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).

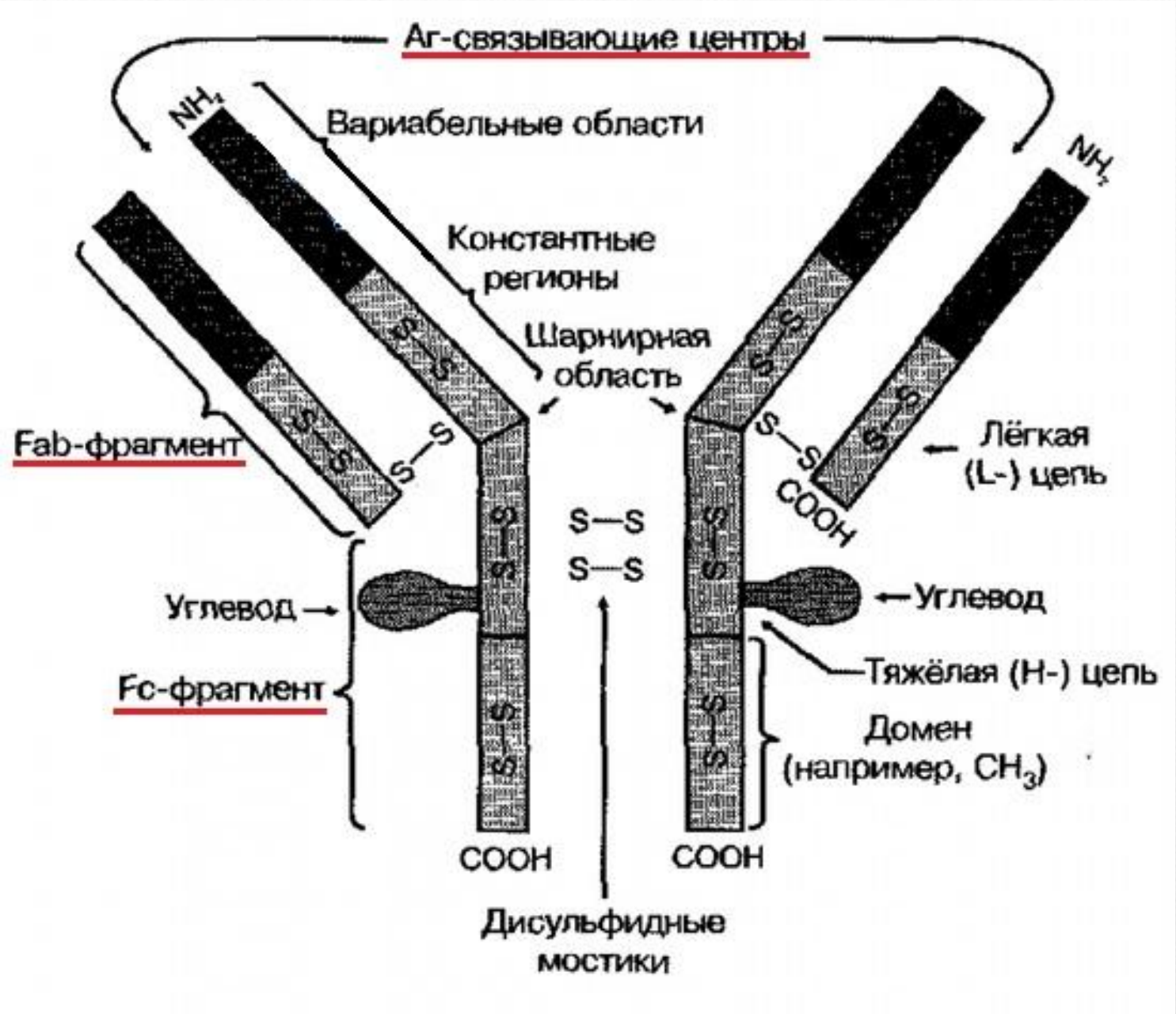
Иммунодиагностика инфекционных заболеваний

↓

Иммунохимические методы типирования бактерий

- Иммуносенсоры
- Прямые методы определения реакции антиген-антитело
- Индикаторные методы, основанные на использовании меток
- Пассивная агглютинация

Новый метод иммунофлюоресцентной детекции бактериальных антигенов



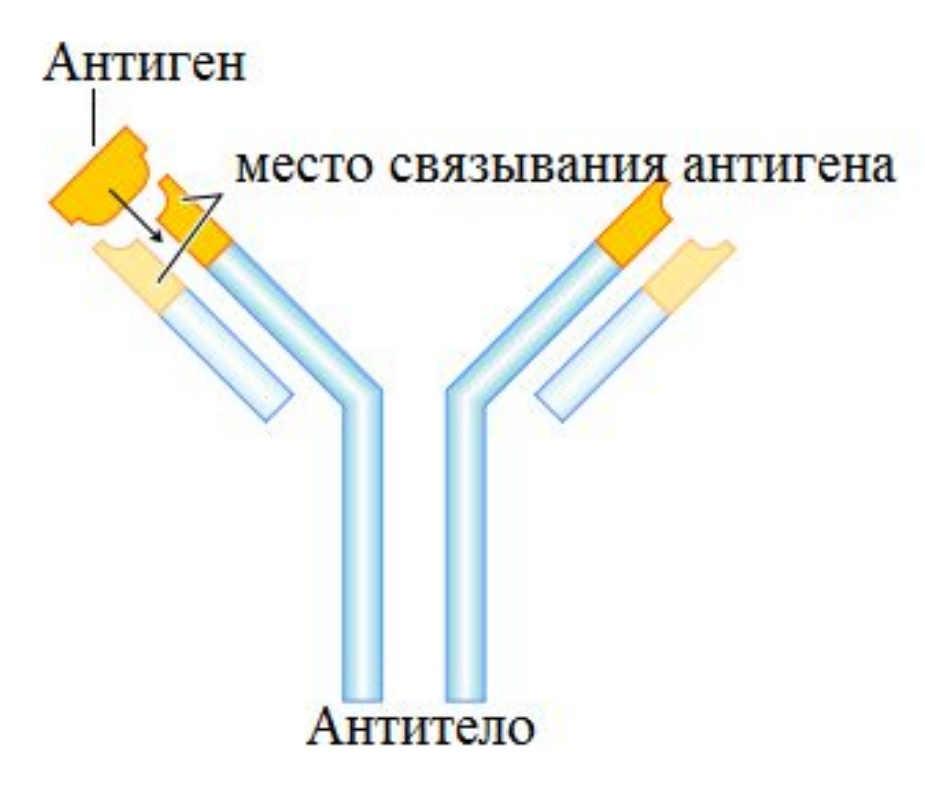
Строение антитела.

Реакция антиген-антитело

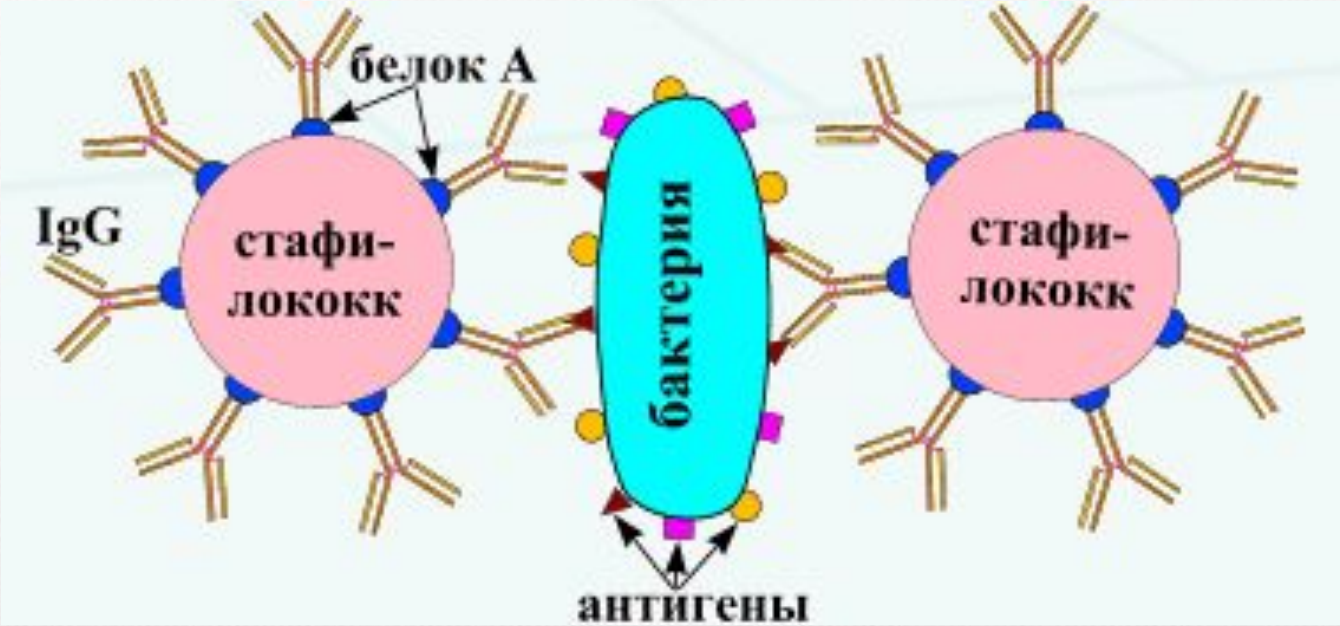
Этапы реакции:

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.

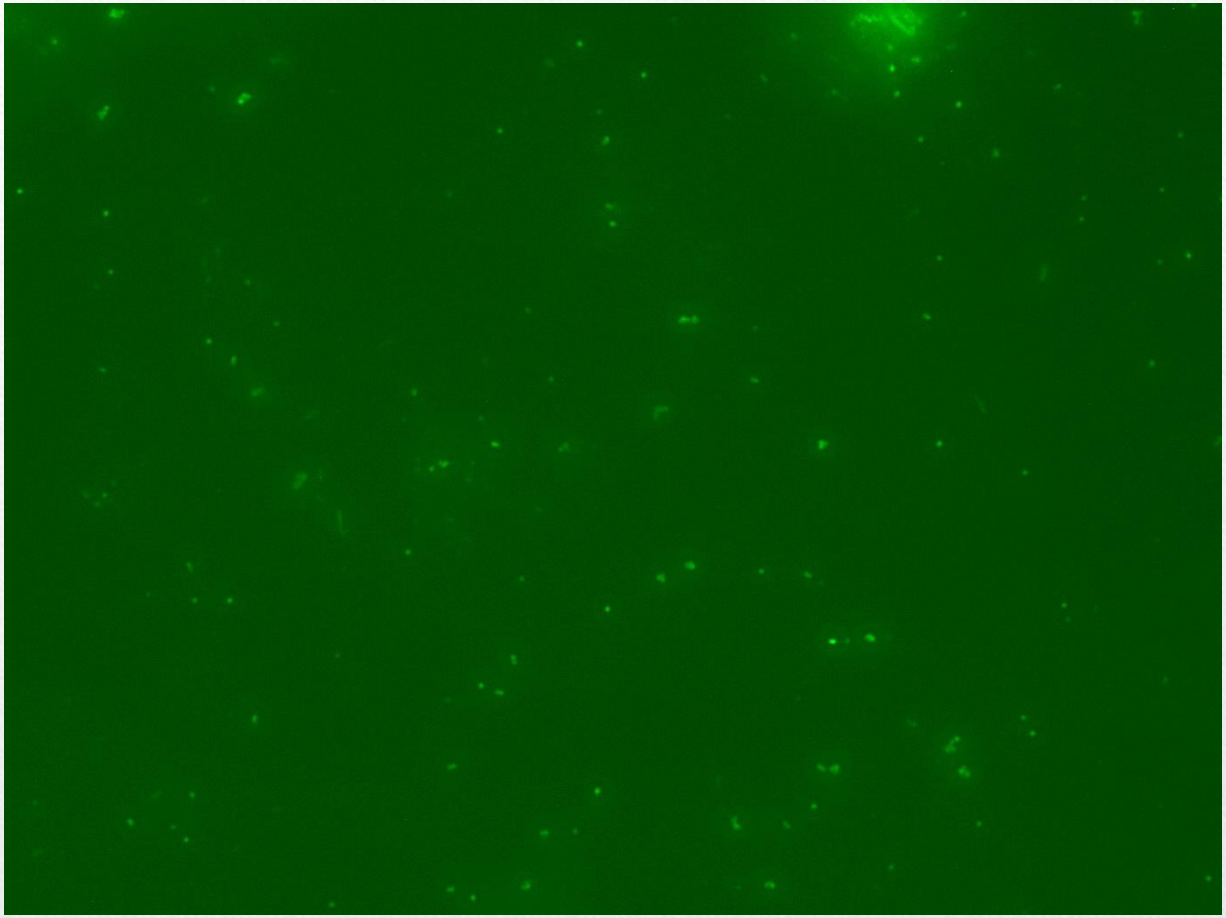


Реакцию коагглютинации применяют для определения антигенов с помощью антител, адсорбированных на белке А клеток стафилококка.



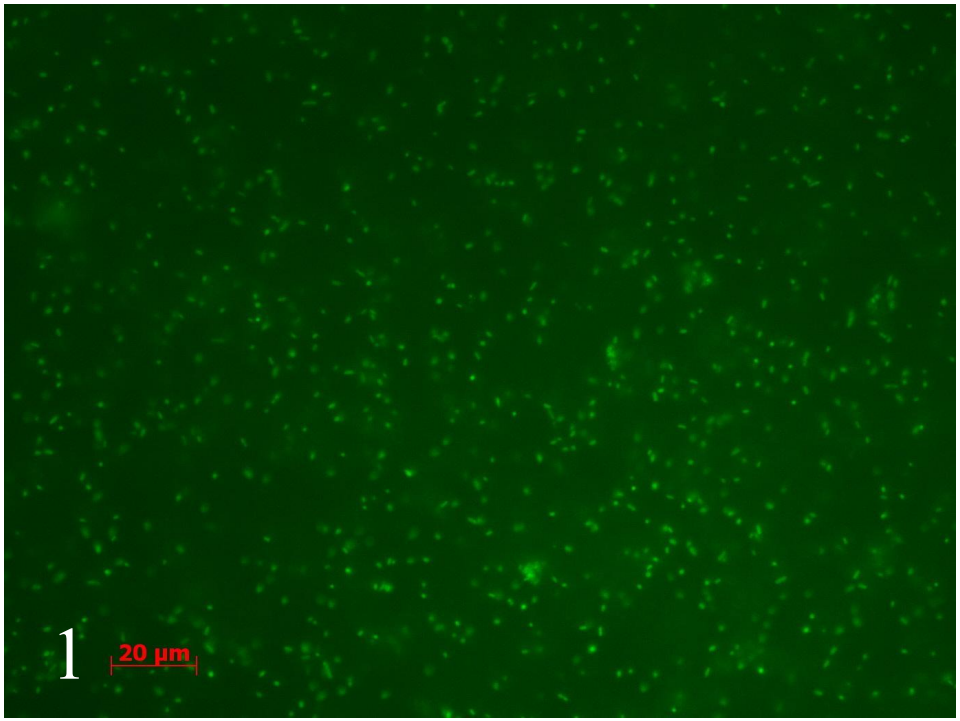
Реакция коагглютинация (РКА)

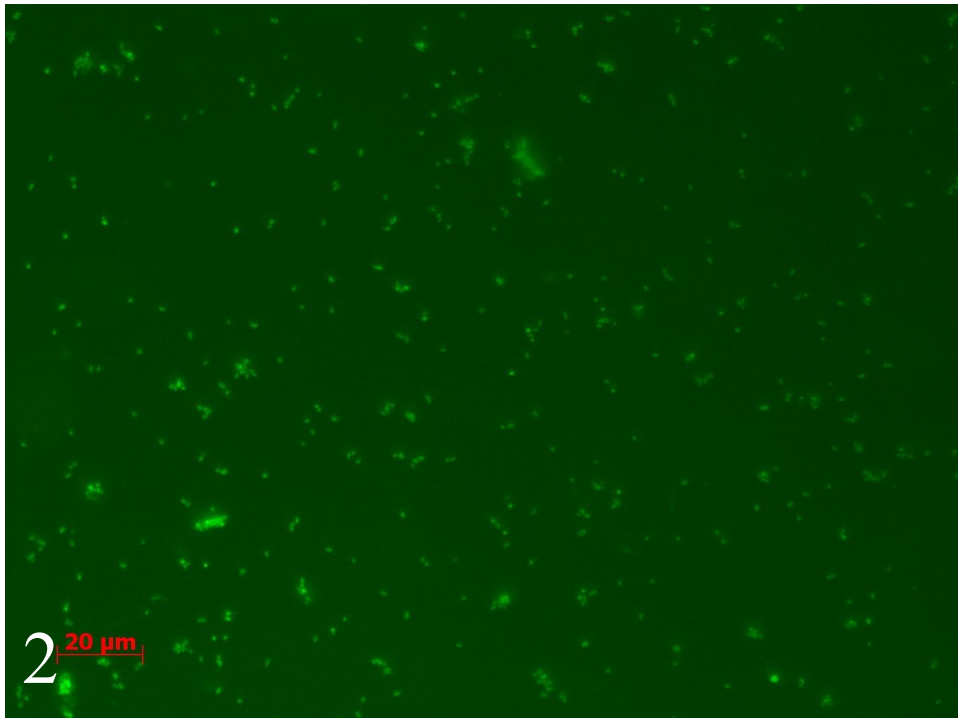
Флуоресцентные методы – совокупность иммунохимических методик, основанных на использовании индикаторных антигенов или антител, полученных с помощью введения в их состав флуоресцентных меток.

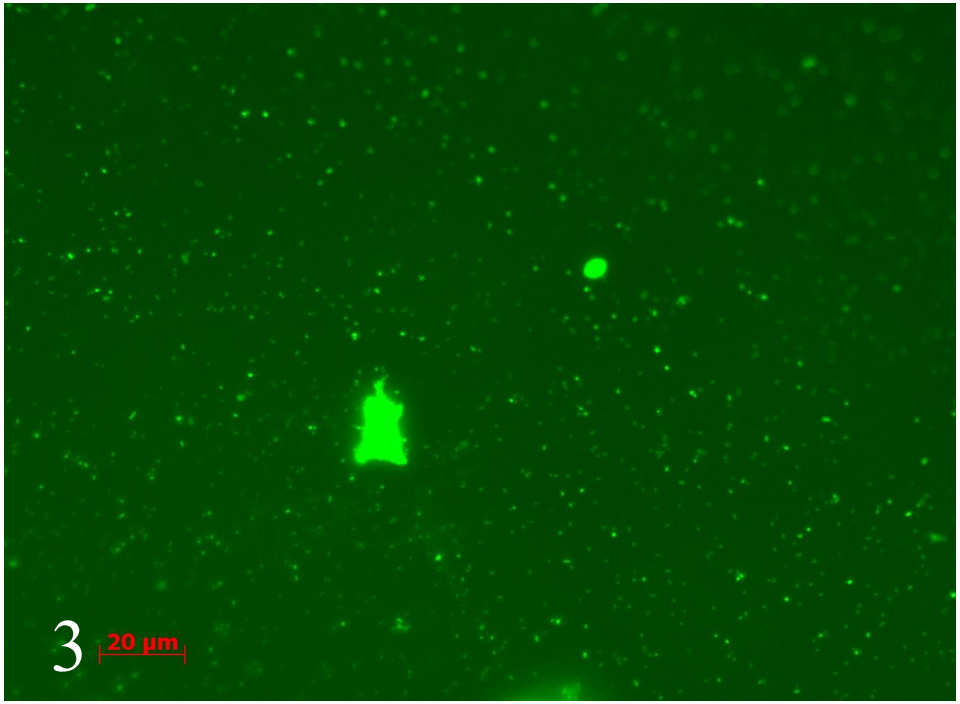


Бактерии Escherichia coli окрашенные акридиновым оранжевым. Фото сделано с помощью люминесцентного микроскопа.

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







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

Новый иммунохимический метод типирования бактерий

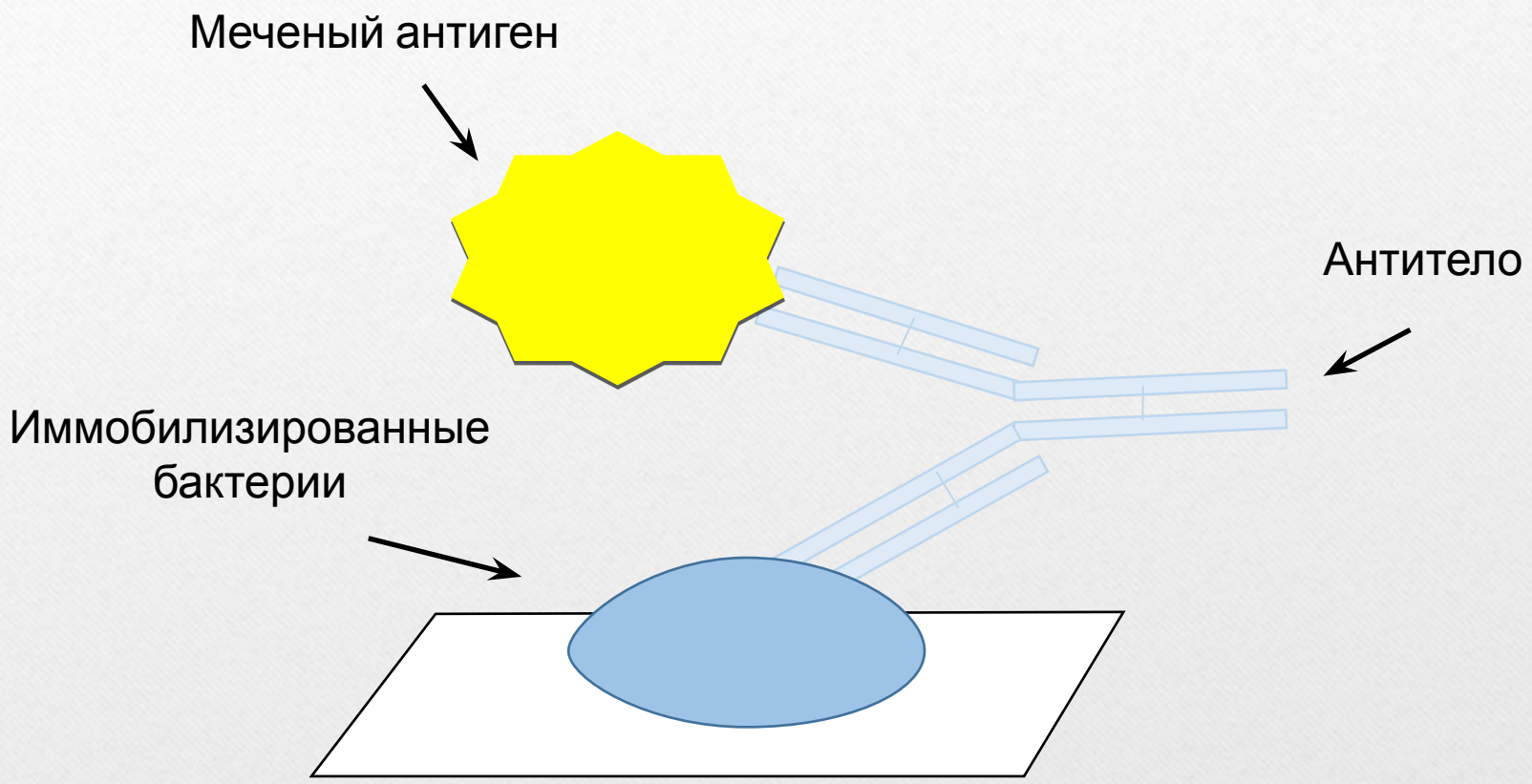


Схема реакции

Порядок проведения нового иммунохимического метода:

1. Иммобилизировать исследуемые бактерий на предметном стекле (фото 1);
2. Нанести на стекло соответствующую сыворотки;
3. Инкубировать в течение 20 минут (фото 2,3);
4. Приготовить меченые бактерий (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.

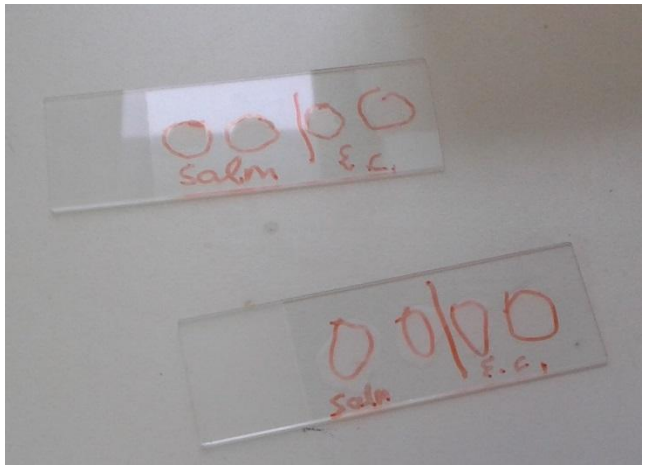


Фото 1

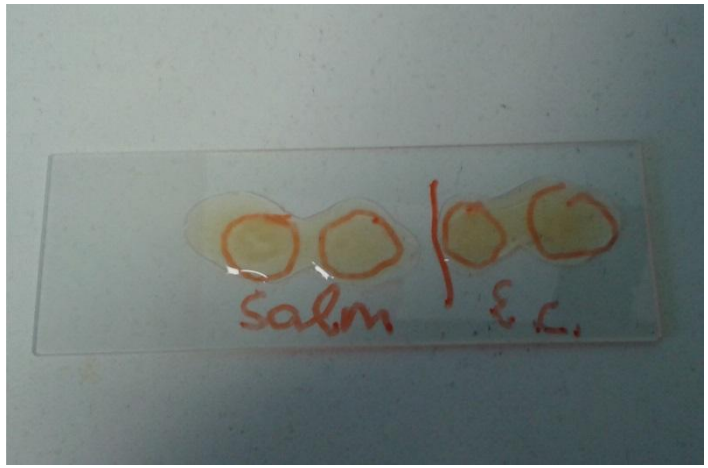


Фото 2

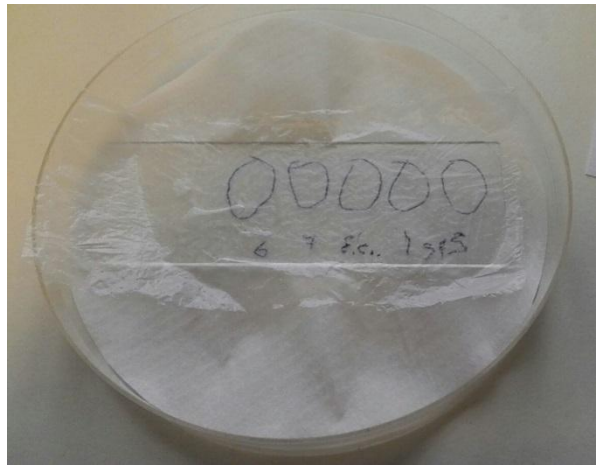


Фото 3

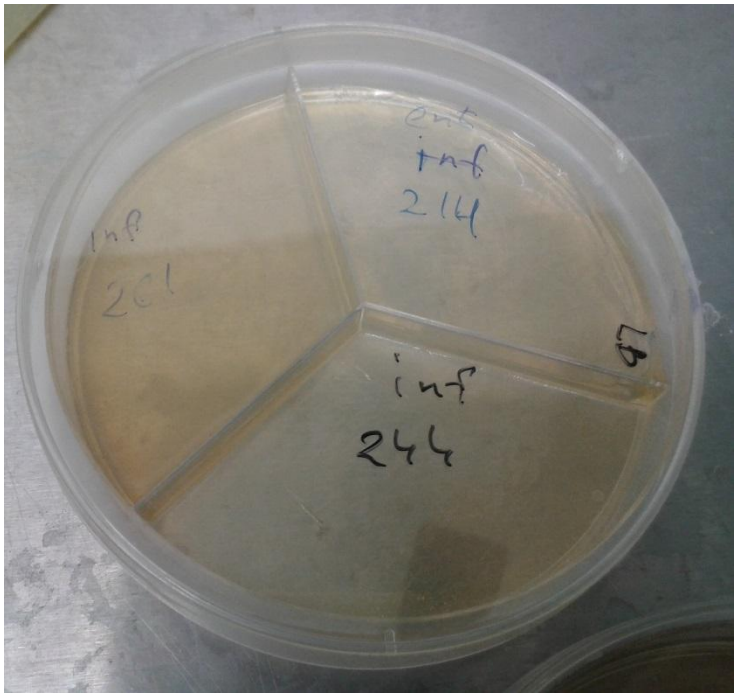
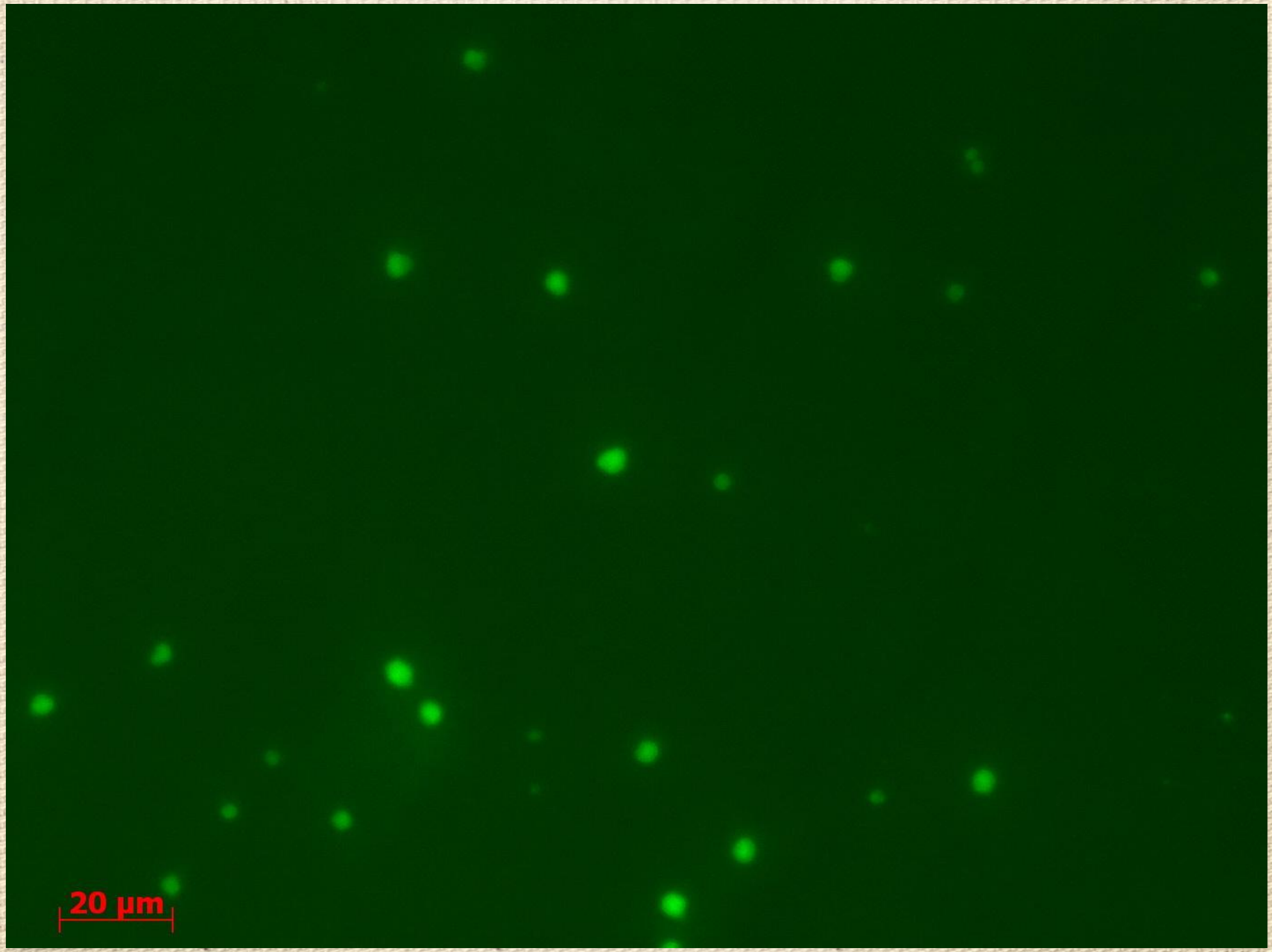


Фото 4

Фото 5

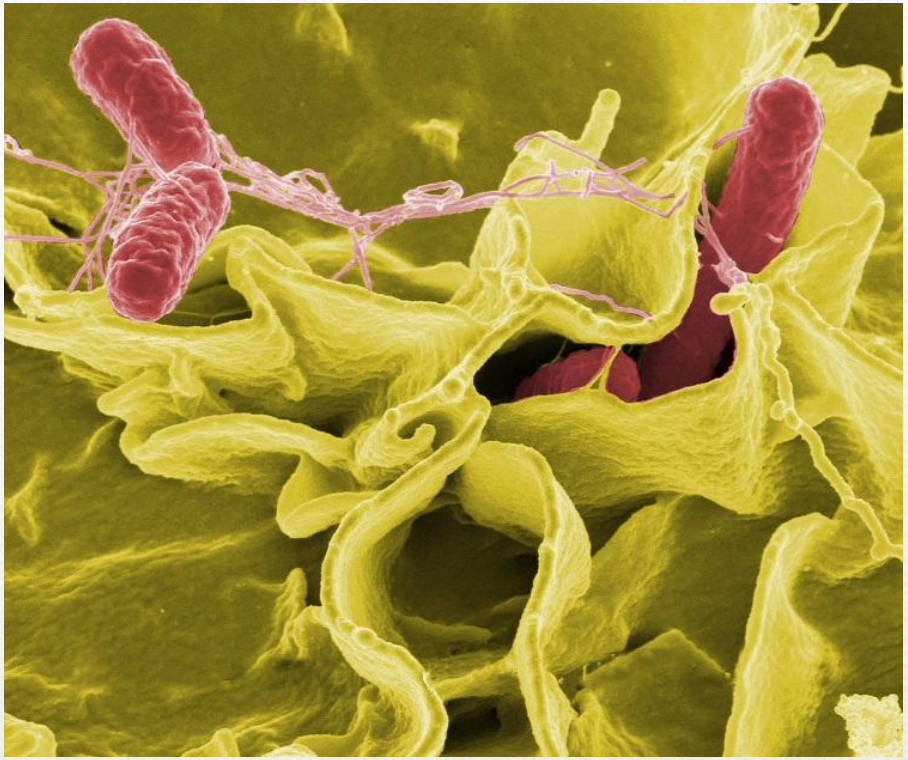
Фото 6

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

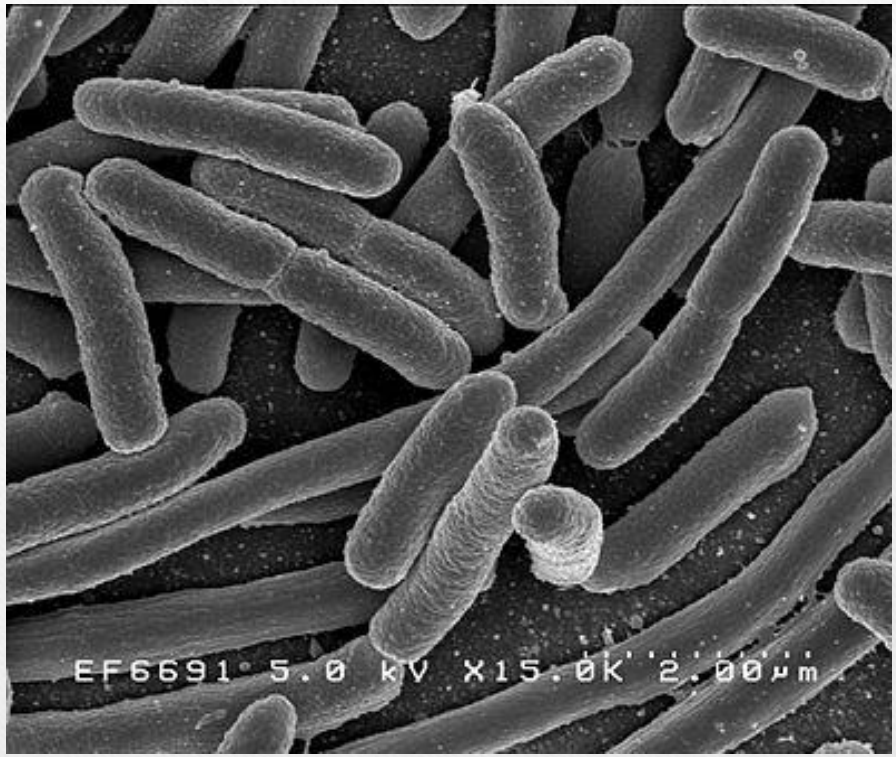


Salmonella infantis + ser-infantis + ag-infantis

	Salmonella enteritidis	Salmonella infantis	Escherichia coli
Морфология	Прямая, мелкая палочка с закругленными краями	Прямая, мелкая палочка с закруг-ленными краями	Прямая, короткая, довольно толстая с закругленными краями
Патогенность	+	+	-
Грамположит./грамотри ц.	-	-	-
Подвижность	+	+	+
Аэроб/анаэроб	Аэроб, анаэроб	Аэроб, анаэроб	Факультативный анаэроб
Оптимальная tº для размножения	35-37 ºС	35-37 ºС	37 ºС
Питательные среды	универсальные	универсальные	неприхотлива к пит. средам
Устойчивость	Губительно воздействие ультрафиолетового облу-чения, дезинфицирую-щих веществ.	Губительно воздейст-вие ультрафиоле-тового облучения, дезинф. веществ	Губительно воздейст-вие высоких tº, дезинфицирующих веществ



Salmonella

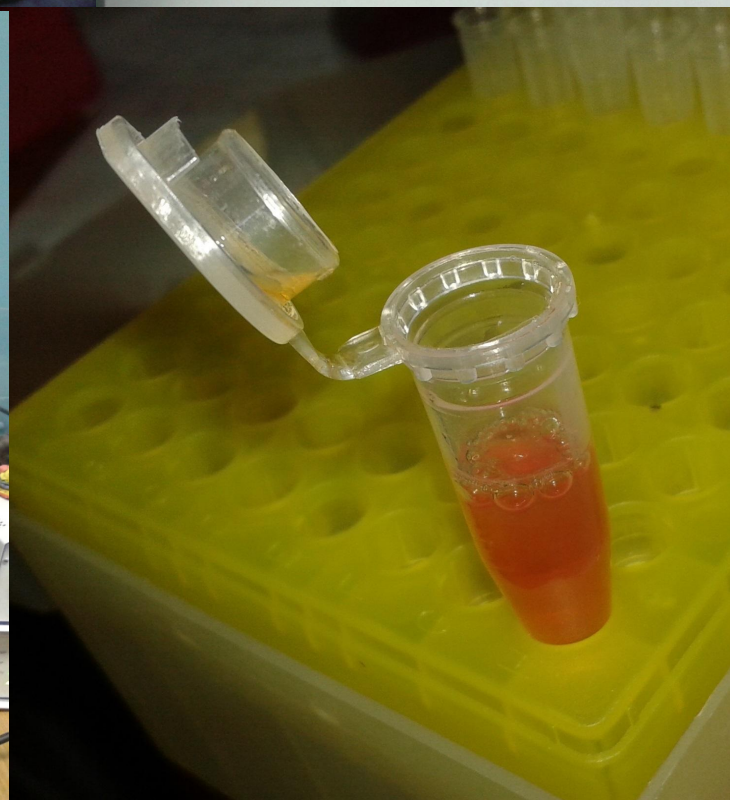


Escherichia coli

Sky Line
CENTRIFUGE CM-50
MIN
RPM x 1000
03
05
G
RPM
BRAKE
OPEN
START
STOP

Термостат
70
DNK - Технология

AxioCam MRm
1021628586 1/1
ApoTome



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!