

Новосибирский Государственный Аграрный Университет

Разработка нового метода
иммунофлуоресцентной детекции
бактериальных антигенов

Выполнила: студентка группы 6202,
факультет ветеринарной медицины
Миронова Т.Е.

Научные руководители: к.б.н., ст. науч. сотр.
ГНУ ИЭВСиВС
Афонюшкин В.Н.
к.б.н., доцент
кафедры акушерства, анатомии и гистологии НГАУ
Сигарева Н.А.

● Актуальность: в современном мире существует огромное разнообразие патогенных микроорганизмов, вирусов и прионов, представляющих опасность для живых организмов. Патогенные микробы способны преодолевать сопротивляемость организма и проявлять токсическое действие. Одни патогенные агенты вызывают отравление организма выделяемыми ими в процессе жизнедеятельности экзотоксинами, другие — освобождают токсины при разрушении своих тел.



● Значение диагностики инфекционных заболеваний:

- Необходимость срочной постановки диагноза, для соответствующей рациональной, своевременной и эффективной терапии.
- Проведение противоэпидемических и профилактических мероприятий.

Цель работы - разработка нового метода
повышения специфичности теста для индикации
бактериальных антигенов.



Задачи работы:

- Теоретический анализ факторов, влияющих на специфичность и разработка механизма, позволяющего повысить чувствительность и специфичность методов иммунотипирования бактерий.
- Разработка модели нового иммунохимического метода типирования бактерий.
- Проверка корректности модели и поиск оптимальных условий реакции на примере (*Salmonella infantis*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*).



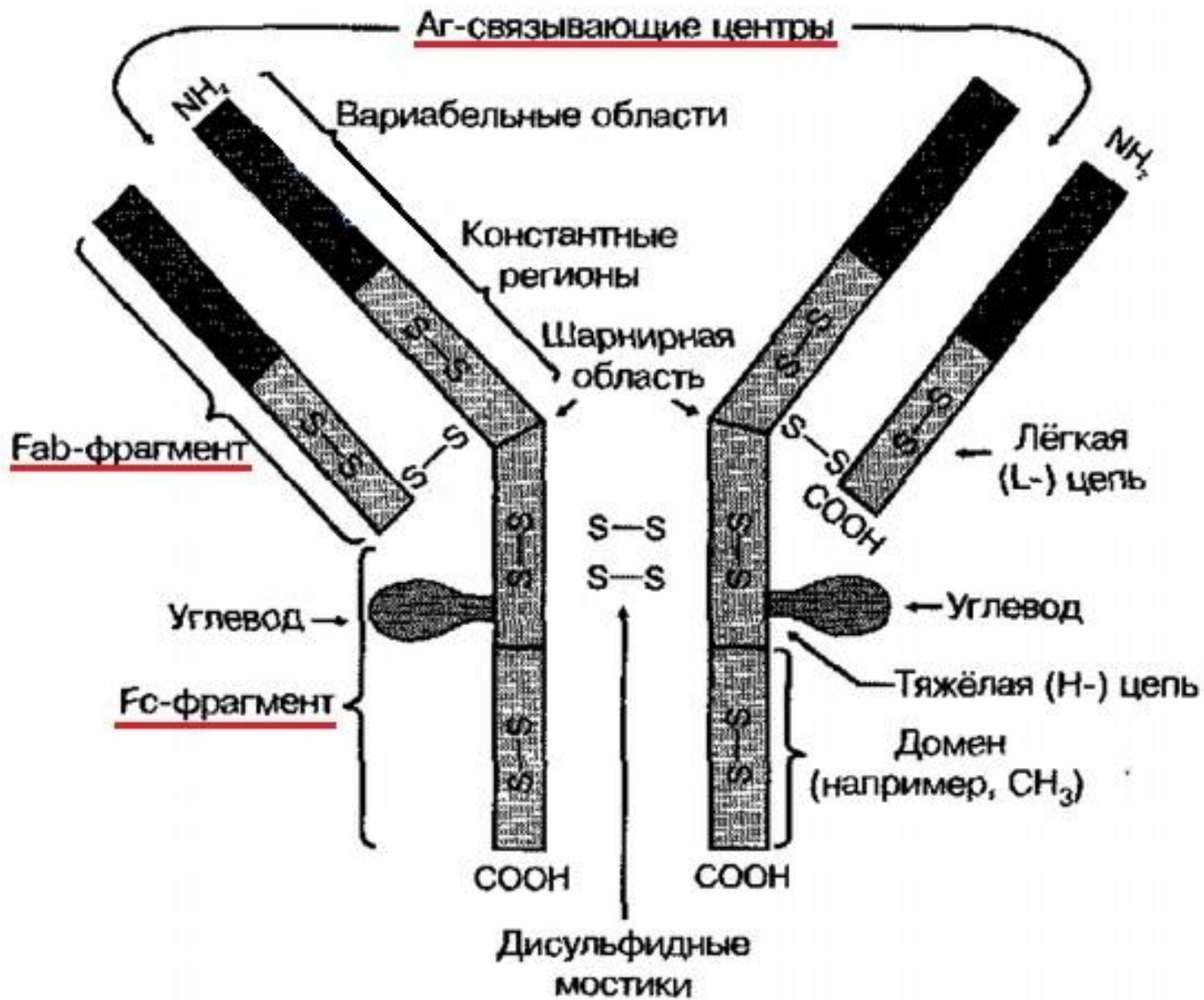
Иммунодиагностика инфекционных заболеваний



Иммунохимические методы типирования бактерий



Новый метод иммунофлюоресцентной детекции
бактериальных антигенов



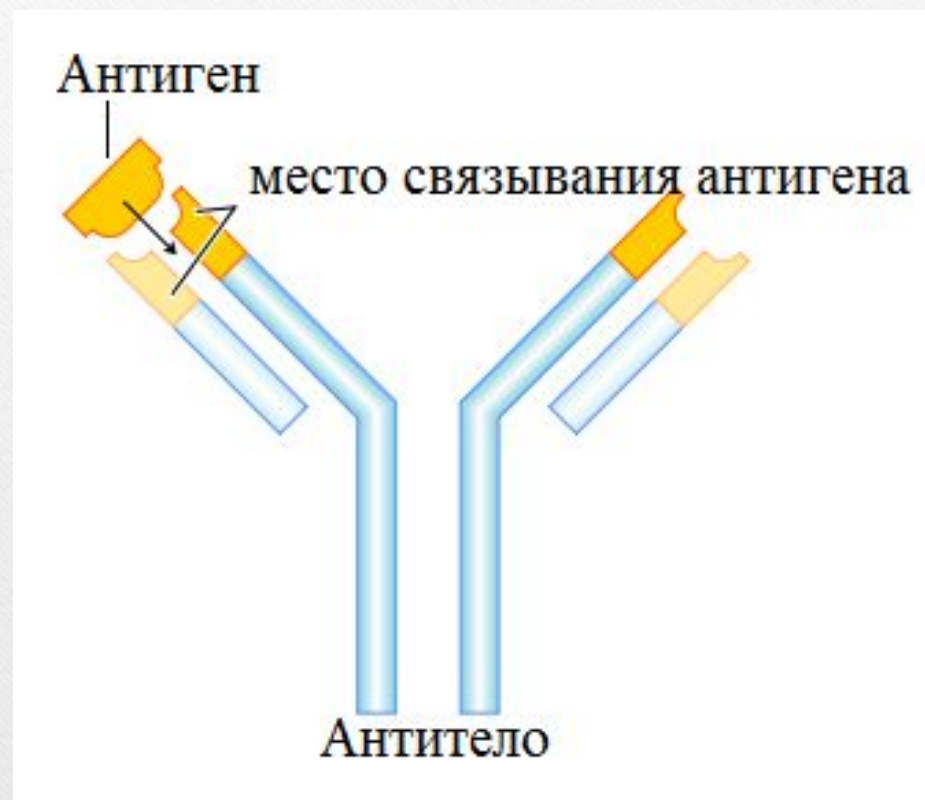
Строение антитела.

Реакция антиген-антитело

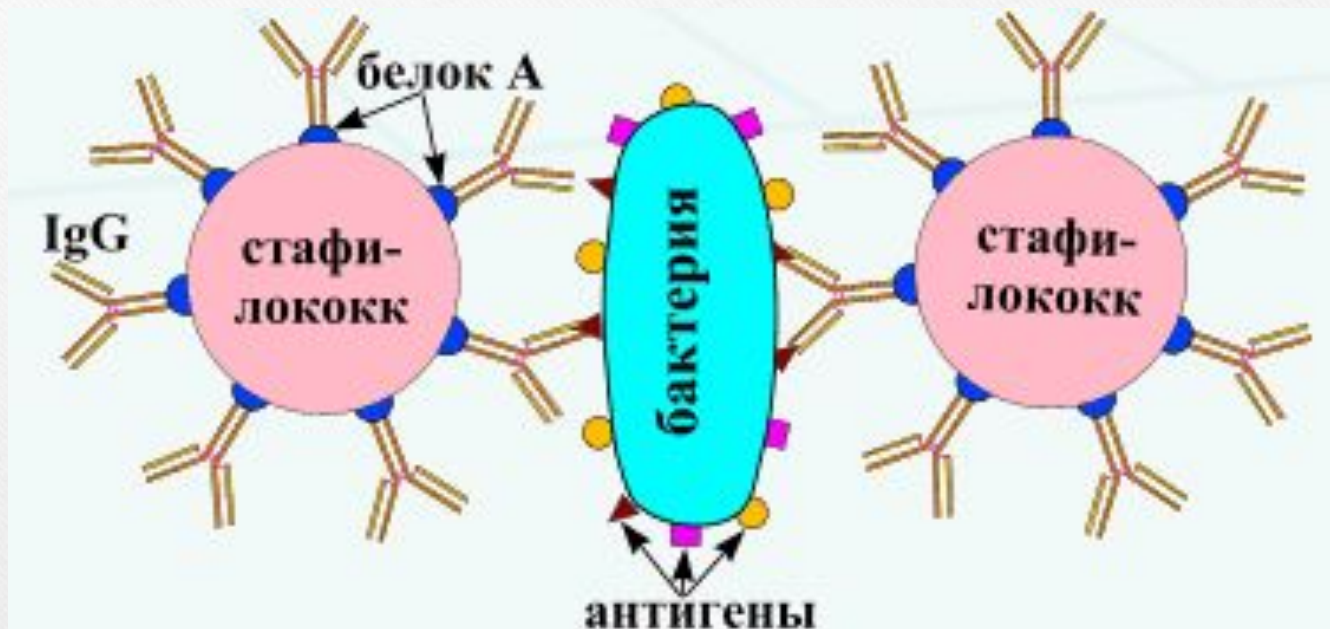
Этапы реакции:

1. Достаточно быстрое взаимодействие антигенной детерминанты с комплементарной областью иммуноглобулина. В результате этой реакции образуется иммунный комплекс антиген-антитело;

2. Медленное возникновение мультиполярных комплексов, включающих в себя огромное число молекул антигена и антител.

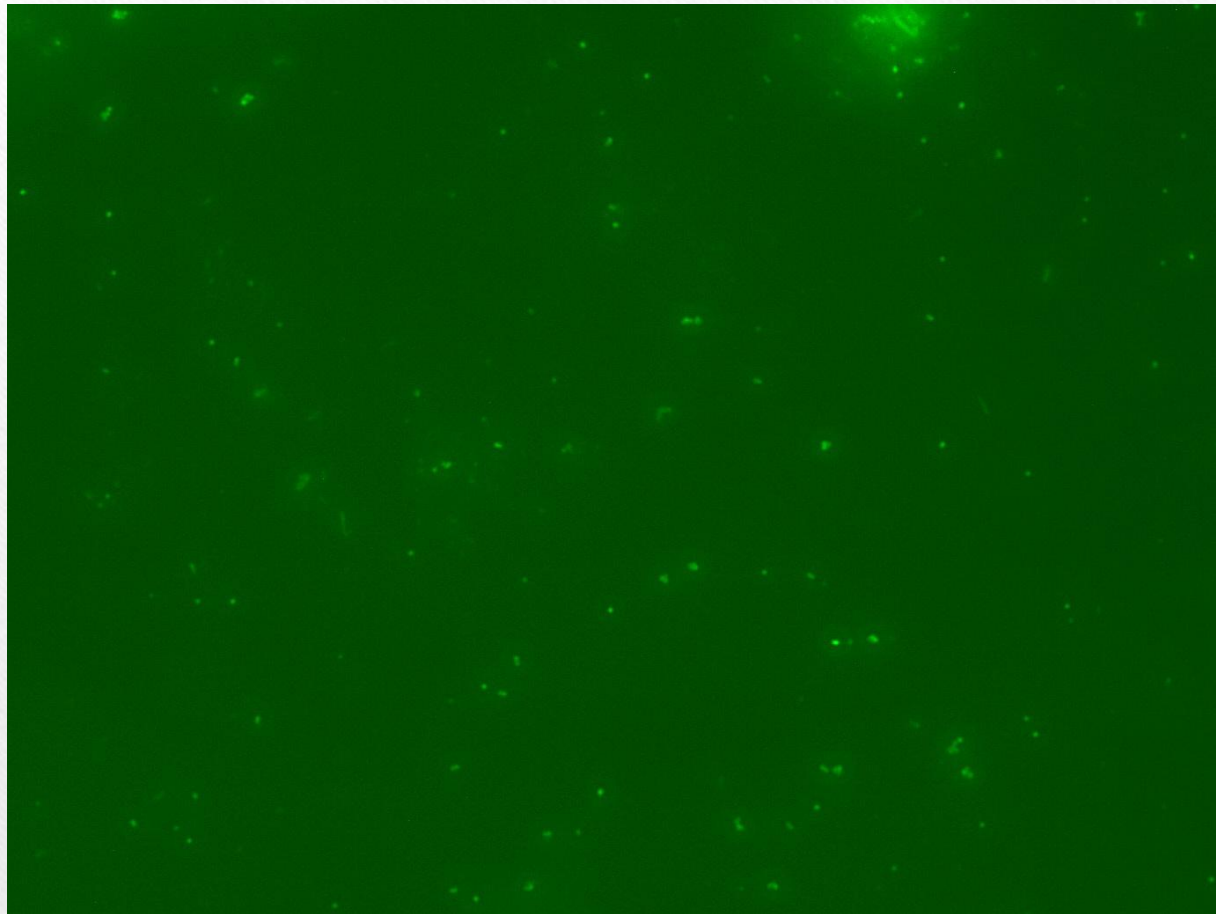


Реакцию коаггутинации применяют для определения антигенов с помощью антител, адсорбированных на белке А клеток стафилококка.



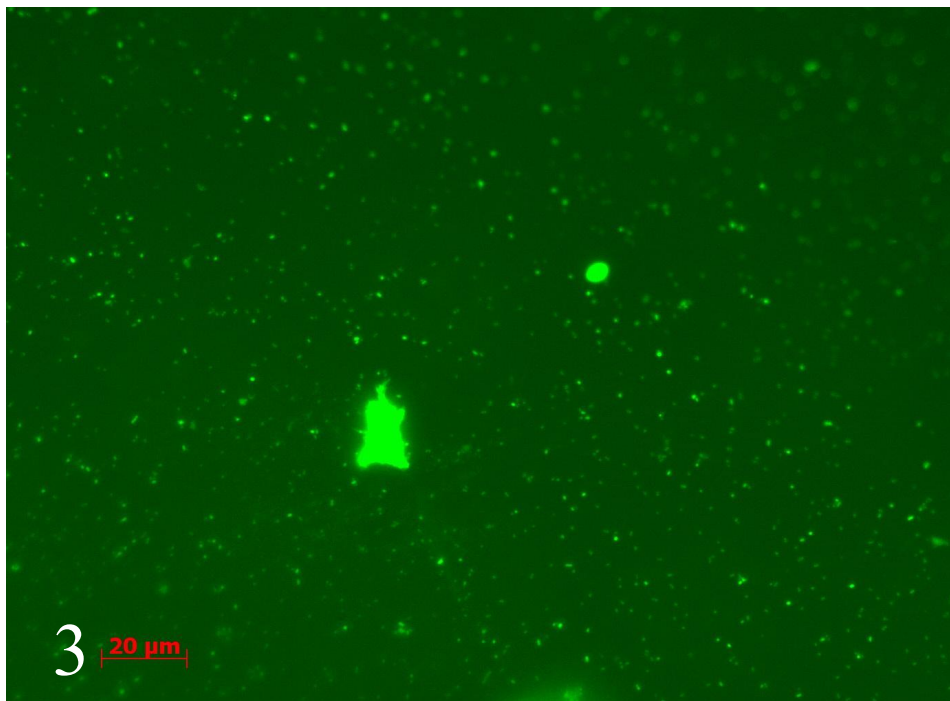
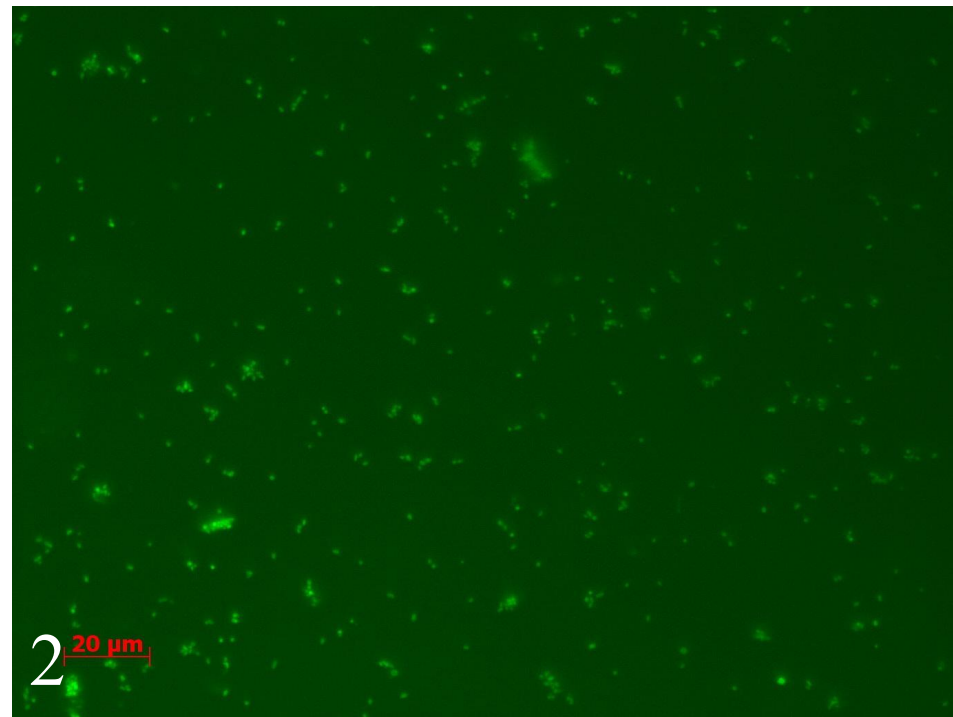
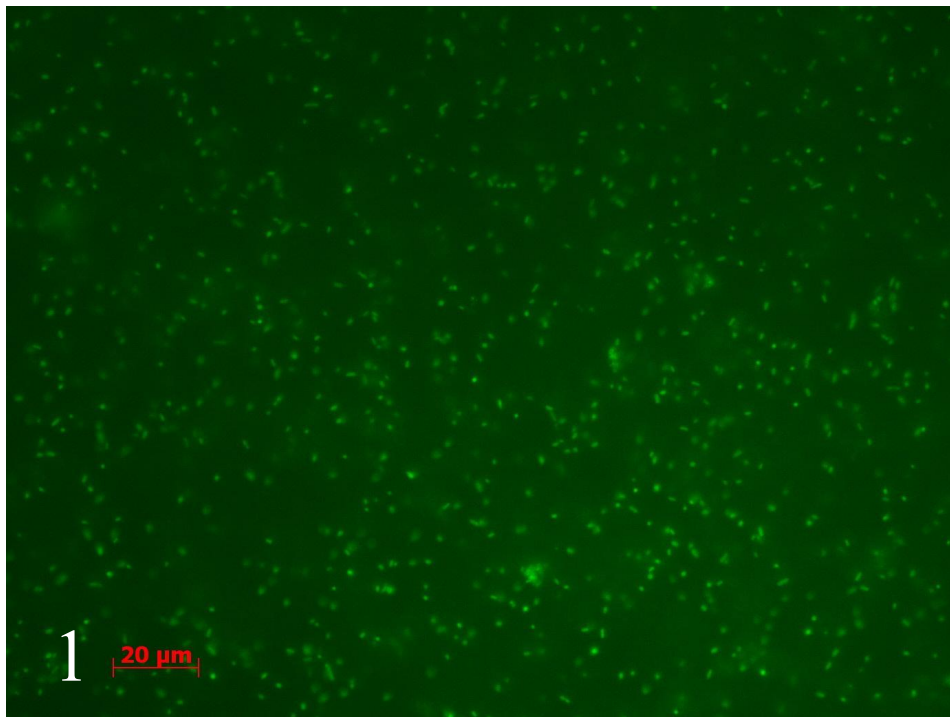
Реакция коаггутинация (РКА)

Флуоресцентные методы – совокупность иммунохимических методик, основанных на использовании индикаторных антигенов или антител, полученных с помощью введения в их состав флуоресцентных меток.



Бактерии *Escherichia coli* окрашенные акридиновым оранжевым.
Фото сделано с помощью люминесцентного микроскопа.

Бактерии, окрашенные акридиновым оранжевым.
Фотографии сделаны с помощью люминесцентного микроскопа.



1. *Escherichia coli*
2. *Salmonella infantis*
3. *Salmonella enteritidis*

Новый иммунохимический метод типирования бактерий

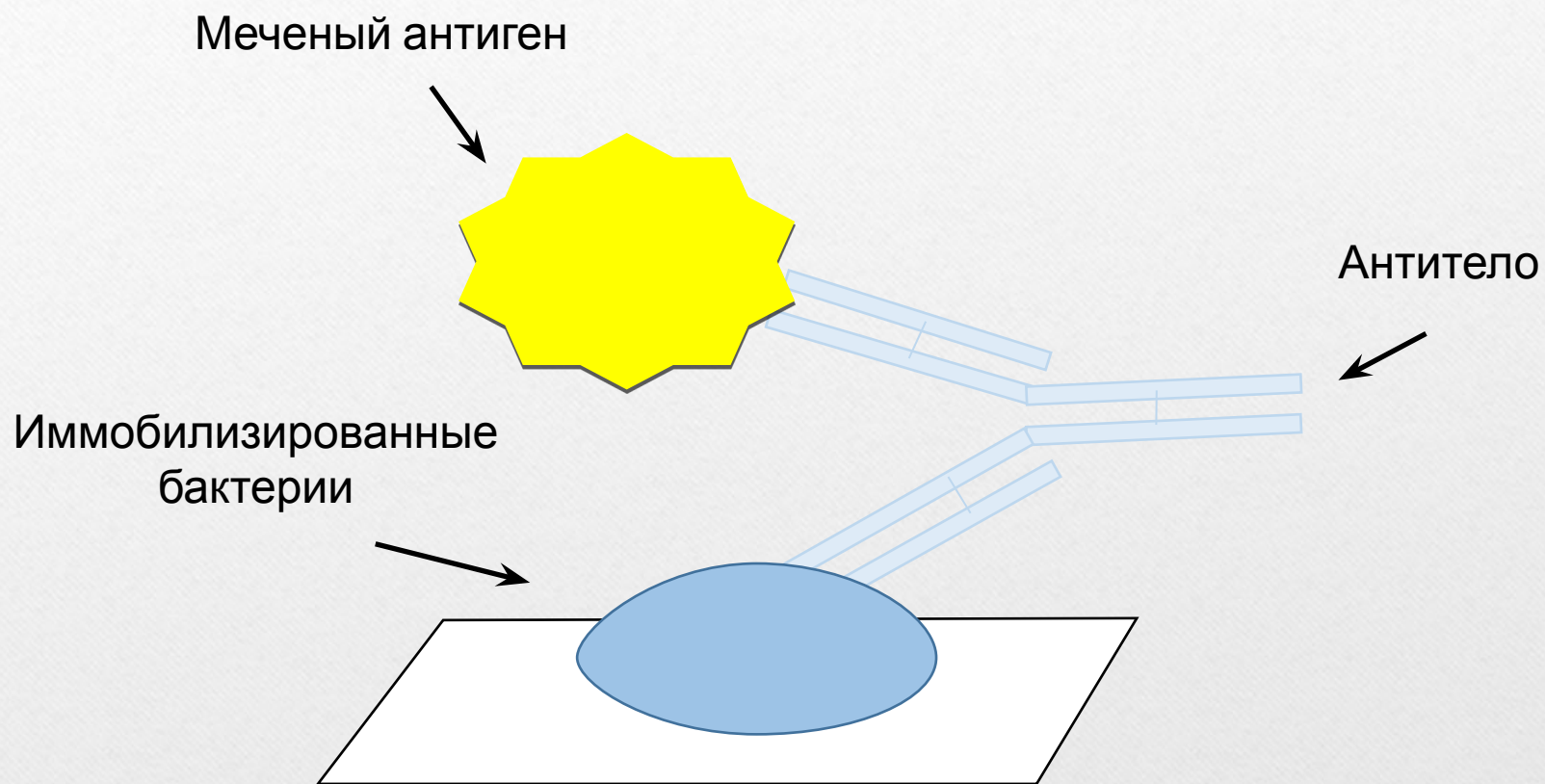
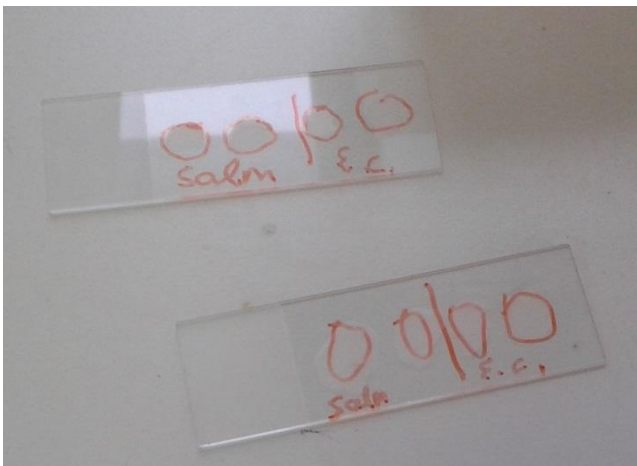


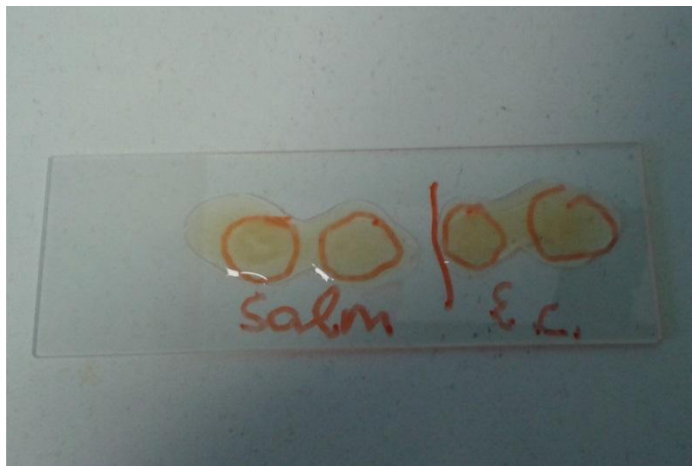
Схема реакции

Порядок проведения нового иммунохимического метода:

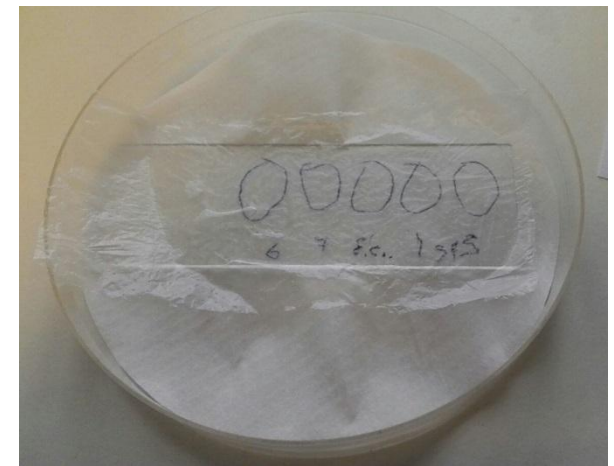
1. Иммуобилизовать исследуемые бактерии на предметном стекле (фото 1);
2. Нанести на стекло соответствующую сыворотку;
3. Инкубировать в течение 20 минут (фото 2,3);
4. Приготовить меченые бактерии (антигенов) (фото 4,5,6);
5. Нанести меченые антигены на предметное стекло;
6. Инкубировать в течение 20 минут;
7. Промыть препарат в промывочном буфере;
8. Сполоснуть водой;
9. Рассмотреть под люминесцентным микроскопом.



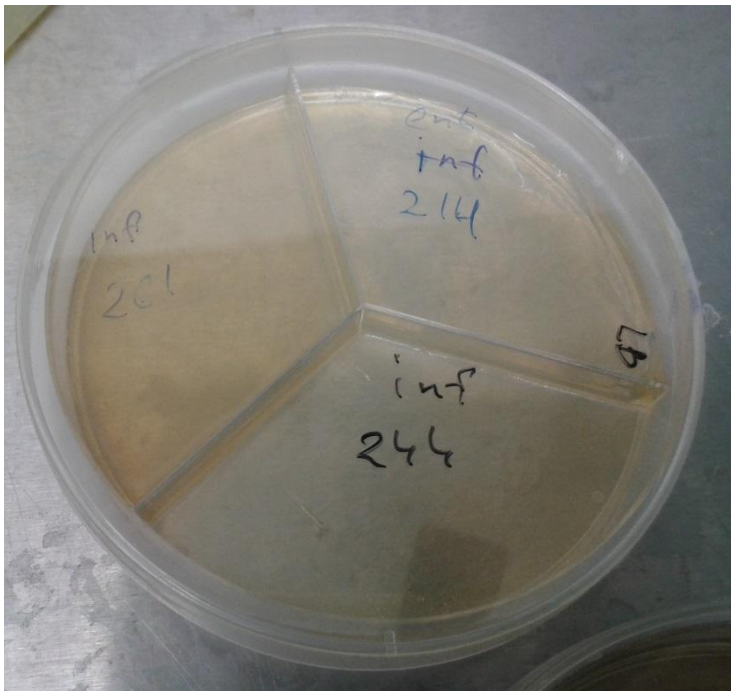
ΦΟΤΟ 1



ΦΟΤΟ 2



ΦΟΤΟ 3



ΦΟΤΟ 4



ΦΟΤΟ 5

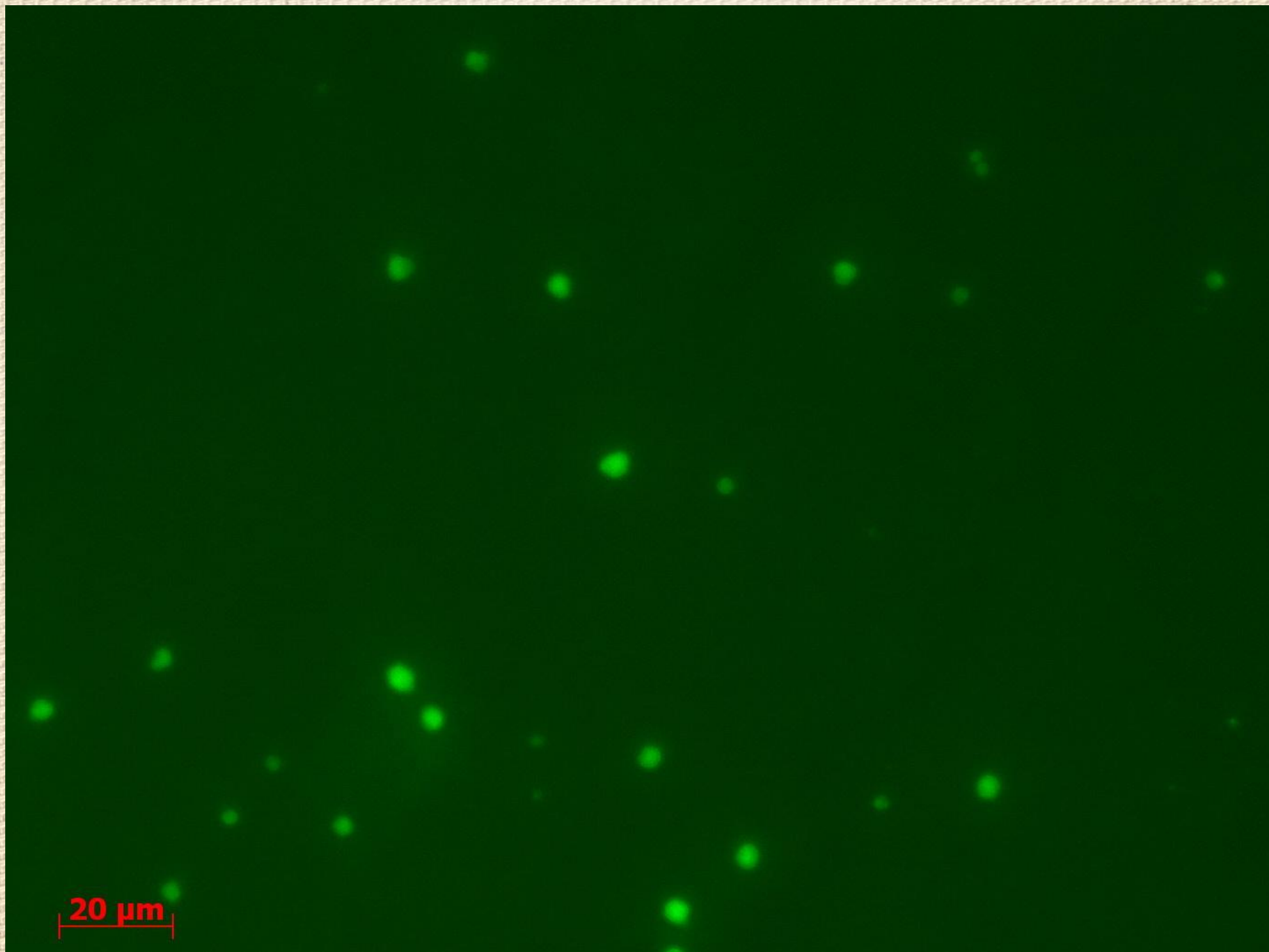


ΦΟΤΟ 6



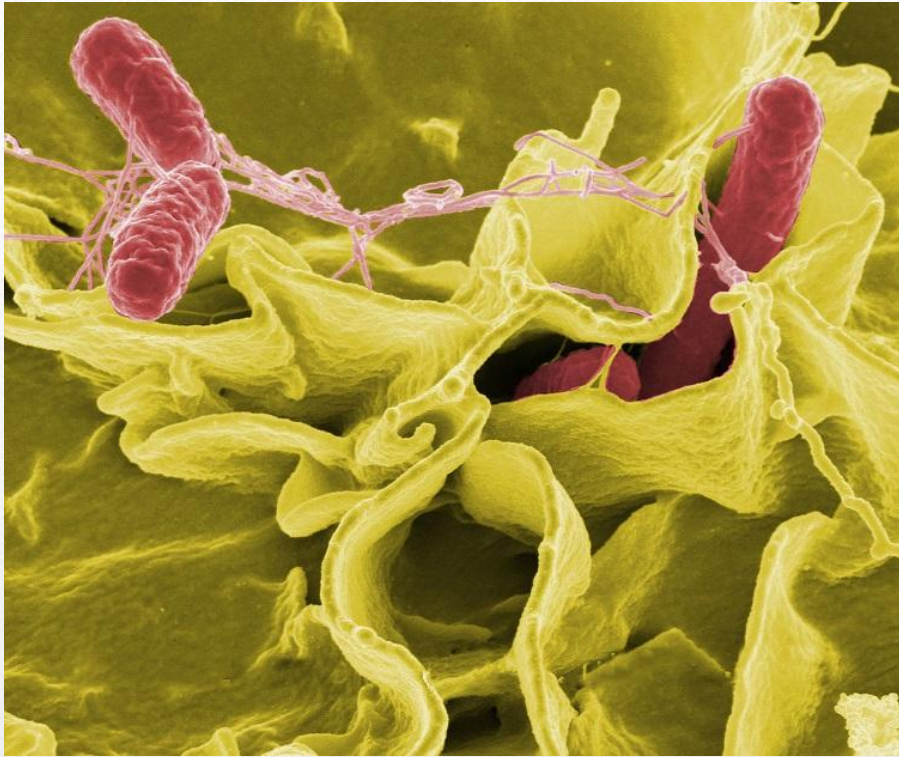
20 μm

Escherichia coli+ser-E.coli-ag-infantis

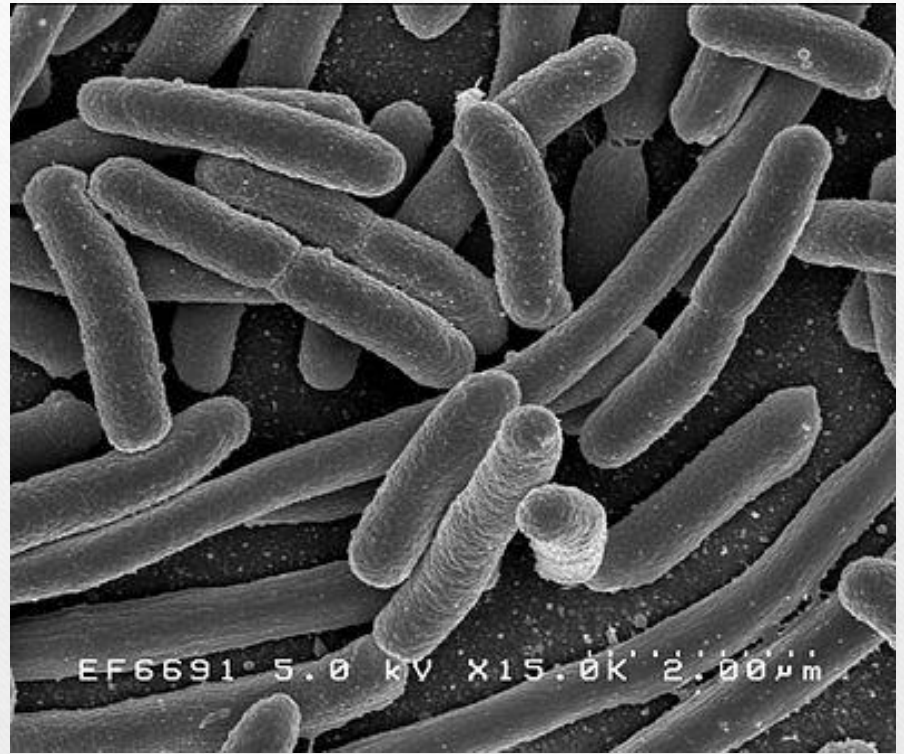


Salmonella infantis + ser-infantis + ag-infantis

	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella infantis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Морфология	Прямая, мелкая палочка с закругленными краями	Прямая, мелкая палочка с закругленными краями	Прямая, короткая, довольно толстая с закругленными краями
Патогенность	+	+	-
Грамположит./грамотриц.	-	-	-
Подвижность	+	+	+
Аэроб/анаэроб	Аэроб, анаэроб	Аэроб, анаэроб	Факультативный анаэроб
Оптимальная t° для размножения	35-37 °С	35-37 °С	37 °С
Питательные среды	универсальные	универсальные	неприхотлива к пит. средам
Устойчивость	Губительно воздействие ультрафиолетового облучения, дезинфицирующих веществ.	Губительно воздействие ультрафиолетового облучения, дезинф. веществ	Губительно воздействие высоких t°, дезинфицирующих веществ



Salmonella



Escherichia coli



Выводы:

1. Сравнение результатов эксперимента и изученной информации позволяет сказать, что реакции, которые являются значимыми в постановке метода и являются основополагающими факторами, влияющими на чувствительность и специфичность методов иммунодиагностики.
2. Была разработана модель нового иммунохимического метода иммунотипирования бактерий.
3. На примере бактерий *Salmonella infantis*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* была проведена проверка корректности модели и поиск оптимальных условий.

Преимущества метода:

1. Достаточно высокая чувствительность.
2. Экономичность
3. Простота постановки
4. Точность
5. Быстрота постановки.
6. Экономическая эффективность.

Спасибо за внимание!