

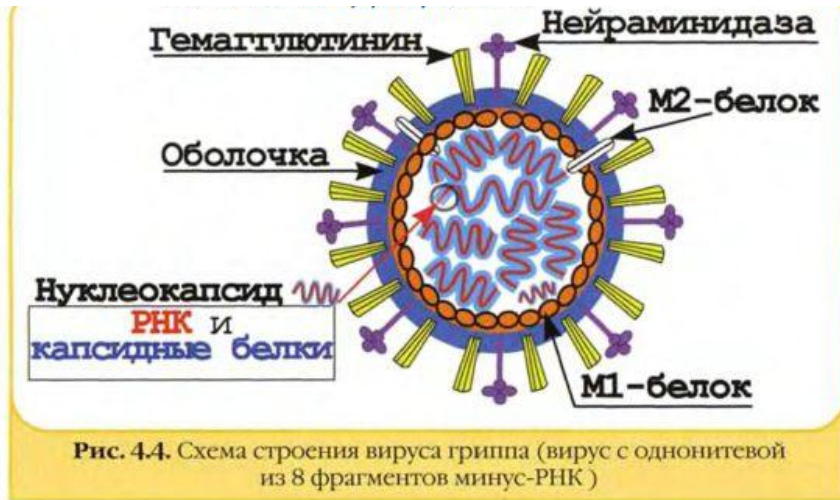
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии ОмГМУ

Телевная Любовь Григорьевна, к.м.н., старший преподаватель

**Лекция 1.**  
**Серологические методы диагностики.**  
**Молекулярно-генетические методы диагностики.**  
**Часть 2.**



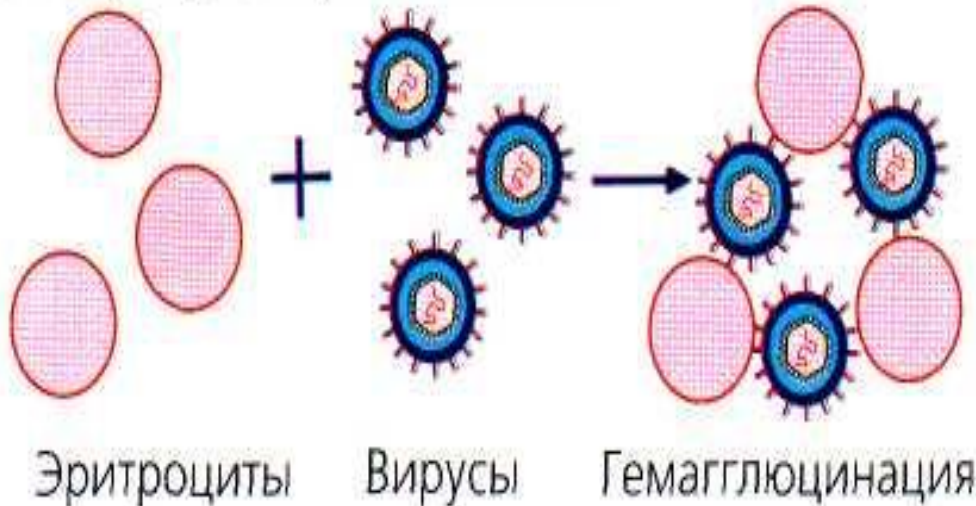
# Реакция вирусной гемагглютинации



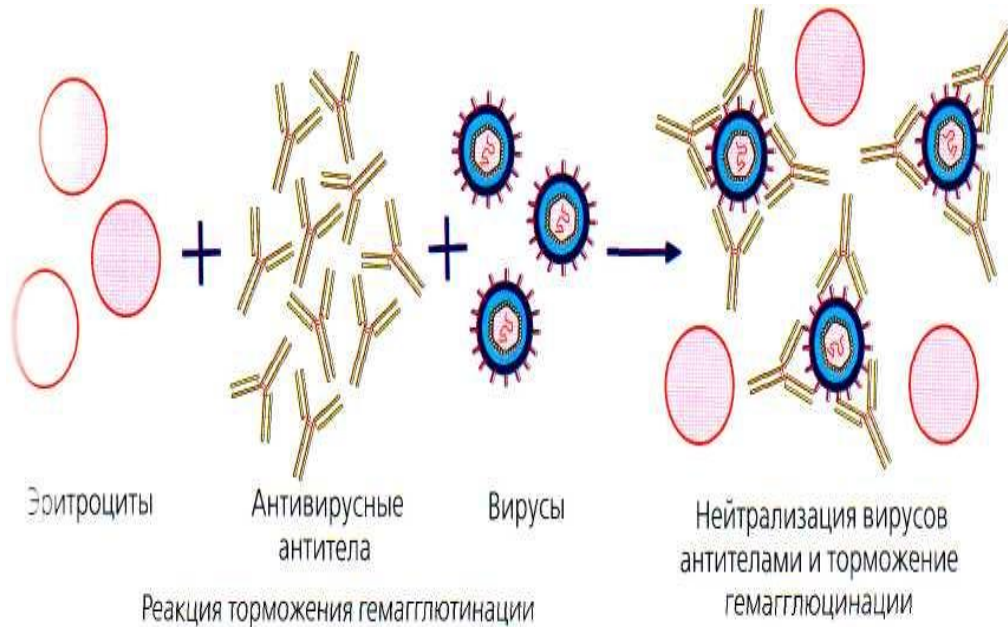
Гемагглютинины вирусов – гликопротеиновые шипики на поверхности вируса - способны склеивать эритроциты, за что и получили свое название.

Это свойство используют для постановки РТГА

Вирусная гемагглютинация



# Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)



**РТГА** основана на блокаде антигенов вирусов (гликопротеиновых «шипов» - гемагглютининов) антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты.

**РТГА используют:**

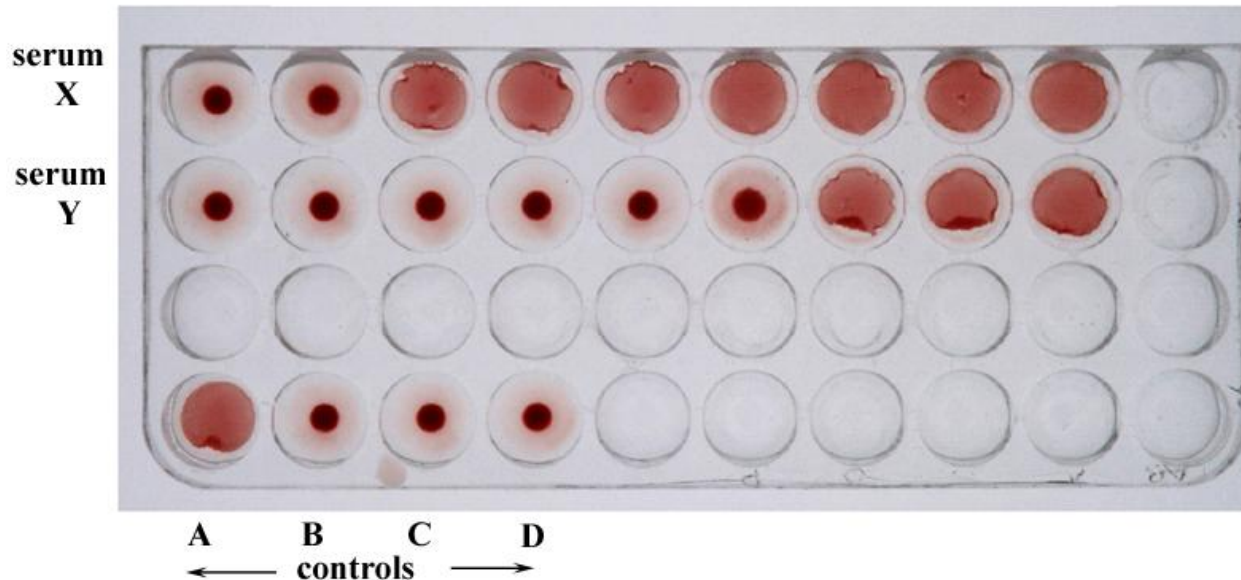
- для типирования вирусов,
- для определения АТ к вирусам в сыворотке пациента

**РТГА** применяют для диагностики инфекций, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита) могут агглютинировать эритроциты различных животных. На рисунках представлена РТГА для определения АТ в сыворотке пациента.

Разведение сыворотки 1:10 1:20 1:40 1:80 1:160

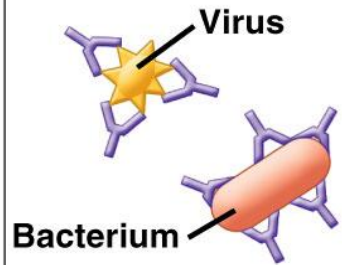


$1/10$   $1/20$   $1/40$   $1/80$   $1/160$   $1/320$   $1/640$   $1/1280$   $1/2560$

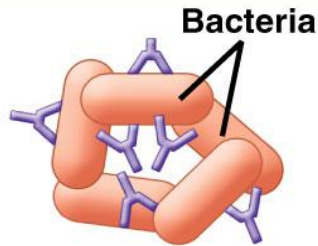


Связывание антител с антигеном

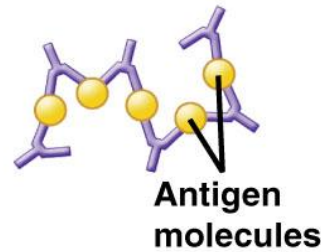
Нейтрализация вирусов и бактерий



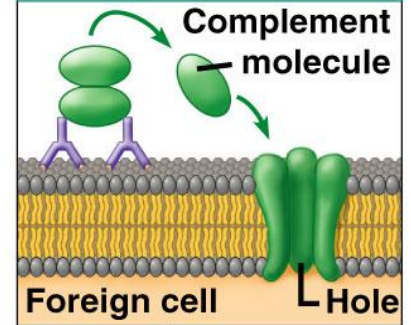
Агглютинация бактерий



Преципитация растворимых антигенов

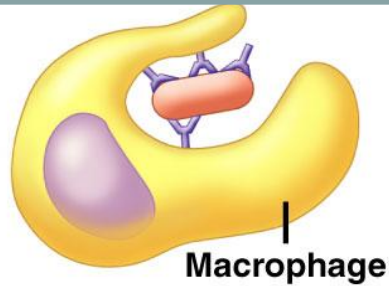


Активация системы комплемента



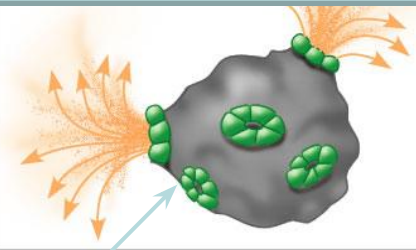
Enhances

Фагоцитоз



Leads to

Лизис клеток



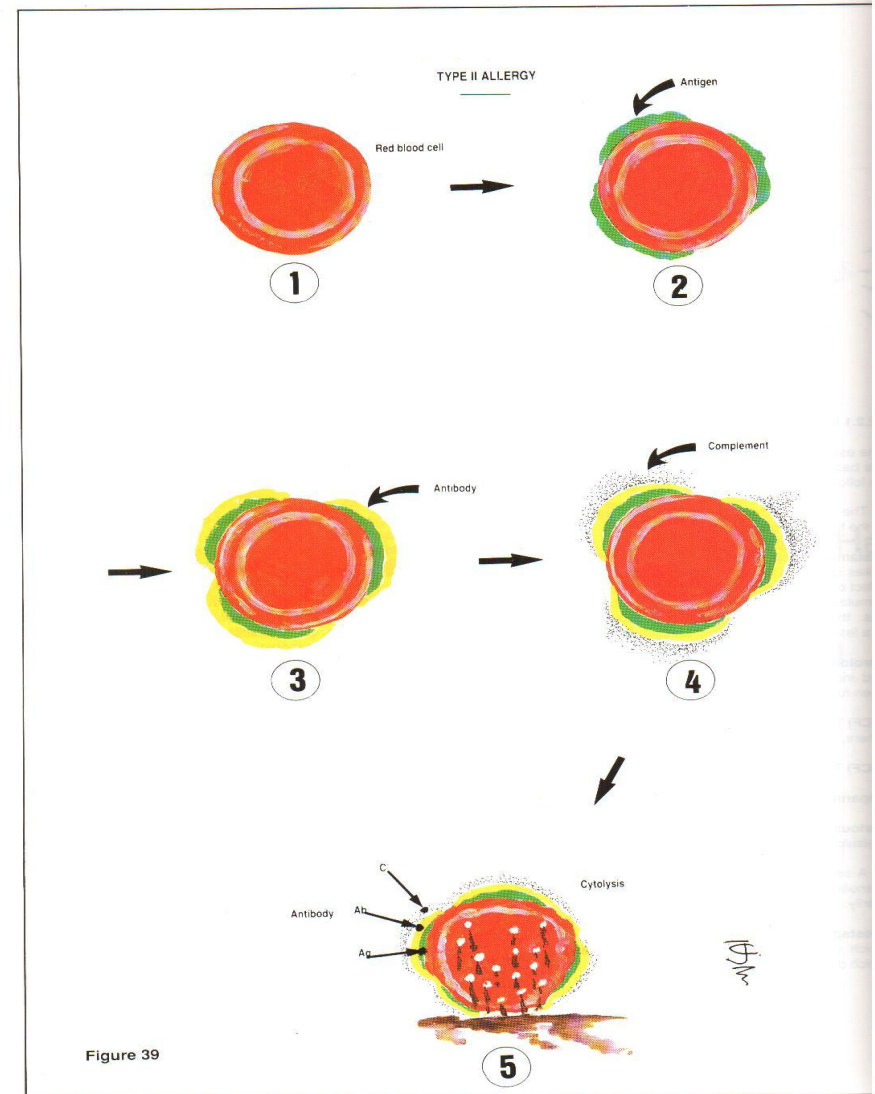
МАК

# Реакция иммунного лизиса.

Это лизис **клеток** в присутствии **антител к ним и комплемента**.

Сначала образуется комплекс антиген – антитело, он активирует комплемент.

Активированный комплемент на поверхности клетки формирует МАК, что вызывает разрушение (лизис) клетки.



# Реакция связывания комплемента- РСК

заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (C), т. е. происходит **связывание комплемента комплексом антиген-антитело**.

Если же комплекс антиген-антитело не образуется, то комплемент остается свободным.

РСК проводят в две фазы:

1-я фаза - инкубация смеси, содержащей антиген + антитело + комплемент;

2-я фаза (индикаторная) - **выявление в смеси свободного комплемента** путем добавления к ней **гемолитической системы**, состоящей из

**эритроцитов барана и гемолитической сыворотки**, которая содержит антитела к эритроцитам.

Такие антитела называются гемолизинами, но сами они не лизируют эритроциты. Лизис идет при активации системы комплемента .

**Гемсистема- индикаторная система на свободный комплемент!**





Схема РСК с сывороткой больного

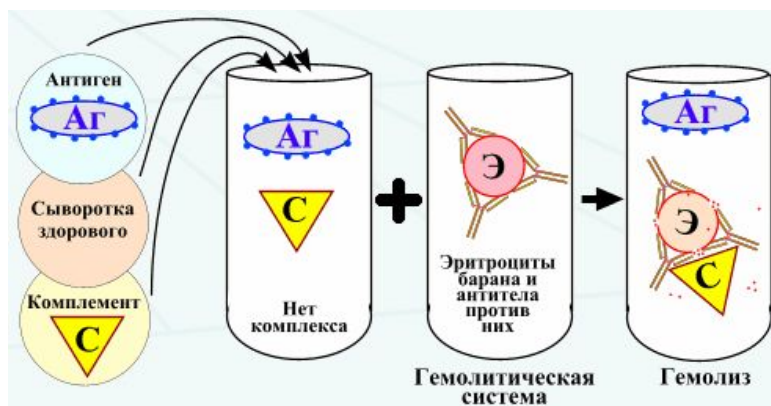


Схема РСК с сывороткой здорового

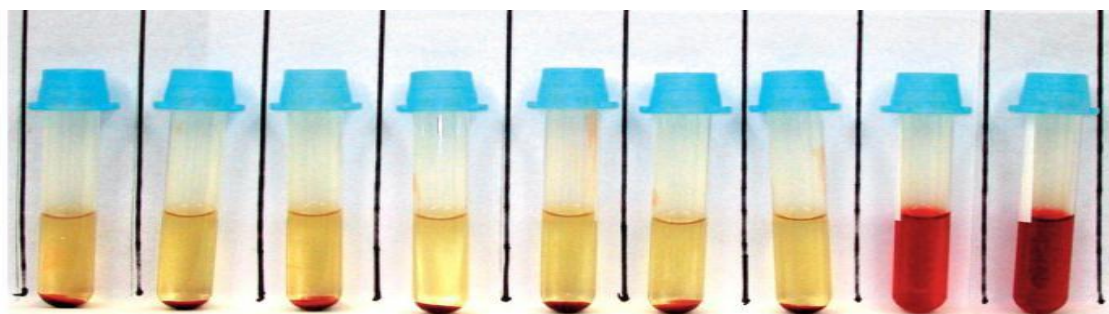


РСК применяют для диагностики многих инфекционных болезней, в частности

**сифилиса (реакция Вассермана) = РВ = RW**



Разведения сыворотки пациента



1/5 1/10 1/20 1/40 1/80 1/160 1/320 1/640 К-

Титр = 1/320





# Твердофазные методы

- Основаны на фиксации одного из компонентов (Аг или Ат) на носителе с последующим образованием на твердой фазе комплекса **Аг-Ат**, отмывкой несвязавшихся компонентов и выявлении образовавшегося комплекса по метке (фермент, флюорохром, изотоп).

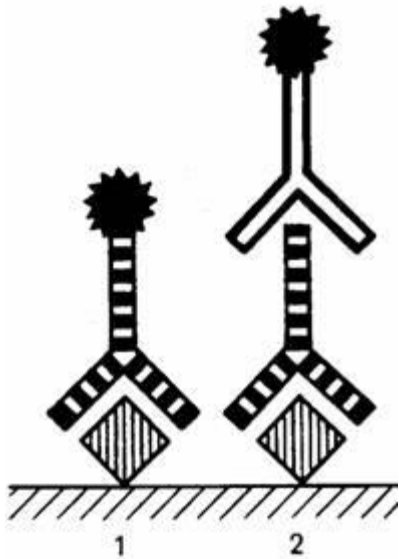
Основные твердофазные методы – иммунофлюоресцентный анализ (**МФА =РИФ**), иммуноферментный анализ (**ИФА**), иммуноблоттинг, радиоиммунный анализ (**РИА**).

**Твердая фаза** – предметное стекло (МФА, РНИФ), полистирол или полихлорвинил (ИФА), специальные подложки -бумага, нитроцеллюлозные мембраны (иммуноблот).

# Реакция иммунофлюоресценции - РИФ = Метод флюоресцирующих антител - МФА

МФА может быть прямой и непрямой

**Прямой** – антитела к искомому антигену соединяют с флюорохромом. Таким препаратом обрабатывают препарат- мазок и затем исследуют в люминесцентном микроскопе.

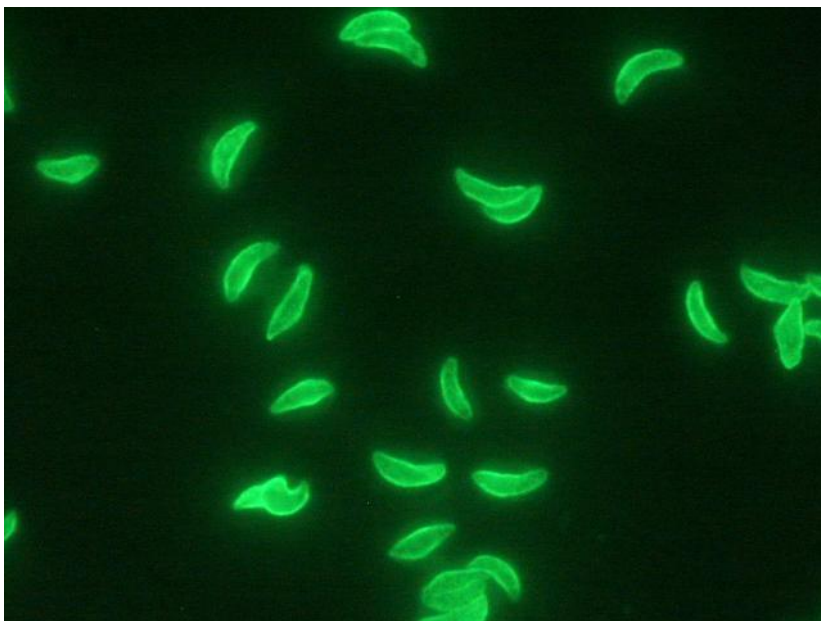


**Непрямой** – сначала добавляют антитела к искомому антигену, а затем комплекс антиген-антитело выявляют антиглобулиновой сывороткой, меченной флюорохромом.

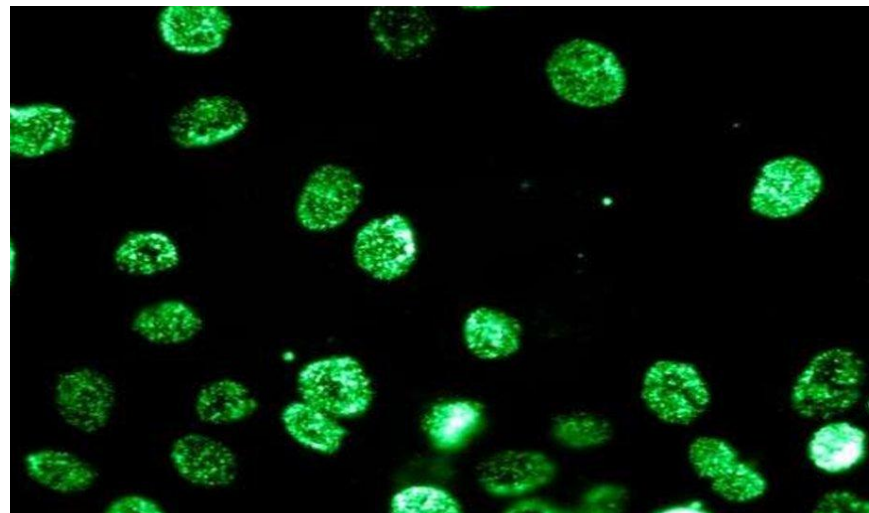
Полученные препараты изучают в люминесцентном микроскопе.



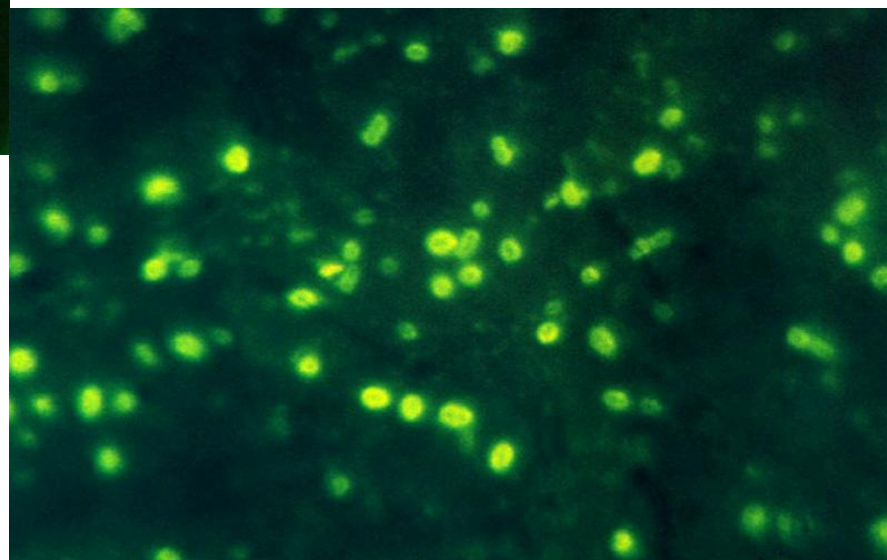
# РИФ= МФА



Токсоплазмы



Риккетсии в клетках



Гемофильная палочка

**Твердофазный иммуноферментный анализ** - вариант теста, когда один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе, например в лунках планшетов из полистирола.

Тест основан на обычном взаимодействии антигенов и антител.

После соединения **антигена с антителами** и отмывки добавляют **КОНЪЮГАТ** - антитела, конъюгированные с ферментом-меткой (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой).

После отмывки добавляют **субстрат пероксидазы (ТМБ)**.

Субстрат расщепляется ферментом, что в конечном итоге приводит изменению цвета продукта реакции: интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

# Принцип ИФА

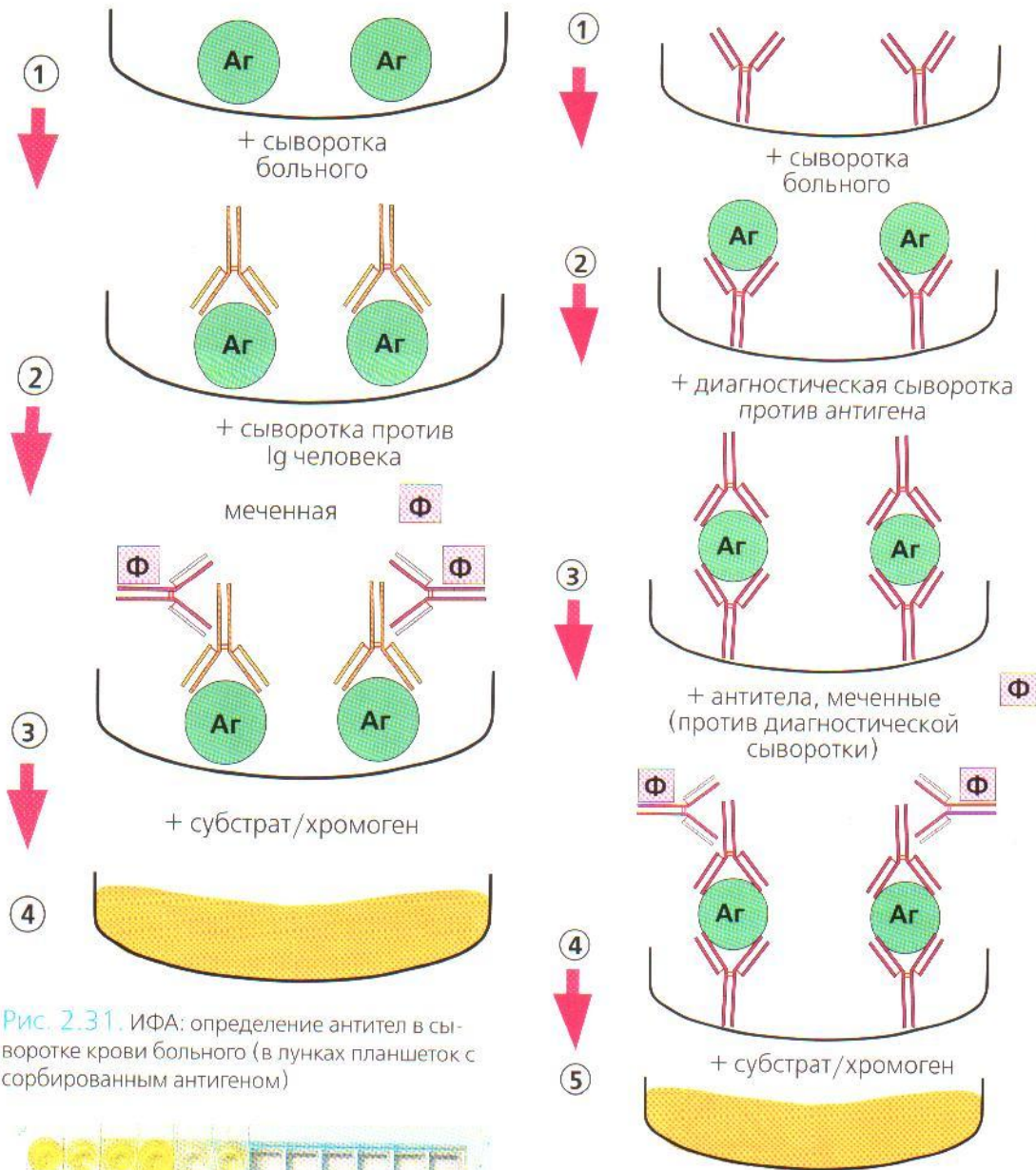


Рис. 2.31. ИФА: определение антител в сыворотке крови больного (в лунках планшеток с сорбированным антигеном)



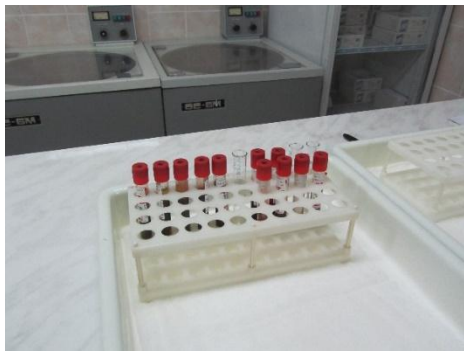
# Тест- системы для ИФА



- с помощью ИФА определяют
- антитела
- различные белки (антигены возбудителей, гормоны, онкомаркеры, интерлейкины и др.)



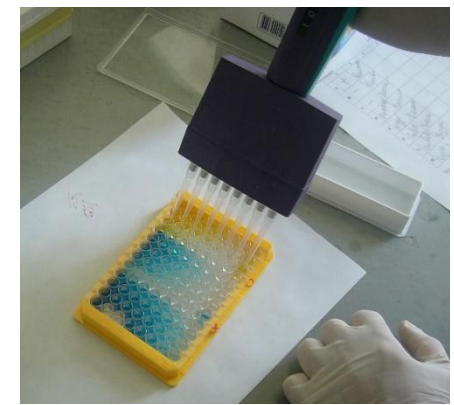
# ИФА



Исследуемый материал



Термостат



Внесение стоп- реагента



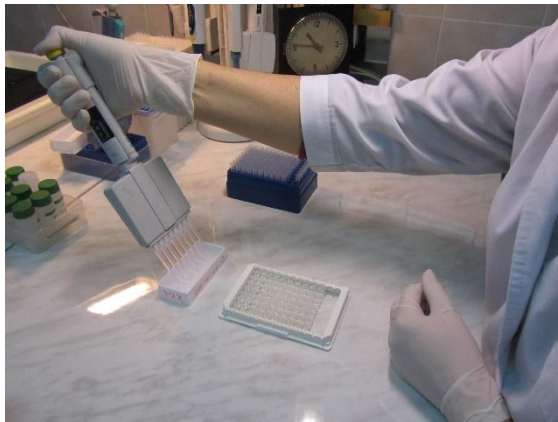
Тест-система для ИФА



Аппарат для промывания лунок



Результаты ИФА учитываются с помощью **фотометра**, который переводит интенсивность окраски в числовые значения.

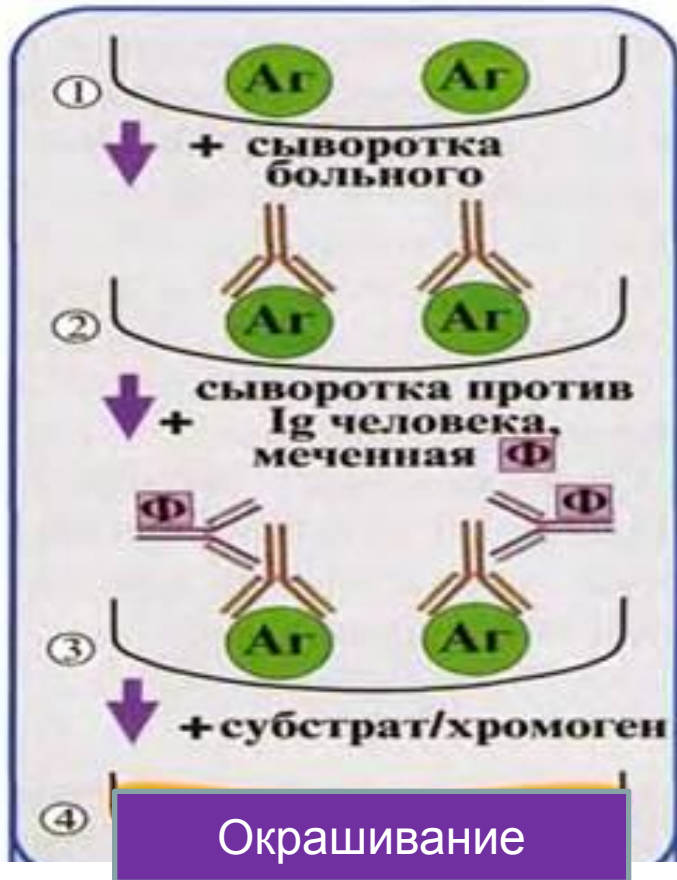


Внесение реагентов

# Иммуноблоттинг = иммуноблот (ИБ)

blotting paper - промокательная бумага

blot – пятно



ИБ- твердофазный метод определения антител к возбудителю в сыворотке пациента.

Механизм метода сходен с ИФА.

Принципиальное отличие –

**одновременное определение антител к нескольким антигенам** возбудителя (возбудителей).

Для этого смесь антигенов возбудителя разделяют в геле методом электрофореза и переносят их на полоску нитроцеллюлозы.

Процесс исследования аналогичен ИФА.

Результат реакции проявляется в виде пятна на тестовой полоске



# ИММУНОБЛОТТИНГ

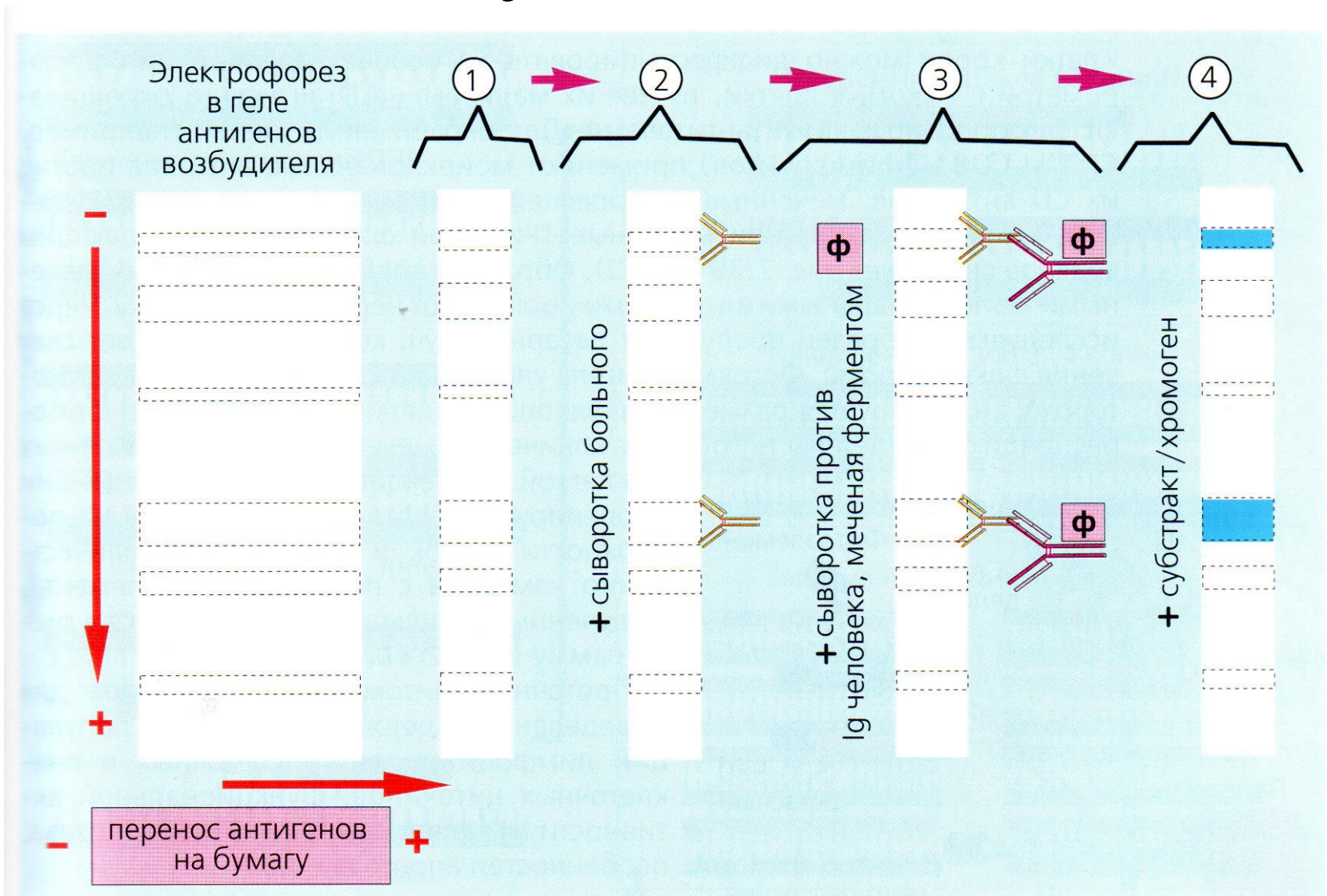
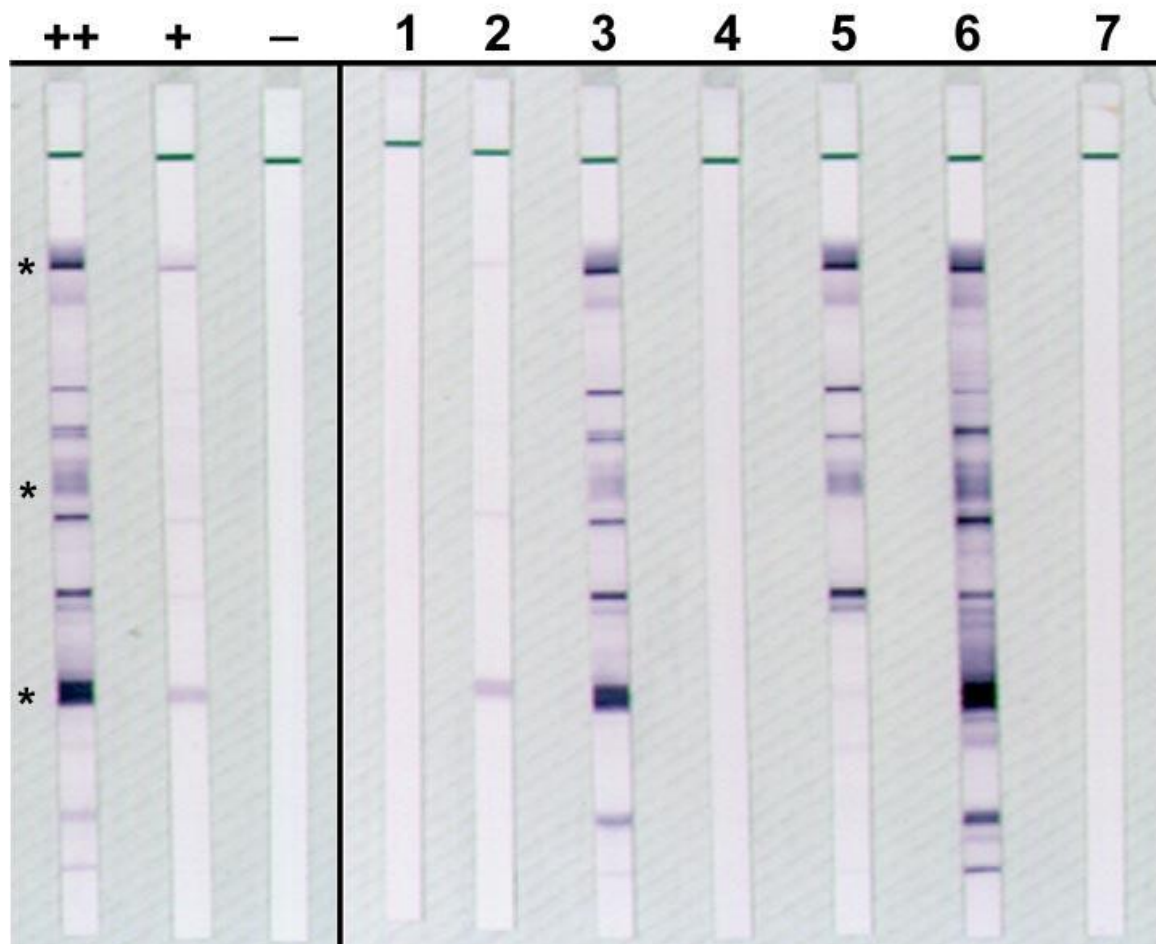


Рис. 2.37. Иммуноблоттинг

# Результат ИБ на ВИЧ

Контроли

Тесты пациентов



# Иммунохроматографический анализ- ИХА



## Комплект набора:

20 кассет

20 пробирок для разведения проб

## Материал для исследования:

□ фекалии, взятые с 3-5 по 8 дни болезни

Исследуют свежие пробы, хранившиеся не >48 ч

при 4-8°C или больший срок при -20°C.

***Не использовать консерванты и детергенты!***

# УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ



Адено -  
Рота -



Адено +  
Рота -



Адено -  
Рота +



Адено +  
Рота +



Недействительный результат - исследование необходимо провести повторно



Благодарю за  
внимание!



<http://gallery.world/wallpaper/599502.html>