phản ứng ngưng kết dị ái dùng để chẩn đoán huyết thanh của bệnh do rickettsia. Trong thử nghiệm này các kháng thể phản ứng chéo được tạo ra để chống lại rickettsia gây bệnh được phát hiện bằng cách sử dụng các kháng nguyên có liên quan đến phản ứng chéo ví dụ như các chủng OXK, OX19 và OX2 của proteus. Mặc dù kháng thể được tạo ra chống lại rickettsia, nhưng chúng phản ứng chéo với kháng nguyên của các chủng OXK, OX19 và OX2 thuộc proteus.
- Thử nghiệm Paul–Bunnell là một thử nghiệm ngưng kết dị ái, thử nghiệm này được sử dụng để phát hiện kháng thể ở bệnh tăng bạch cầu đơn nhân

(mononucleosis) bằng cách sử dụng hồng cầu cừu làm kháng nguyên.

- Thử nghiệm ngưng kết *Streptococcus* MG thì tương tự như thử nghiệm được sử dụng để phát hiện kháng thể do *Mycoplasma pneumoniae* chủ yếu gây bệnh viêm phổi không điển hình.

Thử nghiệm kháng globulin hay thử nghiệm Coombs': thử nghiệm Coombs' được các tác giả Coombs', Mourant và Race sáng chế để phát hiện các kháng thể kháng Rh không hoàn toàn thì không có khả năng ngưng kết với hồng cầu Rh⁺ trong nước muối. Khi huyết thanh chứa các kháng thể kháng Rh không hoàn toàn được trộn với hồng cầu Rh⁺ trong nước muối, thì globulin kháng không hoàn toàn này phủ lên bề mặt của hồng cầu nhưng không tạo ra sự ngưng kết nào. Khi những hồng cầu như vậy được xử lý với globulin kháng hay huyết thanh Coombs' (kháng huyết thanh chống lại γ -globulin), sau đó các tế bào bị ngưng kết. Có hai nhóm thử nghiệm Coombs: (a) thử nghiệm Coombs' trực tiếp (b) thử nghiệm Coombs' gián tiếp.

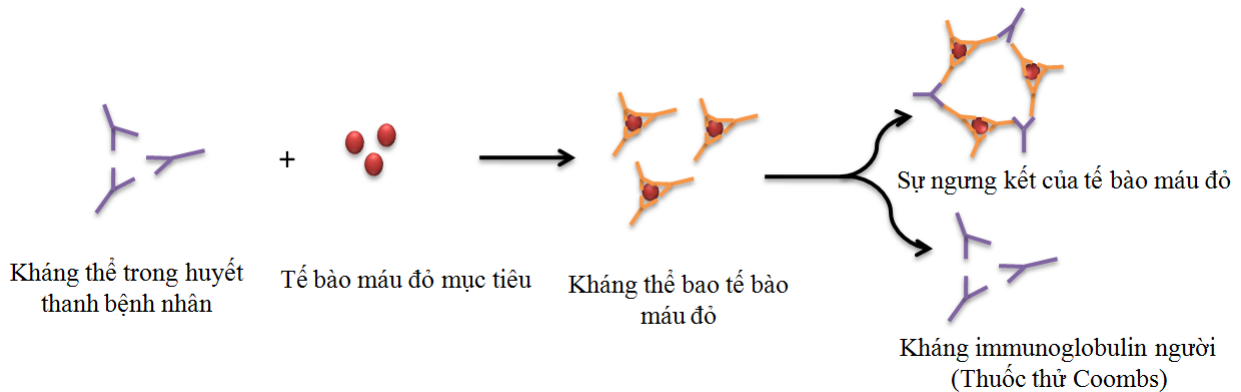


Hình 19.8. Sơ đồ minh họa nguyên tắc của thử nghiệm Coombs trực tiếp. (a). Kháng thể gắn kết với tế bào máu đỏ của bệnh nhân, (b). Thuốc thử Comb (kháng immunoglobulin người), (c). Sự ngưng kết của tế bào máu đỏ.

(a). Thử nghiệm Coombs' trực tiếp: trong thử nghiệm này, sự nhạy cảm của tế bào máu đỏ (RBCs) với các kháng thể chưa hoàn toàn xảy ra trong cơ thể sống (*in vivo*). Các kháng thể gắn kết với tế bào có thể được phát hiện bằng thử nghiệm này. Theo đó huyết thanh kháng chống lại immunoglobulin ở người được sử dụng để ngưng kết với các tế bào máu đỏ của bệnh nhân (Hình 19.8).

(b). Thử nghiệm Coombs' bán trực tiếp: sự nhạy cảm của các tế bào máu đỏ với các kháng thể chưa hoàn toàn diễn ra trong *in vitro*. Trong thử nghiệm này, huyết thanh

của bệnh nhân được trộn với các tế bào máu đỏ bình thường và cho thêm kháng huyết thanh đối với immunoglobulin người. Sự ngưng kết xảy ra nếu kháng thể có trong huyết thanh bệnh nhân (Hình 19.9). Thử nghiệm Coombs' được sử dụng để phát hiện (a) kháng thể kháng Rh và (b) kháng thể chưa hoàn thành ở bệnh do brucella và các bệnh khác.



Hình 19.9. Sơ đồ minh họa nguyên tắc thử nghiệm Coombs bán trực tiếp.

Ngưng kết thụ động: ngưng kết thụ động được tiến hành với các hạt mang có phủ các kháng nguyên hoà tan. Điều này thường được thực hiện bằng cách chuyển đổi phản ứng trầm hiện thành phản ứng ngưng kết, do phản ứng ngưng kết thực hiện và đọc kết quả dễ dàng hơn và cũng nhạy hơn so với phản ứng trầm hiện trong việc phát hiện kháng thể.

Khi kháng thể thay thế kháng nguyên được hấp thu trên hạt mang để phát hiện kháng nguyên, thì nó được gọi là ngưng kết thụ động ngược (reverse passive agglutination).

Mãi đến những năm của thập niên 1970, hồng cầu là các hạt mang được chính thức sử dụng để phủ kháng nguyên. Tuy nhiên hiện nay nhiều hạt mang khác gồm polystyrene latex, bentonite và charcoal được sử dụng cho mục đích này. Hạt có kích thước dao động từ 7 μm cho đến các tế bào máu đỏ có kích thước 0,05 μm và cho đến các hạt latex rất mịn. Việc sử dụng các hạt tổng hợp mang lại các điểm thuận lợi như: làm ổn định, đồng nhất và bền vững.

Phản ứng cũng dễ dàng đọc được bằng mắt thường. Phản ứng ngưng kết thụ động, phụ thuộc vào các hạt mang được sử dụng, có thể có các kiểu sau: (i) thử nghiệm ngưng kết latex, (ii) thử nghiệm ngưng kết hồng cầu và (iii) thử nghiệm đông tụ.

Thử nghiệm ngưng kết latex: đây là thử nghiệm sử dụng các hạt latex làm chất mang kháng nguyên hay kháng thể. Năm 1955, Singer và Plotz tình cờ phát hiện IgG được hấp thụ một cách tự nhiên lên bề mặt của các hạt polystyrene latex.

Các hạt latex thì không đắt, tương đối ổn định và không có hoạt tính phản ứng chéo với các kháng thể khác. Những hạt này có thể được phủ các kháng thể để phát hiện kháng nguyên trong huyết thanh và trong các dịch cơ thể khác. Sử dụng kháng thể đơn dòng làm giảm phản ứng chéo và vì vậy làm giảm các phản ứng dương tính giả.

Hơn nữa kích thước hạt latex lớn nên tạo thuận lợi trong việc quan sát phản ứng kháng nguyên kháng thể tốt hơn bằng mắt thường. Thử nghiệm thường được tiến hành trên cardboard card hay lam kính và phản ứng dương tính được phân hạng từ 1+ đến 4+.

Thử nghiệm ngưng kết latex được sử dụng như sau: (1). Thử nghiệm này được sử dụng để xác định nhanh kháng nguyên của nhóm B streptococcus, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Cryptococcus neoformans*, (2). Để phát hiện các kháng nguyên hoà tan của vi sinh vật có trong nước tiểu, dịch não tủy và huyết thanh dùng chẩn đoán nhiều bệnh xâm nhiễm. (3). Để phát hiện các yếu tố RA, ASLO, CRP, ... có trong các mẫu huyết thanh.

Thử nghiệm ngưng kết hồng cầu: tế bào máu đỏ được sử dụng làm các hạt mang trong thử nghiệm ngưng kết hồng cầu. Tế bào máu đỏ của cừu, người, gà, ...thường được sử dụng trong thử nghiệm này. Khi các tế bào máu đỏ được phủ với kháng nguyên để phát hiện kháng thể trong huyết thanh thì thử nghiệm này được gọi là thử nghiệm ngưng kết hồng cầu bán trực tiếp (IHA). Thử nghiệm IHA là phép thử được sử dụng phổ biến nhất để chẩn đoán huyết thanh của nhiều bệnh do ký sinh trùng gồm bệnh do amip, bệnh do nang ấu trùng sán lá và bệnh do toxoplasma.

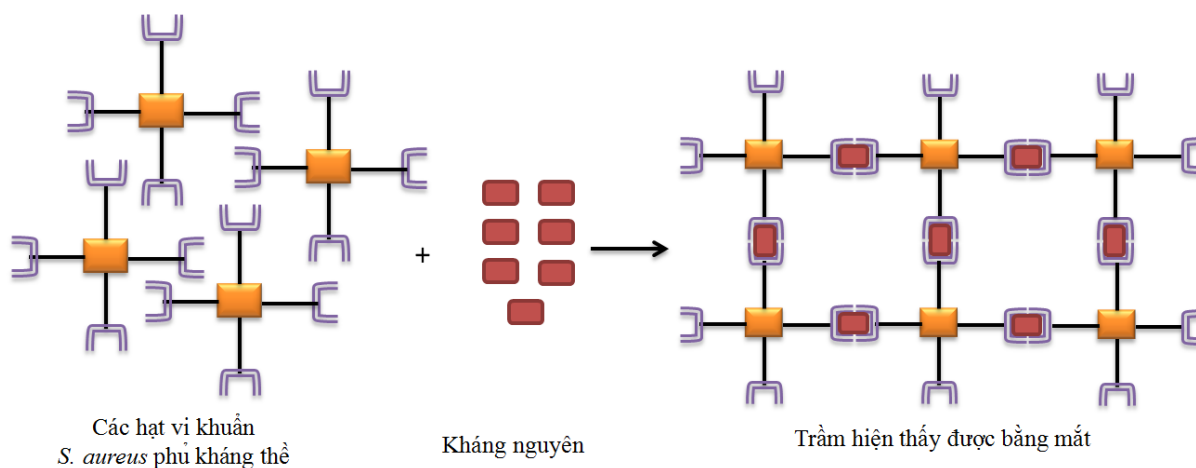
Khi kháng thể được bám dính vào tế bào máu đỏ để phát hiện kháng nguyên vi sinh vật thì nó được gọi là ngưng kết hồng cầu thụ động ngược (RPHA). RPHA được sử dụng rộng rãi trong quá khứ để phát hiện kháng nguyên virus như HBsAg trong huyết thanh để chẩn đoán bệnh do virus siêu vi gan B. Thử nghiệm này cũng được sử dụng để phát hiện kháng nguyên trong nhiều bệnh do ký sinh trùng và virus khác.

Ngưng kết hồng cầu do virus: nhiều virus gồm virus cúm, virus gây bệnh quai bị

và virus gây bệnh sởi có khả năng ngưng kết với các tế bào máu đỏ mà không có phản ứng kháng nguyên - kháng thể. Quá trình này được gọi là sự ngưng kết hồng cầu do virus. Sự ngưng kết hồng cầu này có thể bị ức chế do kháng thể trực tiếp chống lại virus một cách chuyên biệt và hiện tượng này được gọi là sự ức chế ngưng kết hồng cầu. Đây là hình thức cơ bản của thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu do virus, được sử dụng để phát hiện kháng thể trong huyết thanh của bệnh nhân trung hoà virus đang ngưng kết. Để tiến hành thử nghiệm này, trước tiên huyết thanh của bệnh nhân được ủ với mẫu chuẩn bị có virus. Sau đó thêm các tế bào máu đỏ vào phần chuẩn bị có virus có khả năng ngưng kết. Nếu kháng thể hiện diện, chúng sẽ kết hợp với các hạt virus và ngăn chặn sự ngưng kết và nếu không có hoặc ngưng kết giảm biểu thị cho kháng thể có trong huyết thanh bệnh nhân.

19.4.5. Thử nghiệm đông tụ

Sự đông tụ (coagglutination) là một kiểu phản ứng đông tụ mà theo đó chủng Cowan I của *S. aureus* được sử dụng làm hạt mang để phủ kháng thể. Chủng Cowan I của *S. aureus* có protein A, một kháng thể, kết hợp với phần Fc của immunoglobulin, IgG, để bề mặt vùng Fab tự do phản ứng với kháng nguyên có mặt trong mẫu thử (Hình 19.10).



Hình 19.10. Sơ đồ minh họa nguyên tắc của phản ứng đông tụ

Trong thử nghiệm cho kết quả dương, protein A mang *S. aureus* được phủ kháng thể sẽ được ngưng kết nếu được trộn với kháng nguyên chuyên biệt. Thử nghiệm này có thuận lợi đó chính là các hạt này biểu thị sự bền vững hơn so với các hạt latex và dai dẫn

hơn để thay đổi sức bền của ion.

Thử nghiệm đông tụ được sử dụng để: (a). Phát hiện kháng nguyên cryptococcus trong dịch não tủy để chẩn đoán bệnh viêm màng não do cryptococcus. (b). Phát hiện kháng nguyên amip và nang ấu trùng sán dây trong huyết thanh giúp chẩn đoán bệnh do amip và bệnh do nang của sán dây nhỏ echinococcus và (c). Phân nhóm streptococcus và mycobacteria dùng để phân kiểu (typing) *Neisseria gonorrhoeae*.

19.4.6. Thử nghiệm cố định bổ thể

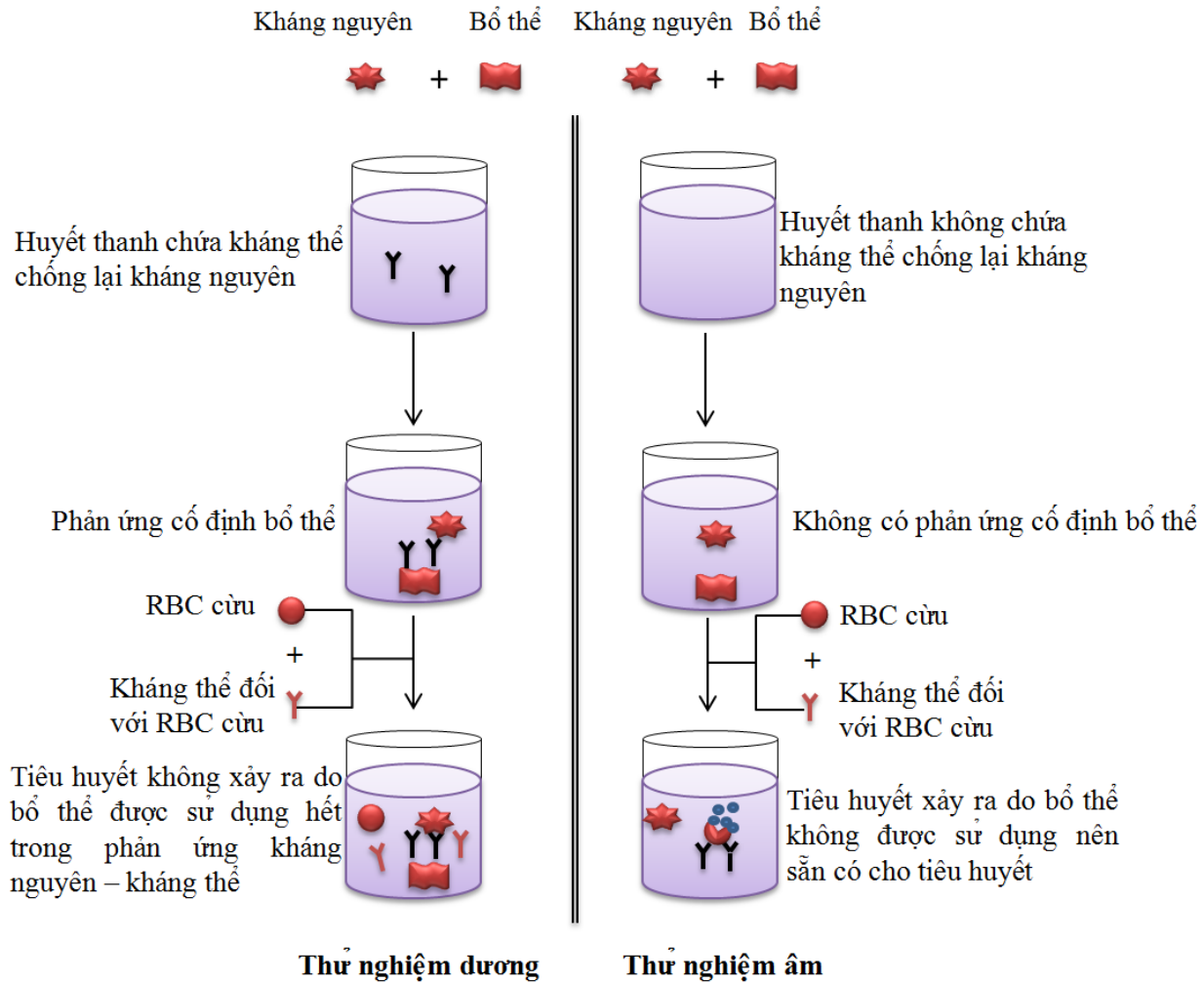
Nguyên tắc của thử nghiệm cố định bổ thể là khi kháng nguyên và kháng thể của các nhóm IgM hay IgG được trộn lại với nhau thì bổ thể sẽ được cố định trong phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Nếu điều này xảy ra trên bề mặt của tế bào máu đỏ (RBC) thì dòng bổ thể sẽ được hoạt hoá và sự tiêu huyết sẽ xảy ra. Thử nghiệm cố định bổ thể gồm hai hệ thống kháng nguyên - kháng thể bổ thể là: (a) một hệ là chỉ thị và (b) một hệ là thử nghiệm.

Hệ chỉ thị: hệ này gồm các tế bào máu đỏ (RBC) được ủ với kháng thể chuyên biệt kháng RBC ở nồng độ không gây ngưng kết và không làm tiêu huyết RBC khi không có bổ thể. Các tế bào RBC như vậy được cho là các tế bào máu đỏ nhạy cảm.

Hệ thử nghiệm: trong hệ thử nghiệm này, trước tiên huyết thanh của bệnh nhân được làm nóng 56°C để làm bất hoạt các bổ thể tự nhiên. Sau đó huyết thanh đã làm bất hoạt này được cho hấp thu tế bào RBC cừu đã được rửa sạch nhằm loại bỏ các kháng thể kháng RBC gây phản ứng chéo (còn được biết là kháng thể kiểu Forssman), vì các kháng thể này sẽ làm nhiễu phương pháp này. Sau đó huyết thanh này được trộn với kháng nguyên đã được tinh sạch và với dung dịch pha loãng huyết thanh của chuột lang dùng làm nguồn bổ thể. Hỗn hợp này được ủ ở 37°C trong 30 phút để kháng thể trong huyết thanh bệnh nhân hình thành phức hợp với kháng nguyên và cố định bổ thể (Hình 19.11).

Trong thử nghiệm cố định bổ thể, các tế bào máu đỏ nhạy cảm được cho vào tổ hợp sau cùng. Nếu tế bào máu đỏ bị ly giải cho thấy không có kháng thể chuyên biệt đối với kháng nguyên trong huyết thanh của bệnh nhân. Vì vậy bổ thể không được tiêu thụ trong hệ thống thử nghiệm này nên bổ thể dễ dàng bị các kháng thể kháng RBC sử dụng dẫn đến xuất hiện sự tiêu huyết. Phản ứng này được xem là âm tính. Thử nghiệm được

xem là dương tính khi các tế bào máu đỏ không bị ly giải. Các tế bào máu đỏ không bị ly giải cho thấy huyết thanh của bệnh nhân có kháng thể chuyên biệt chống lại kháng nguyên nên chúng cố định bổ thể. Theo đó không có bổ thể để được hoạt hoá qua hệ thống chỉ thị.



Hình 19.11. Thử nghiệm cố định bổ thể

Phản ứng cố định bổ thể sớm được sử dụng để chẩn đoán nhiều bệnh xâm nhiễm như: thử nghiệm Wassermann cho bệnh giang mai và thử nghiệm chứng minh kháng thể đối với *M. pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, nhiều virus khác nhau và nấm như *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* và *Coccidioides immitis*. Do thử nghiệm này đòi hỏi kỹ thuật cồng kềnh và phức tạp nên ngày nay không còn sử dụng.

Thử nghiệm cố định bổ thể bán trực tiếp: thử nghiệm cố định bổ thể bán trực

tiếp được tiến hành để kiểm tra huyết thanh không thể cố định bổ thể của chuột lang. Chúng bao gồm huyết thanh của gia cầm ví dụ như vịt, vịt và huyết thanh của động vật có vú ví dụ như mèo, ngựa. Thử nghiệm được tiến hành lặp lại song song và sau thử nghiệm đầu tiên, kháng huyết thanh chuẩn dùng để cố định bổ thể được thêm vào. Tiêu huyết biểu thị cho thử nghiệm dương. Trong thử nghiệm dương, nếu huyết thanh chứa kháng thể, thì kháng nguyên sẽ được sử dụng hết ở thử nghiệm đầu tiên, nên huyết thanh chuẩn được thêm vào sẽ không cố định được bổ thể nên gây ra sự tiêu huyết.

Thử nghiệm hấp phụ bổ thể: đây là một phương pháp lựa chọn khác đối với hệ thống không cố định bổ thể ở chuột lang. Hồng cầu ở cừu nhạy cảm với huyết thanh bò được sử dụng làm hệ chỉ thị. Huyết thanh bò chứa conglutinin, một β -globulin hoạt động như là kháng thể đối với bổ thể. Vì vậy conglutinin gây ra sự ngưng kết của các hồng cầu cừu nhạy cảm nếu các hồng cầu này được kết hợp với bổ thể, sự kết hợp này được gọi là sự dính lại (conglutination). Nếu bổ thể ngựa được tận dụng cho phản ứng kháng nguyên - kháng thể trong bước đầu tiên thì sự ngưng kết của các tế bào nhạy cảm sẽ không xảy ra.

19.4.7. Thử nghiệm kết dính miễn dịch

Thử nghiệm kết dính miễn dịch (Immune adherence test) dùng để kiểm tra một số vi khuẩn gây bệnh ví dụ như *Vibrio cholerae*, *Treponema pallidum*, ...phản ứng với kháng thể chuyên biệt khi có mặt của bổ thể và kết dính với hồng cầu hay tiểu cầu. Sự kết dính của tế bào vi khuẩn được gọi là kết dính miễn dịch, kết dính miễn dịch tạo thuận lợi cho sự thực bào vi khuẩn.

19.4.8. Thử nghiệm sự bất động

Thử nghiệm sự bất động (Immobilization test) là thử nghiệm phụ thuộc bổ thể, theo đó một số vi khuẩn sống như *T. pallidum* được làm cho bất động khi trộn chúng với huyết thanh của bệnh nhân có mặt của bổ thể. Các thử nghiệm này chủ yếu dùng để kiểm tra sự bất động của *T. pallidum*. Kết quả dương tính biểu hiện huyết thanh có chứa kháng thể của vi khuẩn treponema.

19.4.9. Phản ứng phân huỷ tế bào hay tiêu diệt tế bào

Khi một tế bào sống như *V. cholerae* được trộn với kháng thể chuyên biệt của nó

có sự hiện diện của bề thể thì vi khuẩn này sẽ bị tiêu diệt hay bị ly giải. Thử nghiệm này chủ yếu được sử dụng để đo lường kháng thể kháng cholera có trong huyết thanh.

19.4.10. Thử nghiệm trung hoà

Trung hoà là phản ứng kháng nguyên - kháng thể mà theo đó tác động sinh học của virus và độc tố được trung hoà nhờ các kháng thể đồng dạng (homologous antibodies) được gọi là kháng thể kháng độc tố. Thử nghiệm này có các kiểu như sau: (a) thử nghiệm trung hoà virus và (b) thử nghiệm trung hoà độc tố.

Thử nghiệm trung hoà virus: trung hoà nhờ kháng thể chuyên biệt của virus được gọi là thử nghiệm trung hoà virus. Cấy virus vào trong tế bào nuôi cấy, trứng và động vật để virus sao chép và tăng trưởng. Khi kháng thể trung hoà chuyên biệt cho virus được tiêm vào hệ thống này thì sự sao chép và tăng trưởng của virus bị ức chế. Đây được gọi là thử nghiệm trung hoà virus.

Thử nghiệm ức chế sự ngưng kết hồng cầu do virus là một ví dụ về thử nghiệm trung hoà thường được sử dụng trong chẩn đoán bệnh do virus xâm nhiễm gây ra như cúm, quai bị và bệnh sởi. Nếu huyết thanh của bệnh nhân có kháng thể chống lại một số virus nó sẽ có đặc tính ngưng kết tế bào máu đỏ, những kháng thể này phản ứng với các virus này và ức chế sự ngưng kết của các tế bào máu đỏ.

Thử nghiệm trung hoà độc tố: thử nghiệm trung hoà độc tố được dựa trên nguyên tắc hoạt tính sinh học của độc tố được trung hoà do phản ứng với kháng thể trung hoà có tính chuyên biệt gọi là kháng độc tố.

Nhiều ví dụ về thử nghiệm trung hoà như: (a). Trong cơ thể sống (*In vivo*) - (i) thử nghiệm Schick dùng để chứng minh sự miễn dịch chống lại bệnh bạch hầu và (ii) thử nghiệm trung hoà độc tố *Clostridium welchii* trong chuột lang và chuột. (b). Trong điều kiện thí nghiệm (*In vitro*) - (i) thử nghiệm kháng streptolysin O và (ii) phản ứng Nagler được sử dụng để phát hiện nhanh *C. welchii*.

19.4.11. Opsonin hoá

Opsonin hoá là quá trình mà theo đó một kháng nguyên cụ thể sẽ trở nên nhạy cảm hơn với sự thực bào khi nó được kết hợp với chất opsonin. Opsonin là một chất không bền nhiệt, hiện diện trong huyết thanh bình thường. Ngược lại với opsonin là

bacteriotropin là chất bền nhiệt, hiện diện trong huyết thanh nhưng lại có hoạt tính tương tự.

Thuật ngữ về chỉ số opsonin được xác định như tỷ lệ hoạt tính thực bào của máu bệnh nhân cho một vi khuẩn cụ thể với hoạt tính thực bào của máu từ cá thể bình thường. Chỉ số opsonin được sử dụng để nghiên cứu sự tiến triển của sức đề kháng trong giai đoạn xảy ra bệnh. Nó được đo bằng cách ủ máu tươi đã được citrate hoá với dịch huyền phù vi khuẩn ở 37°C trong 15 phút và ước lượng số trung bình của vi khuẩn bị thực bào bằng cách nhuộm máu.

19.4.12. Miễn dịch huỳnh quang

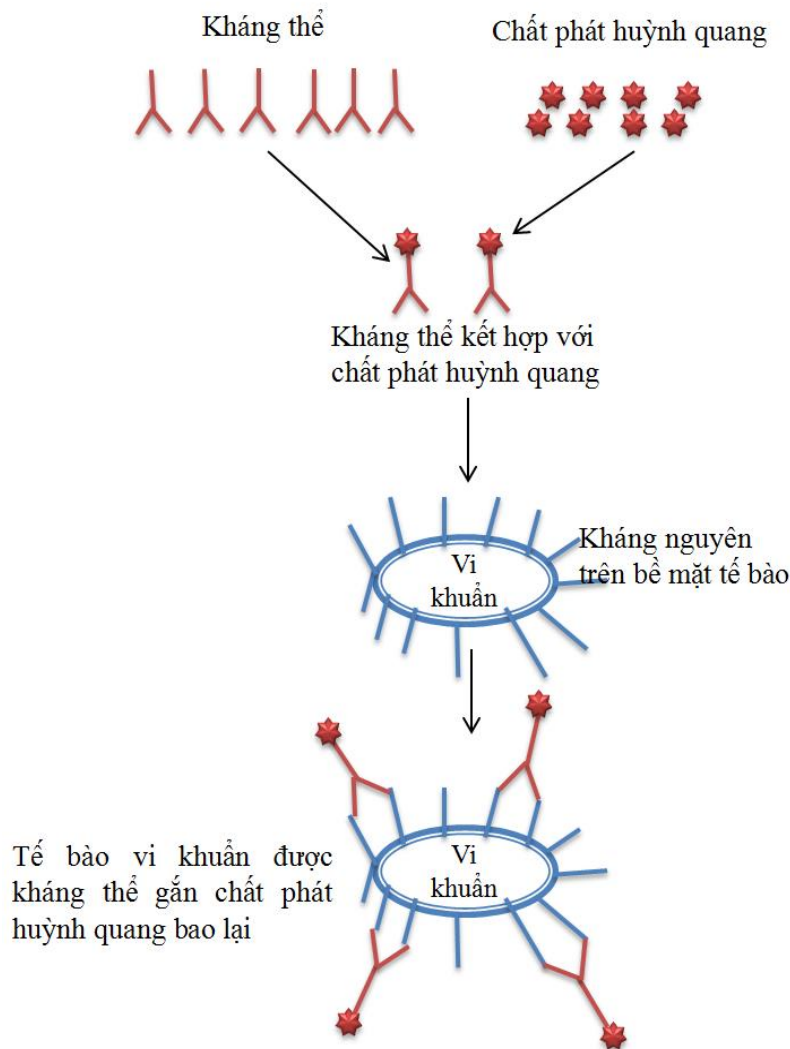
Đặc điểm của một số chất màu hấp thu ánh sáng tại một bước sóng cụ thể và phát ra ánh sáng ở bước sóng khác với bước sóng ban đầu mà nó hấp thu, quá trình này được gọi là phát huỳnh quang. Ví dụ chất màu hấp thu ánh sáng tử ngoại phát ra ánh sáng khả kiến.

Chất màu phát huỳnh quang như fluorescein isothiocyanate và lissamine rhodamine có thể gắn vào các phân tử kháng thể. Chúng phát ra huỳnh quang màu xanh da trời - xanh lá cây và màu đỏ - cam dưới tia UV, được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Đây là nguyên tắc cơ bản của thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang. Thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu và chẩn đoán. Những thử nghiệm này được phân thành hai nhóm: (a). Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp. (b). Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp.

Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp: thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp được sử dụng để phát hiện kháng thể chưa biết trong tế bào hay mô bằng cách tiến hành với một kháng thể đã biết có đánh dấu. Kháng thể đánh dấu này tương tác trực tiếp với kháng nguyên chưa biết. Nếu kháng nguyên hiện diện nó sẽ phản ứng với kháng thể đánh dấu và kháng nguyên có phủ kháng thể được quan sát dưới ánh sáng UV phát ra từ kính hiển vi huỳnh quang (Hình 19.12). Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp được sử dụng rộng rãi để phát hiện vi khuẩn, ký sinh trùng, virus, nấm hay các kháng nguyên khác trong dịch não tủy, máu, phân, nước tiểu và các mẫu bệnh phẩm khác. Một vài ví dụ như sau:

(a). Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp dùng để chẩn đoán bệnh đại trước khi chết: thử nghiệm này được sử dụng để phát hiện kháng nguyên của virus đại trong da thu thập từ gáy ở người và trong tuyến nước miếng của chó.

(b). Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp cũng được sử dụng để phát hiện vi khuẩn *N. gonorrhoeae*, *C. diphtheriae*, *T. pallidum*, một cách trực tiếp trong các mẫu lâm sàng phù hợp. Kỹ thuật này cần phải chuẩn bị kháng thể gắn riêng biệt cho mỗi đối tượng gây bệnh nên đây chính là điểm không thuận lợi chính của kỹ thuật này.



Hình 19.12. Sơ đồ minh họa thử nghiệm kháng thể phát huỳnh quang trực tiếp dùng để phát hiện kháng nguyên virus đại, phát hiện vi khuẩn gây bệnh như *N. gonorrhoeae*, *C. diphtheriae*, *T. pallidum*,

Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp: thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang gián tiếp được sử dụng để phát hiện kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh và dịch cơ thể khác dùng để chẩn đoán huyết thanh của nhiều bệnh xâm nhiễm. Miễn dịch huỳnh quang gián tiếp là một quá trình

gồm hai giai đoạn. Ở giai đoạn đầu, kháng nguyên đã biết được cố định trên lam. Sau đó cho huyết thanh của bệnh nhân cần kiểm tra được cho vào lam kính đã cố định kháng nguyên, tiếp theo là tiến hành rửa cẩn thận. Nếu huyết thanh của bệnh nhân có kháng thể chống lại kháng nguyên thì nó sẽ kết hợp với kháng nguyên trên lam. Ở giai đoạn hai sự

kết hợp của kháng thể với kháng nguyên có thể được phát hiện bằng cách thêm kháng thể có gắn chất phát huỳnh quang đối với IgG người sau đó kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang.

Bước đầu tiên trong thử nghiệm phát huỳnh quang gián tiếp là ủ kháng nguyên đã được cố định với kháng thể chưa đánh dấu có liên quan đến kháng nguyên. Kế đến là rửa cẩn thận và thêm kháng thể phát huỳnh quang đã được rửa sau cố định. Kháng thể thứ hai này có liên quan với kháng thể thứ nhất và phức hợp kháng nguyên - kháng thể có thể thấy được bằng kính hiển vi huỳnh quang.

Phương pháp gián tiếp này có điểm thuận lợi là sử dụng antiglobulin (kháng thể đối với IgG) đánh dấu đóng vai trò như là thuốc thử vạn năng để phát hiện nhiều phản ứng kháng nguyên - kháng thể chuyên biệt khác nhau. Thử nghiệm này thường nhạy hơn thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang trực tiếp.

Thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang gián tiếp được sử dụng rộng rãi để:

(a). Phát hiện kháng thể chuyên biệt dùng cho chẩn đoán huyết thanh bệnh giang mai, bệnh do xoắn khuẩn leptospira, bệnh do amip, bệnh do toxoplasma và nhiều bệnh do nhiễm trùng khác.

(b). Xác định nhóm kháng thể cụ thể bằng kháng thể phát huỳnh quang chuyên biệt cho các kiểu immunoglobulin tương tự.

(c). Xác định và đếm nhóm bạch cầu bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng.

(d). Phát hiện tự kháng thể (autoantibody) như kháng thể kháng nhân trong các bệnh tự miễn (autoimmune disease).

Giới hạn chính của miễn dịch phát huỳnh quang đó là yêu cầu về kỹ thuật như: (a) kính hiển vi huỳnh quang và thuốc thử đắt tiền, (b) nhân sự cần được đào tạo và (c) có thể có yếu tố chủ quan làm cho kết quả sai sót.

19.4.13. Phương pháp miễn dịch enzyme

Phương pháp miễn dịch enzyme (EIA) có thể được sử dụng để phát hiện hoặc kháng nguyên hoặc kháng thể trong huyết thanh và dịch cơ thể khác của bệnh nhân. Trong kỹ thuật EIA, sử dụng kháng nguyên hoặc kháng thể gắn với enzyme. Alkaline phosphatase, horseradish peroxidase và galactosidase là những enzyme được sử dụng

trong thử nghiệm EIA. EIA thường được sử dụng làm phương pháp miễn dịch dựa trên enzyme liên kết (ELISA). Kỹ thuật ELISA lần đầu tiên được Peter Perlmann và Eva Engvall ở Đại học Stockholm, Thụy Điển đưa ra khái niệm và phát triển kỹ thuật này.

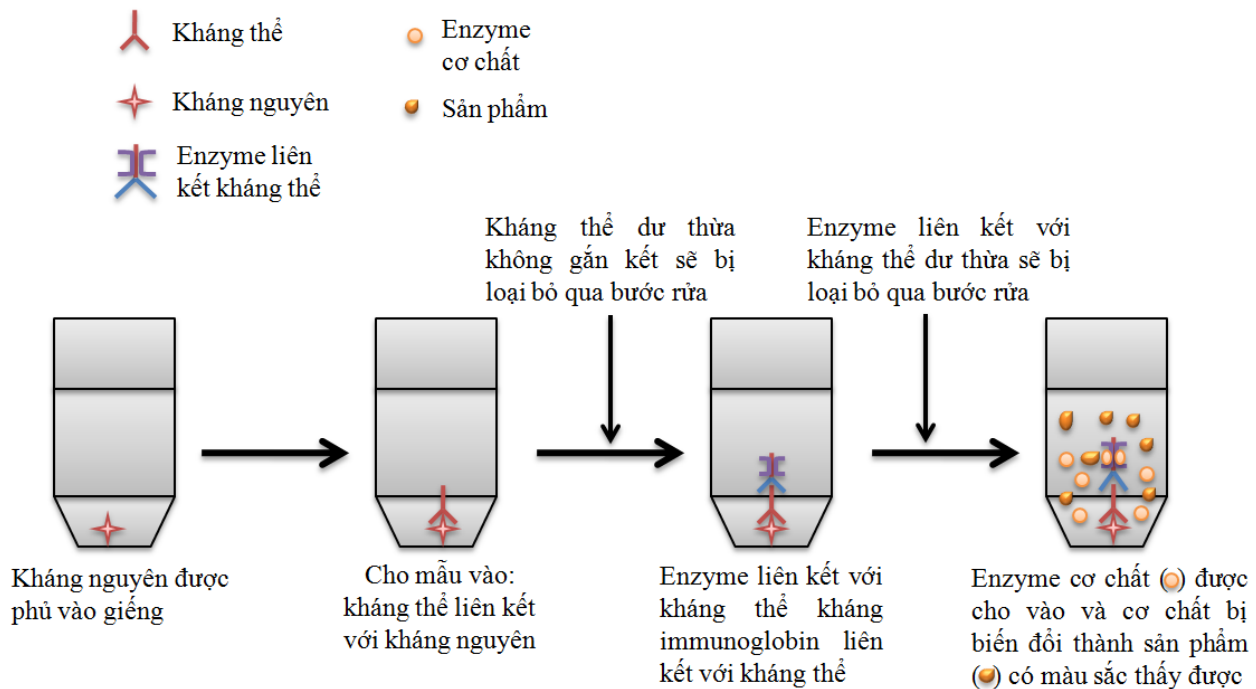
Phương pháp này liên quan đến việc sử dụng một chất hấp thụ miễn dịch (immunosorbent) chuyên biệt cho hoặc kháng nguyên hoặc kháng thể. Tiếp theo là phản ứng kháng nguyên - kháng thể, thêm cơ chất tạo màu chuyên biệt cho enzyme ví dụ như o- phenyldiamine dihydrochloride cho enzyme peroxidase, p-nitrophenyl phosphate cho enzyme alkaline phosphatase, Phản ứng được phát hiện bằng máy đọc mật độ quang học. Đường chuẩn được thiết lập dựa trên các nồng độ đã biết của kháng nguyên hoặc kháng thể để từ đó tính ra kết quả kháng nguyên hoặc kháng thể có trong mẫu thử. Có nhiều kiểu khác nhau của ELISA được sử dụng để phát hiện và định lượng kháng nguyên hoặc kháng thể có trong mẫu vật. Các kiểu ELISA này gồm: (a) ELISA trực tiếp (b) ELISA gián tiếp, (c) ELISA kẹp, (d) ELISA cạnh tranh và (e) phương pháp ELISPOT.

ELISA trực tiếp: kháng nguyên được phủ vào các giếng trong khay vi định lượng, được phát hiện bằng kháng thể liên kết trực tiếp với enzyme. Điều này cũng có thể làm ngược lại đó là kháng thể được phủ trên các giếng của khay vi định lượng và kháng nguyên đã đánh dấu được sử dụng để phát hiện nhưng cách này ít phổ biến hơn. ELISA trực tiếp có hai điểm thuận lợi chính đó là: nhanh hơn do ít bước thao tác hơn. Kỹ thuật này cũng ít lỗi hơn do ít bước thao tác hơn và ít thuốc thử hơn.

ELISA gián tiếp: ELISA gián tiếp được sử dụng để ước lượng định lượng kháng thể có trong huyết thanh, dịch cơ thể và mẫu vật. Trong phương pháp này, mẫu vật sau ly trích được thêm vào các giếng trong khay vi định lượng đã được phủ kháng nguyên chuyên biệt cho kháng thể để phát hiện. Sau khi ủ, đem các giếng này rửa. Nếu kháng thể hiện diện trong mẫu, phức hợp kháng nguyên - kháng thể sẽ được hình thành và sẽ không bị rửa trôi. Nếu kháng thể chuyên biệt không có hiện diện trong mẫu thử, sẽ không có sự hình thành phức hợp giữa kháng nguyên và kháng thể. Tiếp đến kháng thể sử dụng kháng thể kháng isotype liên kết với enzyme được thêm vào và ủ. Sau đó rửa và thêm cơ chất cho enzyme vào. Nếu có phức hợp được hình thành ở bước đầu, thì kháng thể kháng isotype thứ hai này sẽ gắn kết với kháng thể ban đầu dẫn đến xuất hiện phản ứng tạo màu

giữa enzyme và cơ chất. Sau khi thêm dung dịch kết thúc phản ứng vào giếng để giữ màu. Bằng cách đo giá trị mật độ quang của các giếng, có thể xác định số lượng phức hợp kháng nguyên - kháng thể được hình thành ở bước thứ nhất (Hình 19.13).

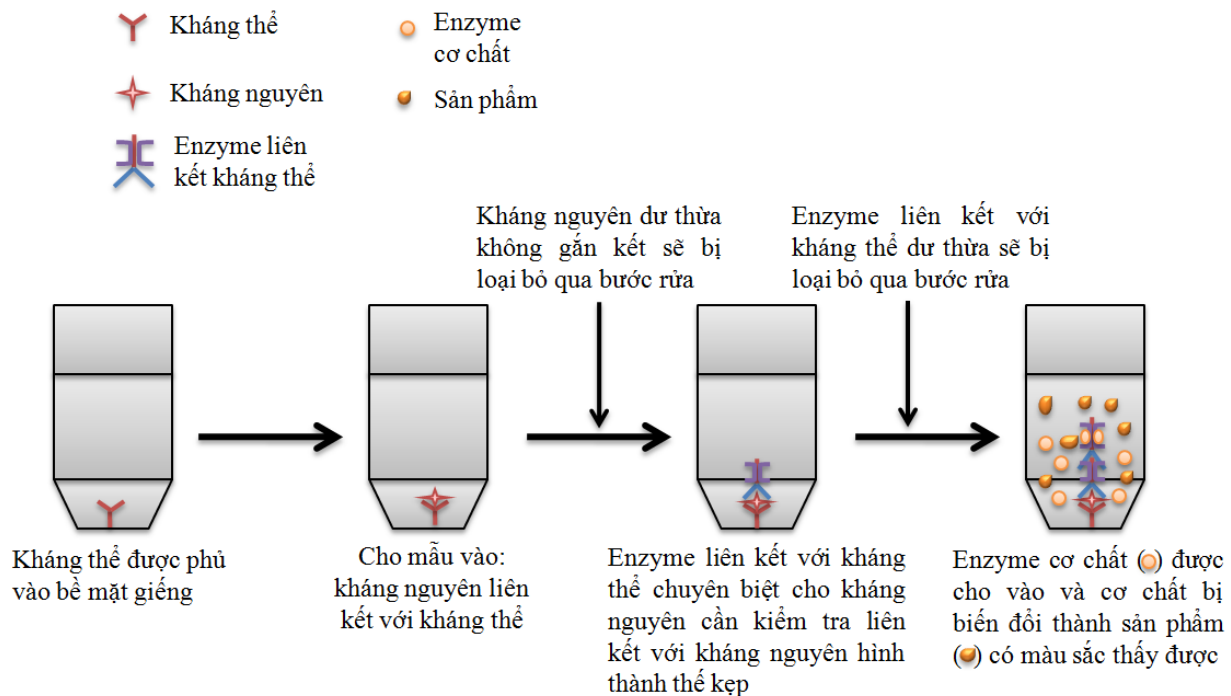
Thử nghiệm này được mở rộng sử dụng để xác định kháng thể của huyết thanh dùng để chẩn đoán HIV, viêm não Nhật Bản, sốt xuất huyết dengue và nhiều bệnh do virus khác.



Hình 19.13. Sơ đồ minh họa thử nghiệm ELISA gián tiếp.

ELISA kẹp: ELISA kẹp hay sandwich ELISA được sử dụng để phát hiện kháng nguyên. Trong thử nghiệm này, kháng thể đã biết trước được phủ và bất động trên giếng của khay vi định lượng. Kháng nguyên nghi ngờ có trong mẫu thử nghiệm sau khi ly trích được cho vào giếng để phản ứng với các kháng thể trong giếng. Sau bước rửa, cho vào giếng kháng thể chuyên biệt cho epitope khác của kháng nguyên liên kết với enzyme và khay vi định lượng, sau đó đem khay đi ủ. Sau khi rửa để loại bỏ kháng thể thứ hai, cho cơ chất chuyên biệt vào để kết thúc phản ứng và cố định màu của phản ứng trong giếng. Sau đó đem đo ở bước sóng phù hợp. Giá trị mật độ quang học thu được sẽ so sánh với đường cong chuẩn để đưa ra lượng chính xác của kháng nguyên hiện diện trong mẫu thử.

Ở trường hợp dương tính, enzyme tác động lên cơ chất để tạo ra màu và cường độ của nó có thể đo được bằng máy quang phổ kế hay máy đọc ELISA. Sự thay đổi về màu sắc cũng có thể thấy được bằng mắt thường (Hình 19.14). ELISA kẹp được sử dụng để phát hiện rotavirus và enterotoxin của *Escherichia coli* có trong mẫu phân.



Hình 19.14. Sơ đồ minh họa thử nghiệm ELISA kẹp.

ELISA cạnh tranh: ELISA cạnh tranh là một kỹ thuật khác được sử dụng để ước lượng kháng thể hiện diện trong mẫu vật như huyết thanh. Nguyên tắc của thử nghiệm này là gồm có hai kháng thể chuyên biệt được sử dụng. Trong đó một kháng thể liên kết với enzyme và kháng thể kia hiện diện trong huyết thanh cần kiểm tra nếu huyết thanh dương tính với kháng thể. Sự cạnh tranh xảy ra giữa hai kháng thể này với cùng một kháng nguyên. Màu xuất hiện biểu thị cho kết quả âm tính do không có kháng thể, ngược lại không xuất hiện màu biểu thị cho kết quả dương do có kháng thể hiện diện. Trong thử nghiệm này các giếng vi định lượng được phủ kháng nguyên của đối tượng cần kiểm tra. Mẫu sau ly trích (nếu cần thiết) hay huyết thanh cần kiểm tra được thêm vào các giếng đã phủ kháng nguyên và ủ ở 37°C, sau đó đem rửa. Nếu kháng thể hiện diện trong mẫu thử cần kiểm tra thì phản ứng giữa kháng nguyên - kháng thể sẽ xảy ra. Phản ứng giữa kháng

nguyên - kháng thể được phát hiện bằng cách thêm enzyme chuyên biệt cho kháng thể. Trong thử nghiệm dương tính không có kháng nguyên được phóng thích để cho các kháng thể này gắn kết, nên kháng thể vẫn còn tự do và được rửa trôi khỏi giếng qua bước rửa. Khi cơ chất được thêm vào, không còn enzyme sẵn có để kết hợp với cơ chất này. Vì vậy kết quả dương tính sẽ không có phản ứng tạo màu. Trong thử nghiệm âm tính, không có kháng thể hiện diện trong huyết thanh, kháng nguyên trong các giếng được phủ, sẵn sàng kết hợp với kháng thể liên kết với enzyme và enzyme phản ứng với cơ chất nên tạo ra màu.

ELISA cạnh tranh thường được sử dụng để phát hiện kháng thể HIV có trong huyết thanh bệnh nhân nhiễm HIV.

19.4.14. Phương pháp ELISPOT

Phương pháp ELISPOT là biến thể của ELISA. Phương pháp này cho phép xác định định lượng số tế bào trong một quần thể đang sản sinh ra kháng thể chuyên biệt cho một kháng nguyên đã biết. Thử nghiệm này được ứng dụng rộng rãi để đo lường các cytokine.

19.4.15. Phương pháp miễn dịch phóng xạ

Khi các isotope phóng xạ (radioisotope) thay thế cho enzyme, được sử dụng như là chất đánh dấu để liên kết với kháng nguyên hay kháng thể, kỹ thuật này dùng để phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể được gọi là phương pháp miễn dịch phóng xạ (RIA). RIA được Solomon Berson và Rosalyn Yalow (Hoa Kỳ) mô tả đầu tiên vào năm 1960, dùng để đo insulin có trong huyết tương nội tại. Yalow đã thắng giải Nobel Y học vào năm 1977 cho công trình phát triển kỹ thuật RIA dùng để phát hiện hormone là peptide, nhưng không may ông đã mất vào năm 1972, Berson không thể chia sẻ giải này.

Phương pháp RIA cổ điển được dựa trên nguyên tắc của liên kết cạnh tranh. Trong phương pháp này, kháng nguyên không đánh dấu, cạnh tranh với kháng nguyên được đánh dấu phóng xạ để liên kết một cách chuyên biệt với kháng thể. Vì vậy khi hỗn hợp của kháng nguyên đã được đánh dấu phóng xạ và chưa được đánh dấu được ủ với kháng thể tương ứng, thì lượng của kháng thể đánh dấu phóng xạ không gắn kết với kháng thể tỷ lệ trực tiếp với số lượng kháng nguyên không được đánh dấu có trong hỗn hợp. Trong

thử nghiệm này, bước đầu tiên cần chuẩn bị các hỗn hợp một lượng kháng nguyên lạnh dao động biết trước và một lượng cố định kháng nguyên được đánh dấu và hỗn hợp mẫu có nồng độ kháng nguyên chưa biết với một lượng giống nhau kháng nguyên đã đánh dấu được chuẩn bị ở bước đầu tiên.

Lượng xác định của kháng thể được thêm vào hỗn hợp. Phức hợp kháng nguyên - kháng thể được trầm hiện hoặc bằng liên kết chéo với kháng thể thứ hai hoặc bằng thuốc thử thêm vào để thúc đẩy sự trầm hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Đếm hoạt tính phóng xạ trong các chất trầm hiện cho phép xác định lượng kháng nguyên đã được đánh dấu với kháng thể. Đường cong chuẩn được xây dựng bằng cách biểu thị phần trăm kháng thể liên kết với kháng nguyên đã được đánh dấu phóng xạ đối ngược với nồng độ chưa biết của kháng nguyên chuẩn chưa được đánh dấu và nồng độ của kháng nguyên trong mẫu bệnh nhân được ngoại suy từ đường cong. Độ nhạy cực kỳ cao của RIA là thuận lợi chính của kỹ thuật này:

Kỹ thuật RIA có thể được sử dụng để xác định lượng rất nhỏ (nanogram) kháng nguyên và kháng thể có trong mẫu thử. Kỹ thuật này được sử dụng để định lượng hormone, thuốc, HBsAg và các kháng nguyên virus khác.

Tuy nhiên RIA cũng có những hạn chế gồm: (a) chi phí cho thiết bị và thuốc thử, (b) tuổi thọ của các chất phóng xạ ngắn và (c) các vấn đề có liên quan đến việc loại bỏ các chất thải phóng xạ.

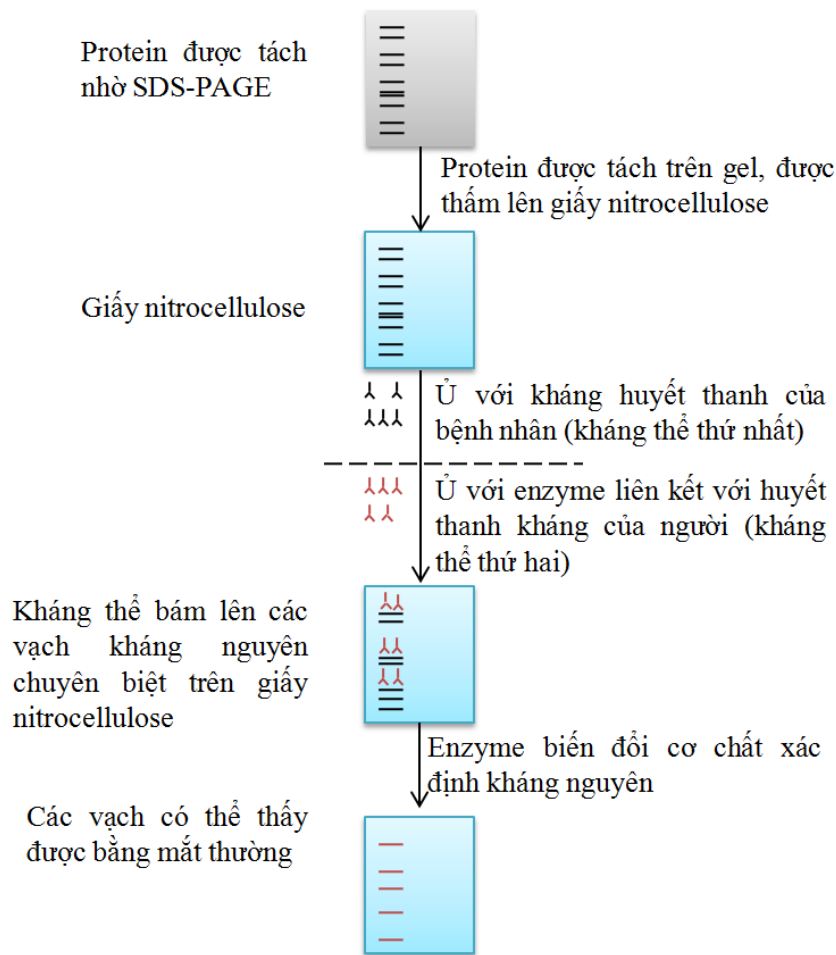
19.4.16. Western Blotting

Western blotting được gọi với tên như vậy bởi vì quy trình phân tích tương tự như Southern blotting, kỹ thuật do Edwin Southern phát triển để phát hiện DNA. Trong khi Southern blotting được triển khai để phát hiện DNA thì Western blotting được triển khai để phát hiện protein.

Western blotting thường được tiến hành trên mô đồng nhất hay mô trích. Western blot sử dụng SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis), một dạng điện di trên gel để tách trước các protein trong hỗn hợp dựa trên hình dạng và kích thước của chúng. Vì vậy các vạch (band) protein thu nhận được chuyển sang màng nitrocellulose hay màng nylon khi chúng được dò với các kháng thể chuyên biệt cho

protein cần phát hiện. Phức hợp kháng nguyên - kháng thể hình thành trên vạch chứa protein được nhận biết nhờ kháng thể và phức hợp này có thể thấy được bằng nhiều cách.

Nếu protein quan tâm được gắn kháng thể phóng xạ, thì vị trí của nó trên blot có thể được xác định bằng cách phơi nhiễm màng với tia X, quy trình này được gọi là cách tự chụp bằng phóng xạ (autoradiography). Tuy nhiên phổ biến nhất là sử dụng quy trình phát hiện dùng kháng thể liên kết với enzyme để chống lại protein. Sau liên kết của



enzyme - kháng thể liên kết, thêm cơ chất tạo màu để tạo ra màu sắc cao và sản phẩm không hoà tan tạo ra hình dạng vạch có màu tại vị trí của kháng nguyên mục tiêu. Vị trí của protein quan tâm có thể được xác định với độ nhạy cao hơn nếu hợp chất phát quang hoá học cùng với các yếu tố tăng cường phù hợp được sử dụng để tạo ra ánh sáng tại vị trí kháng nguyên (Hình 19.15).

Hình 19.16. Sơ đồ minh

hoạ thử nghiệm Western blot.

Kỹ thuật Western blot có nhiều ứng dụng như sau:

(a). Được sử dụng để xác định protein đặc hiệu trong hỗn hợp protein. Trong phương pháp này, các kháng nguyên có trọng lượng phân tử đã được xác định rõ, được tách ra bằng SDS-PAGE và được thấm (blot) trên giấy nitrocellulose. Các vạch tách ra của kháng nguyên đã biết được dò với mẫu nghi ngờ có kháng thể chuyên biệt cho một

hoặc nhiều kháng nguyên này. Phản ứng của một kháng thể với một vạch được phát hiện bằng cách sử dụng hoặc đánh dấu phóng xạ hoặc sử dụng kháng thể thứ hai liên kết với enzyme chuyên biệt cho kháng thể có trong mẫu thử.

(b). Phương pháp này cũng được sử dụng để ước lượng kích thước của protein cũng như số lượng protein hiện diện trong hỗn hợp.

(c). Thử nghiệm Western blot được sử dụng phổ biến nhất dùng để khẳng định trong chẩn đoán HIV, khi đó quy trình này được sử dụng để xác định bệnh nhân có kháng thể phản ứng với một hoặc nhiều protein virus hay không.

(d). Western blot cũng được sử dụng để chứng minh kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh ứng dụng trong chẩn đoán bệnh do ấu trùng sán heo (neurocysticercosis) và viêm màng não do lao.

19.4.17. Phương pháp phát quang hoá học

Phương pháp phát quang hoá học dùng các hợp chất phát quang hoá học phát ra năng lượng ở dạng ánh sáng trong suốt quá trình phản ứng kháng nguyên - kháng thể. Ánh sáng phát ra này được đo và nồng độ của chất phân tích được tính toán. Phương pháp này thì hoàn toàn tự động, được sử dụng phổ biến để kiểm tra mức độ nhạy cảm của thuốc dùng để điều trị bệnh do *Mycobacterium tuberculosis*.

19.5. Kiểm tra miễn dịch bằng kính hiển vi điện tử

Phản ứng kháng nguyên - kháng thể được quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi điện tử. Kỹ thuật này gồm các bước sau:

19.5.1. Sử dụng kính hiển vi điện tử miễn dịch

Sử dụng kính hiển vi miễn dịch là thử nghiệm được sử dụng để phát hiện trực tiếp rotavirus và virus hepatitis A trong mẫu phân. Ở kỹ thuật này các hạt virus được trộn với kháng huyết thanh chuyên biệt và được chứng minh như là những khối tụ (clump) của các hạt virion bằng kính hiển vi điện tử.

19.5.2. Thử nghiệm enzyme miễn dịch

Thử nghiệm enzyme miễn dịch dùng để phát hiện trực tiếp kháng nguyên có trong mẫu mô, theo đó các lát cắt mô được xử lý với kháng huyết thanh có đánh dấu peroxidase để phát hiện kháng nguyên tương ứng. Enzyme peroxidase gắn kết với kháng nguyên

thấy được dưới kính hiển vi điện tử.

19.5.3. Thử nghiệm ferritin miễn dịch

Sử dụng kính hiển vi điện tử để xác định các chất có mật độ điện tử như ferritin liên kết với kháng thể và các kháng thể được đánh dấu với kháng nguyên.