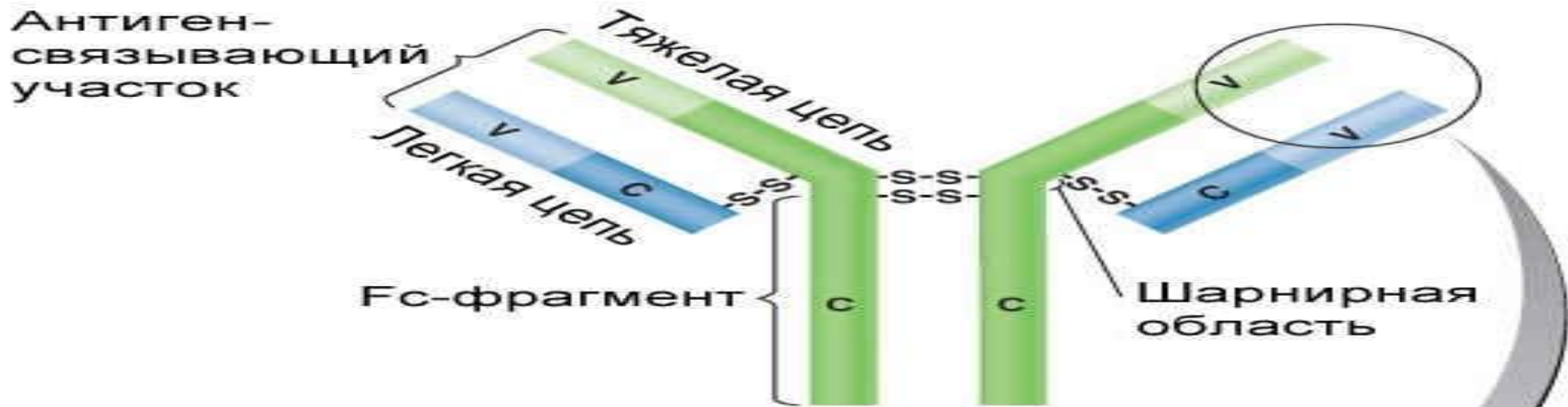


Иммунологические реакции в медицинской практике.

Конспект лекции, учебник стр. 115-120

Иммунные реакции - это взаимодействие между антителами и антигенами, причем эти реакции специфичны и обладают высокой чувствительностью. Они широко используются в медицинской практике.

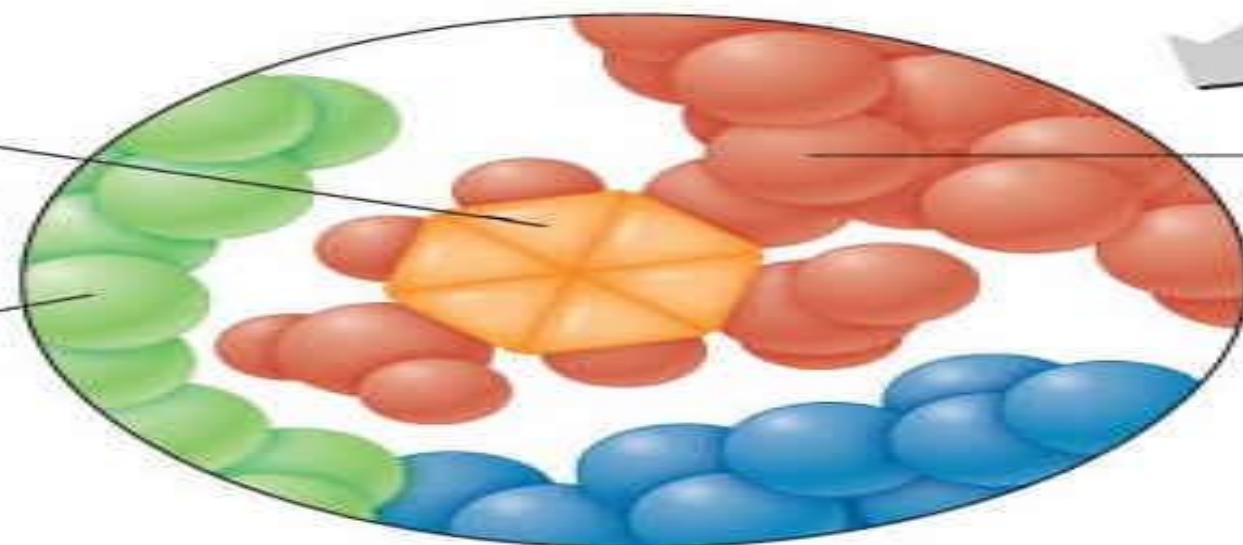
При введении антигена в организме образуются антитела. Антитела комплементарны антигену, вызвавшему их синтез, и способны с ним связываться. Связывание антигенов с антителами состоит из двух фаз. Первая фаза - специфическая, при которой происходит быстрое связывание антигенной детерминанты с активным центром Fab-фрагмента антител.



(a) Молекула антитела

Эпитоп
(антигенная
детерминанта)

Антиген-
связывающий
участок



(b) Увеличенный рисунок. Антиген-связывающий центр антитела взаимодействует с эпитопом антигена

Связывание обусловлено ван-дер-ваальсовыми силами, водородными и гидрофобными взаимодействиями. Прочность связи определяется степенью пространственного соответствия активного центра антитела и эпитопа антигена. После специфической фазы наступает более медленная - неспецифическая, которая проявляется видимым физическим явлением (например, образованием хлопьев при агглютинации и др.).

С помощью иммунных реакций можно решить следующие задачи:

- определение неизвестных антител по известным антигенам (антигенный диагностикум). Такая задача стоит, когда необходимо определить в сыворотке крови больного антител к возбудителю (серодиагностика). Нахождение антител позволяет подтвердить диагноз;
- определение неизвестных антигенов по известным антителам (диагностическая сыворотка). Это исследование проводят при идентификации культуры возбудителя, выделенной из материала больного (серотипирование), а также при обнаружении антигенов микробов и их токсинов в крови и других биологических жидкостях.

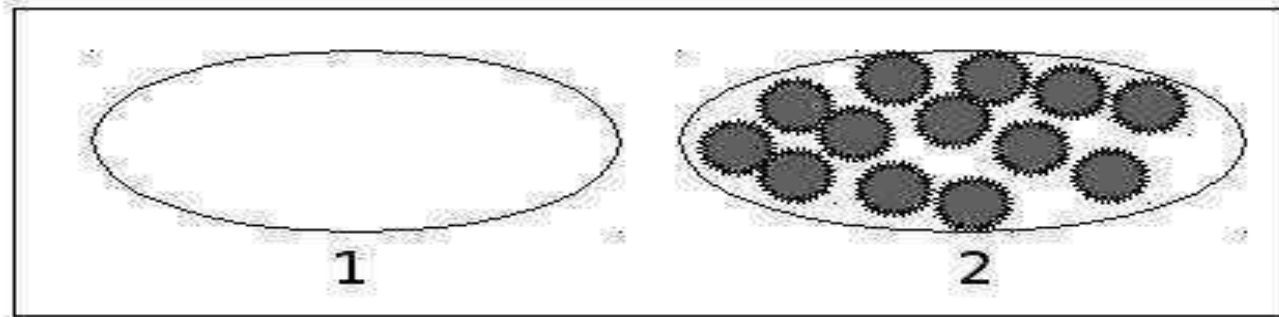
Существует много разновидностей иммунных реакций, различающихся по технике постановки и регистрируемому эффекту. Это реакции агглютинации (РА), преципитации (РП), реакции с участием комплемента (РСК), реакции с использованием меченых компонентов (РИФ, ИФА, РИА).

Реакция агглютинации

Реакция агглютинации (РА) - это иммунная реакция взаимодействия антигена с антителами в присутствии электролитов, причем антиген находится в корпускулярном состоянии (эритроциты, бактерии, частицы латекса с адсорбированными антигенами). При агглютинации происходит склеивание корпускулярных антигенов антителами, что проявляется образованием хлопьевидного осадка. Образование хлопьев происходит за счет того, что антитела имеют два активных центра, а антигены поливалентны, т.е. имеют несколько антигенных детерминант.

Реакция агглютинации (ориентировочная, для идентификации микроорганизма)

1. Физ. р-р + культура микроорганизмов
2. Сыворотка (1:100) + культура микроорганизмов



1. Отсутствие агглютинации
2. Наличие агглютинации

Возможна спонтанная агглютинация – R-формы бактерий

РА применяют для идентификации возбудителя, выделенного из материала больного, а также для обнаружения в сыворотке крови больного антител к возбудителю (например, реакции Райта и Хеддлсона при бруцеллезе, реакция Видаля при брюшном тифе и паратифах).

Самый простой способ постановки РА - реакция на стекле, это ориентировочная РА, которая применяется для определения возбудителя, выделенного от больного. При постановке реакции на предметное стекло наносят диагностическую агглютинирующую сыворотку (в разведении 1:10 или 1:20), затем вносят культуру от больного.

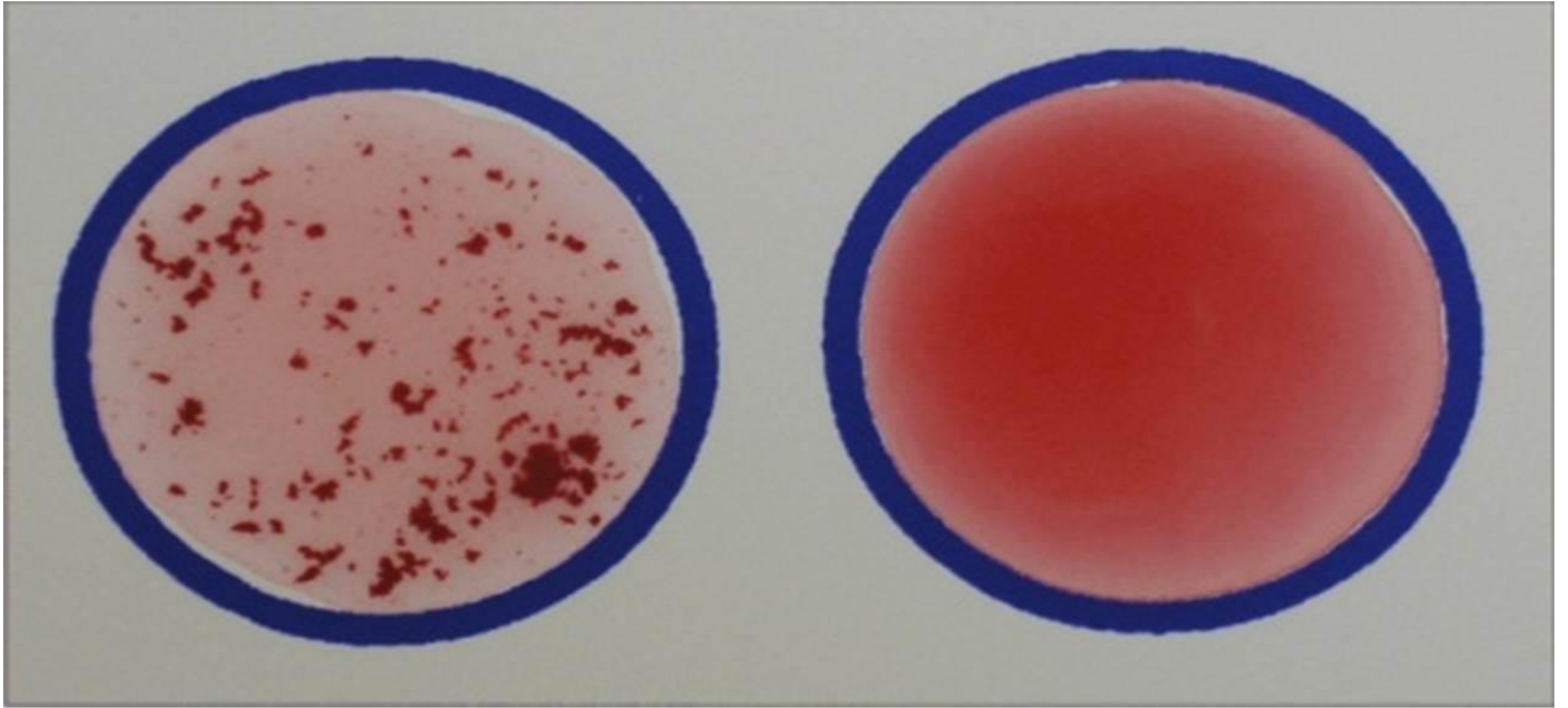
Реакция агглютинации

Метод обнаружения **корпускулярных антигенов** (бактерий, эритроцитов) путем их **склеивания** антителами с образованием **аггломератов** – хлопьев, в присутствии электролита NaCl.

РА используют для:

- Серотипирования выделенной чистой культуры возбудителя
- Экспресс-обнаружения возбудителя
- обнаружения антител в сыворотке крови больного животного





+

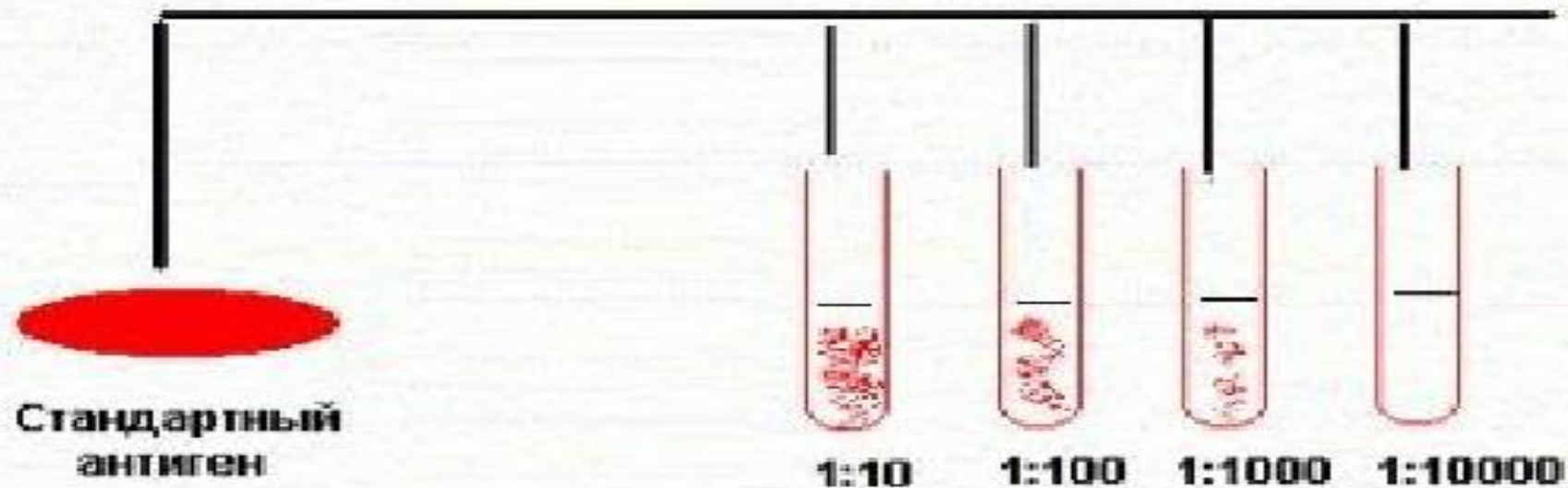
-

Реакция положительная, если в капле появляется хлопьевидный осадок. Рядом ставят контроль: вместо сыворотки наносят каплю раствора натрия хлорида. Если диагностическая агглютинирующая сыворотка неадсорбированная¹, то ее разводят (до титра - разведения, до которого должна происходить агглютинация), т.е. ставят **развернутую РА** в пробирках с увеличивающимися разведениями агглютинирующей сыворотки, к которым добавляют по 2-3 капли взвеси возбудителя, выделенного от больного. Агглютинацию учитывают по количеству осадка и степени просветления жидкости в пробирках. Реакцию считают положительной, если агглютинация отмечается в разведении, близком к титру диагностической сыворотки. Реакция сопровождается контролями: сыворотка, разведенная изотоническим раствором натрия хлорида, должна быть прозрачной, взвесь микробов в том же растворе - равномерно мутной, без осадка.

¹ Неадсорбированная агглютинирующая сыворотка может агглютинировать родственные бактерии, имеющие общие (перекрестно реагирующие) антигены. Поэтому пользуются *адсорбированными агглютинирующими сыворотками*, из которых удалены перекрестно реагирующие антитела путем адсорбции их родственными бактериями. В таких сыворотках сохраняются антитела, специфичные только к данной бактерии.

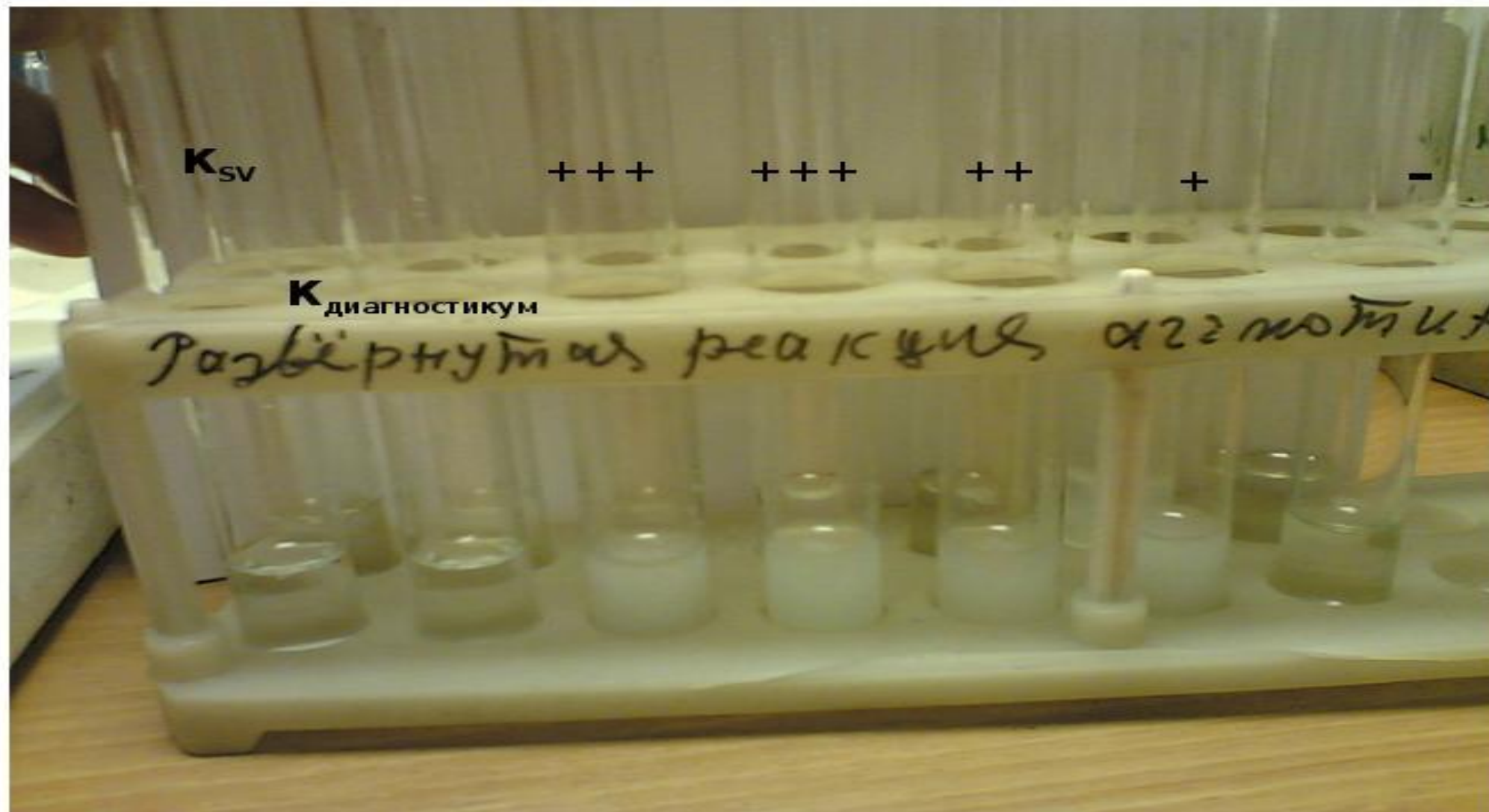
Для определения в сыворотке крови больного антител к возбудителю используют развернутую РА. При ее постановке в пробирках разводят сыворотку крови больного и добавляют в пробирки равное количество взвеси диагностикума (взвесь убитых микробов). После инкубации определяют наибольшее разведение сыворотки, при котором произошла агглютинация, т.е. образовался осадок (титр сыворотки). При этом реакция агглютинации с О-диагностикумом (бактерии, убитые нагреванием, сохранившие термостабильный О-антиген) происходит в виде мелкозернистой агглютинации. Реакция агглютинации с Н-диагностикумом (бактерии, убитые формалином, сохранившие термолабильный жгутиковый Н-антиген) - крупнохлопчатая и протекает быстрее.

Реакция агглютинации



Реакция агглютинации
антиген-антитело в разных
титрах

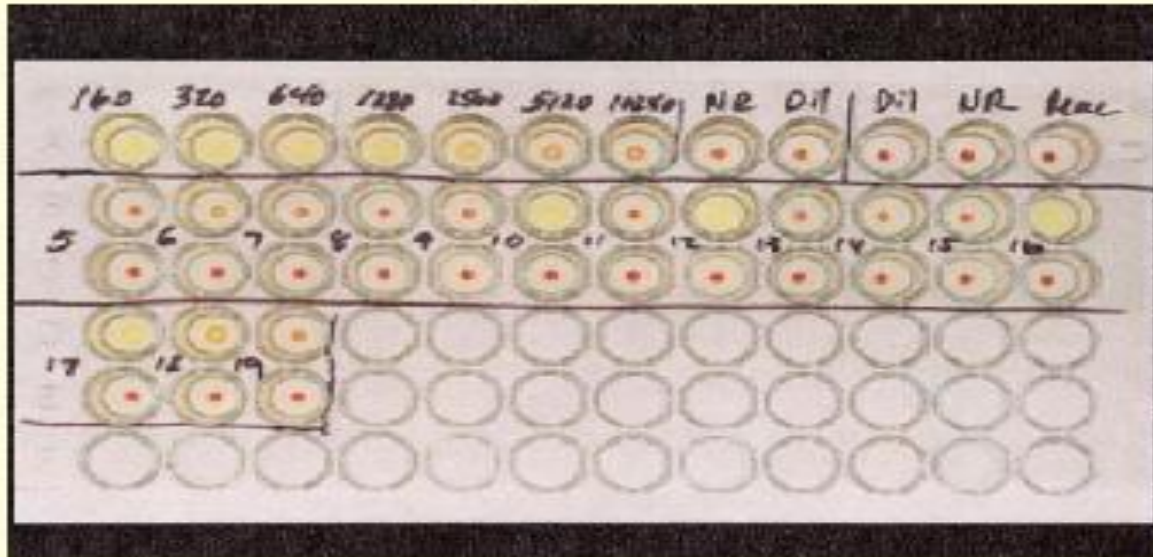
Развернутая реакция агглютинации



Методы агглютинации.

2. Развернутая реакция агглютинации.

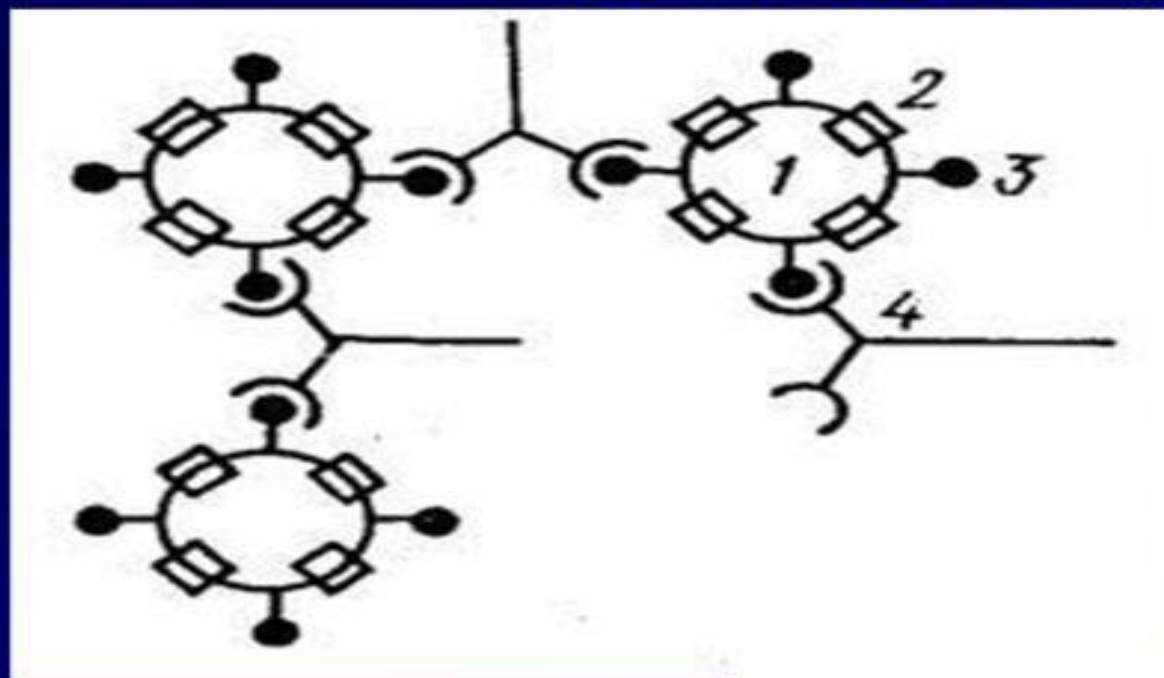
- проводят в пробирках или лунках пластин
- диагностическую сыворотку разводят до титра и вносят одинаковые количества антигена.



Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА или РПГА) является разновидностью РА. Этот метод обладает высокой чувствительностью. С помощью РНГА можно решить две задачи: определить антитела в сыворотке крови больного, к которой добавляют антигенный эритроцитарный диагностикум, представляющий собой эритроциты, на которых адсорбированы известные антигены; определить наличие антигенов в исследуемом материале. В этом случае реакцию иногда называют реакцией обратной непрямой гемагглютинацией (РОНГА).

РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ РПГА:

эритроциты (1), нагруженные антигеном (3),
связываются специфическими антителами (4).



Результат РНГА (РПГА)



Положительный («зонтик»)

Отрицательный («пуговка»)

MyShared

При постановке к исследуемому материалу добавляют антигематин эритроцитарный диагностикум (эритроциты с адсорбированными на их поверхности антителами). Эритроциты в этой реакции выполняют роль носителей и пассивно вовлекаются в образование иммунных агрегатов. При положительной реакции пассивно склеенные эритроциты покрывают дно лунки ровным слоем с фестончатыми краями («зонтик»); при отсутствии агглютинации эритроциты скапливаются в центральном углублении лунки, образуя компактную «пуговку» с резко очерченными краями.

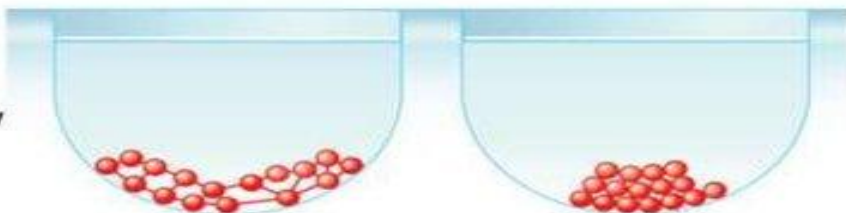


(a)

Enlarged photo of wells



Side view of wells



(b) Agglutinated **(c) Nonagglutinated**

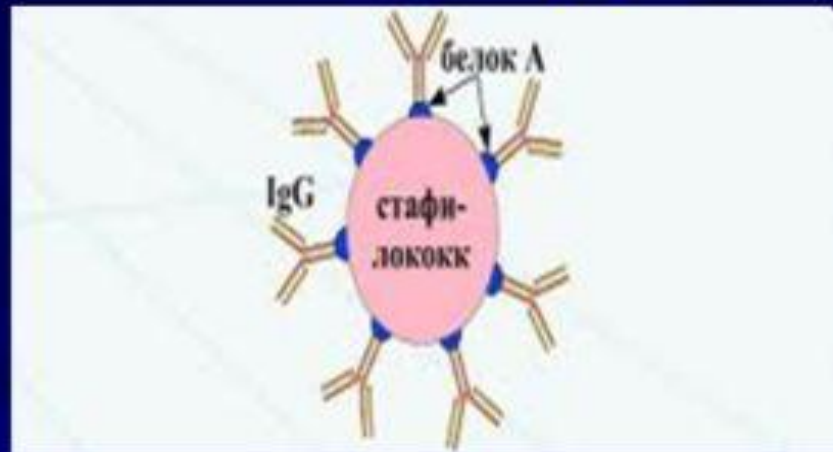
(a) Each well in this microtiter plate contains, from left to right, only half the concentration of serum that is contained in the preceding well. Each well contains the same concentration of particulate antigens, in this instance red blood cells.

(b) In a positive (agglutinated) reaction, sufficient antibodies are present in the serum to link the antigens together, forming a mat of antigen–antibody complexes on the bottom of the well.

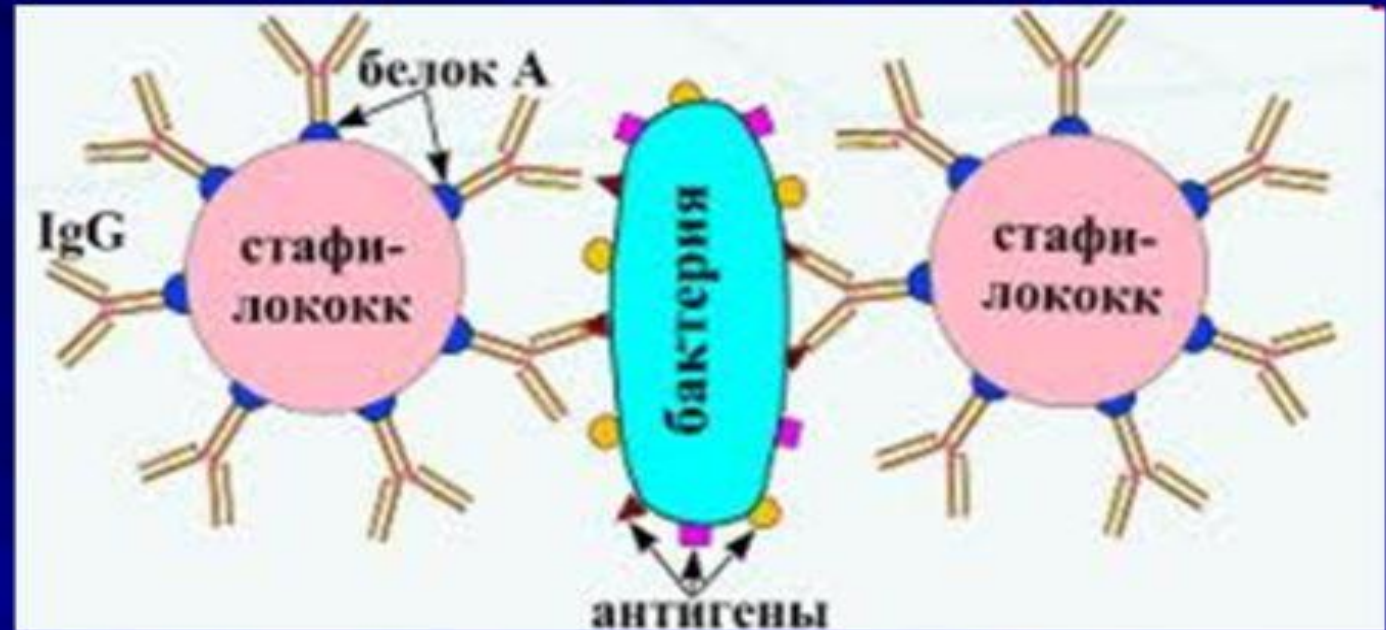
(c) In a negative (nonagglutinated) reaction, not enough antibodies are present to cause the linking of antigens. The particulate antigens roll down the sloping sides of the well, forming a pellet at the bottom. In this example, the antibody titer is 160 because the well with a 1:160 concentration is the most dilute concentration that produces a positive reaction.

Реакция коагглютинации используется для определения клеток возбудителя (антигенов) с помощью антител, адсорбированных на *Staphylococcus aureus*, содержащем белок А. Белок А обладает сродством к Fc-фрагменту иммуноглобулинов. Благодаря этому антитела связываются с стафилококком опосредованно через Fc-фрагмент, а Fab-фрагменты ориентированы наружу и способны взаимодействовать с соответствующими микробами, выделенными от больных. При этом образуются хлопья.

РЕАКЦИЯ КОАГГЛЮТИНАЦИИ (РКА)



Антительный диагностикум



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

Применение реакции коагглютинации перспективно для быстрого обнаружения бактериальных антигенов в крови, спинномозговой жидкости, мокроте и другом материале.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) используется при диагностике вирусных инфекций, причем только инфекций, вызываемых гемагглютинирующими вирусами. Эти вирусы содержат на своей поверхности белок - гемагглютинин, который ответствен за реакцией гемагглютинации (РГА) при добавлении к вирусам эритроцитов. РТГА заключается в блокировании антителами вирусных антигенов, в результате чего вирусы теряют способность агглютинировать эритроциты.



Эритроциты

+



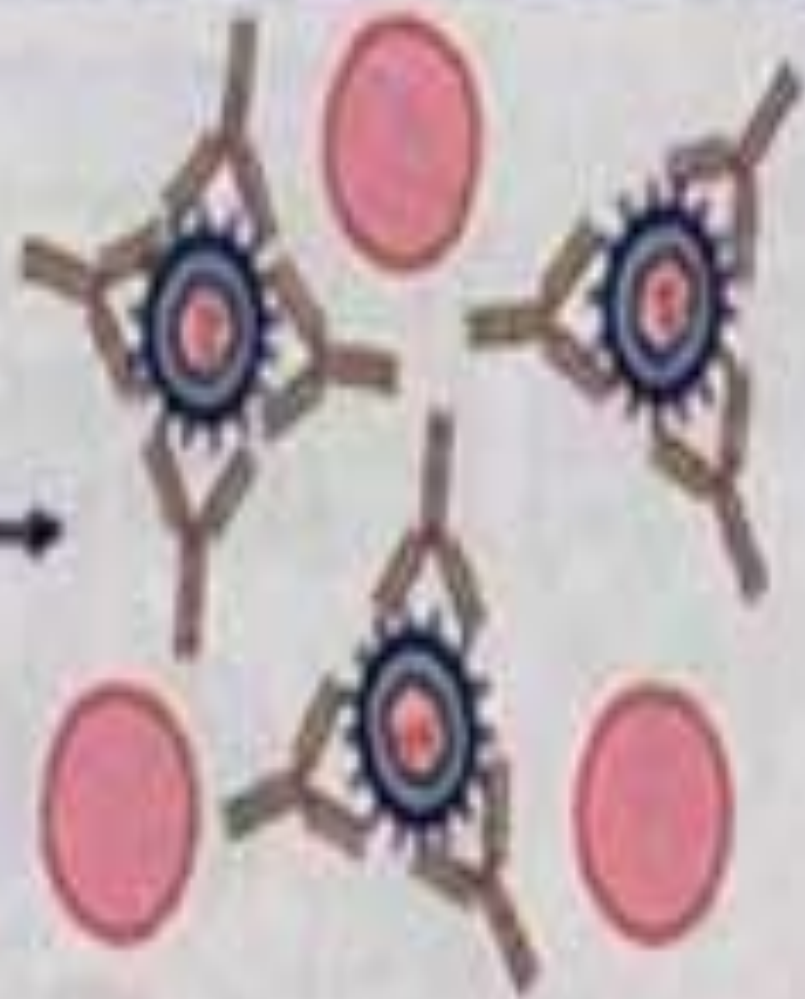
Антивирусные
антитела

+



Вирусы

→



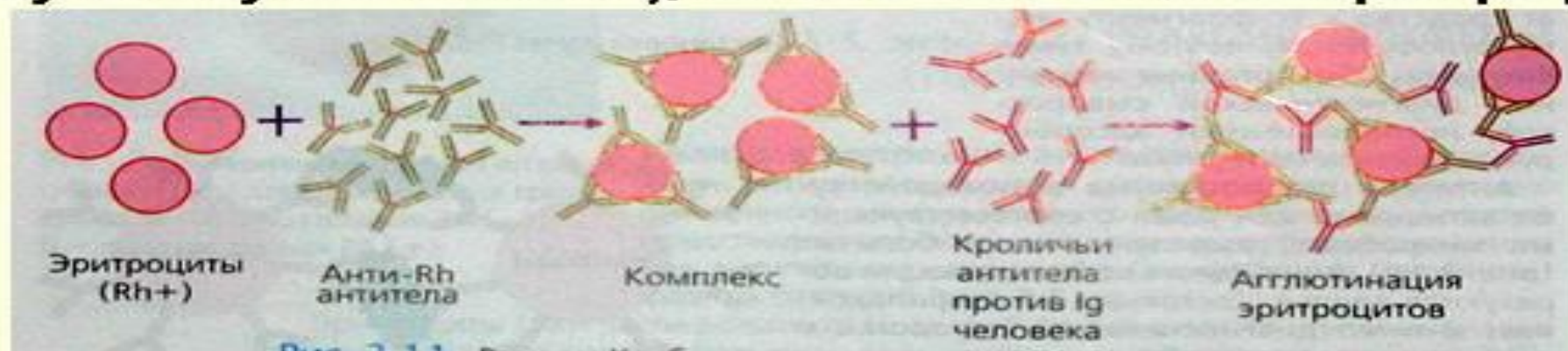
Нейтрализация вирусов антителами
и торможение гематтокизации

Реакция Кумбса - РА для определения неполных антител. При некоторых инфекционных заболеваниях, например при бруцеллезе, в сыворотке крови больного циркулируют неполные антитела к возбудителю. Неполные антитела называют блокирующими, так как они имеют один антигенсвязывающий участок, а не два, как полноценные антитела. Поэтому при добавлении антигенного диагностикума неполные антитела связываются с антигенами, но не склеивают их. Для проявления реакции добавляют антиглобулиновую сыворотку (антитела к иммуноглобулинам человека), которая приведет к агглютинации иммунных комплексов (антигенный диагностикум + неполные антитела), образовавшихся в первой стадии реакции.

Реакция Кумбса

Реакция агглютинации для определения антирезусных антител (непрямая реакция Кумбса)

Антирезусные антитела (IgG) взаимодействуют с резус-положительными эритроцитами, но не вызывают их агглютинации («неполные» антитела). Наличие таких «неполных» антител определяют в непрямой реакции Кумбса. Для этого в систему антирезусные антитела + резус-положительные эритроциты добавляют антиглобулиновую сыворотку (антитела против иммуноглобулина человека), что вызывает агглютинацию эритроцитов.






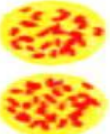


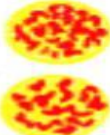
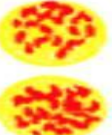



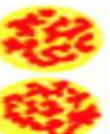

Непрямую реакцию Кумбса применяют у больных при внутрисосудистом гемолизе. У некоторых таких больных обнаруживают неполные одновалентные антирезусные антитела. Они специфически взаимодействуют с резусположительными эритроцитами, но не вызывают их агглютинации. Поэтому в систему антирезусные антитела + резус-положительные эритроциты добавляют антиглобулиновую сыворотку, что вызывает агглютинацию эритроцитов. С помощью реакции Кумбса диагностируют патологические состояния, связанные с внутрисосудистым лизисом эритроцитов иммунного генеза, например гемолитическую болезнь новорожденных, обусловленную резус-конфликтом.

РА для определения групп крови основана на агглютинации эритроцитов антителами иммунной сыворотки к антигенам групп крови А(II), В(III). Контролем являются сыворотка, не содержащая антител, т.е. сыворотка АВ(IV) группы крови, и антигены эритроцитов групп А(II) и В(III). В качестве отрицательного контроля применяют эритроциты группы 0(I), поскольку они не имеют антигенов.

Для определения резус-фактора используют антирезусные сыворотки (не менее двух различных серий). При наличии на мембране исследуемых эритроцитов резус-антигена происходит агглютинация этих клеток.

Переливання крові

Реакція
аглютинації –
склеювання
еритроцитів

Реакція аглютинації со стандартними сыворотками			Група исследуемой крови
$O\alpha\beta$ (I)	$A\beta$ (II)	$B\alpha$ (III)	
			$O\alpha\beta$ (I)
			$A\beta$ (II)
			$B\alpha$ (III)
			AB_0 (IV)
Контроль с сывороткой AB_0 (IV)			

Реакция преципитации

РП - это иммунная реакция взаимодействия антител с антигенами в присутствии электролитов, причем антиген находится в растворимом состоянии. При преципитации происходит осаждение растворимых антигенов антителами, что проявляется помутнением в виде полос преципитации. Образование видимого преципитата наблюдается при смешивании обоих реагентов в эквивалентных соотношениях. Избыток одного из них снижает количество осаждающихся иммунных комплексов. Существуют различные способы постановки реакции преципитации.

Реакция преципитации: применение

Реакция преципитации широко применяется в

диагностике
инфекционных
заболеваний

судебно-медицинской
экспертизе

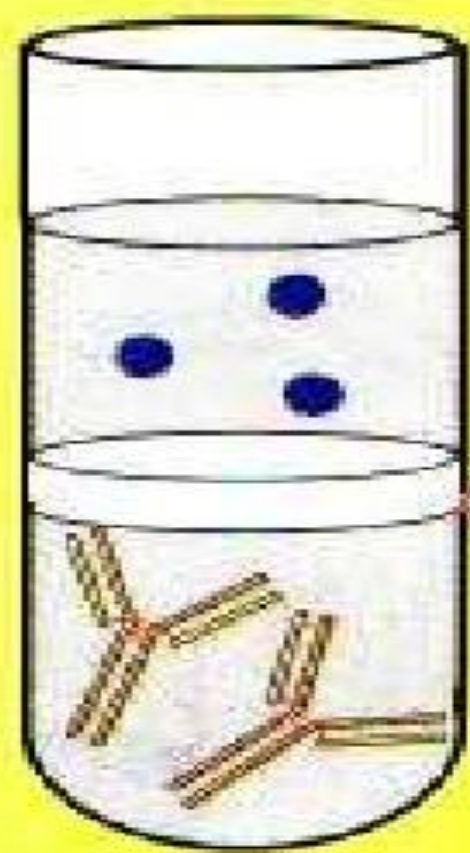
санитарной практике

определение видовой
и индивидуальной
принадлежности
белков

выявление
фальсификации
рыбных и мясных
изделий

Реакция кольцепреципитации ставится в преципитационных пробирках с малым диаметром. В пробирку вносят иммунную сыворотку и осторожно наслаивают растворимый антиген. При положительном результате на границе двух растворов образуется кольцо молочного цвета. Реакция кольцепреципитации, с помощью которой определяют наличие антигенов в органах и тканях, экстракты которых кипятят и фильтруют, называется реакцией термопреципитации (реакция Асколи для определения термостабильного сибиреязвенного антигена).

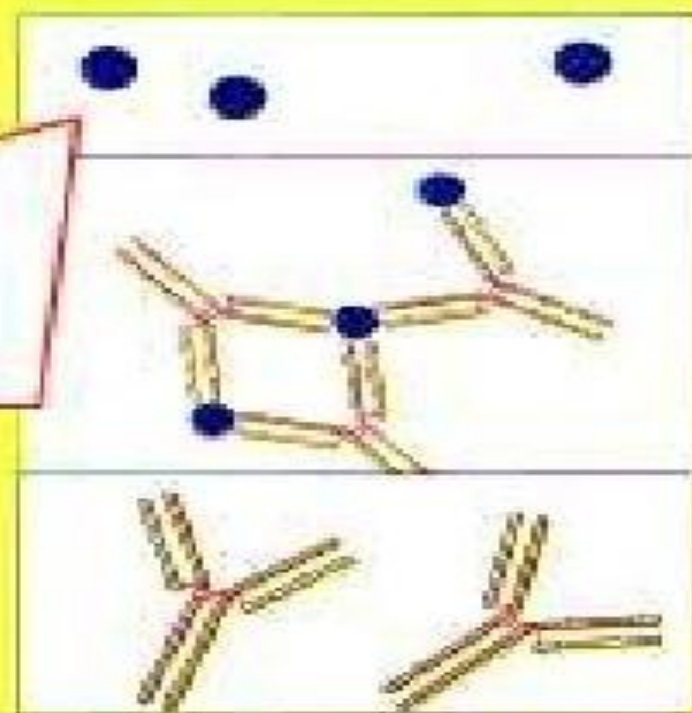
Реакция преципитации в пробирке



Антигены

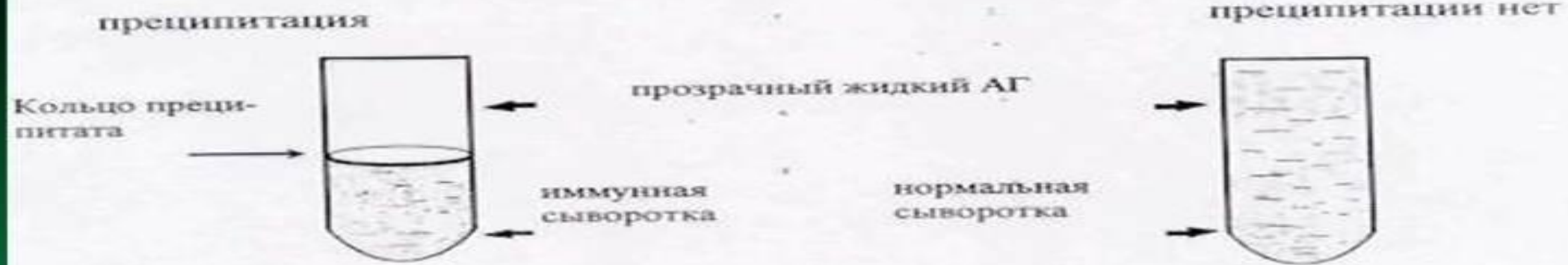
Преципитат

Антитела
иммунной
сыворотки

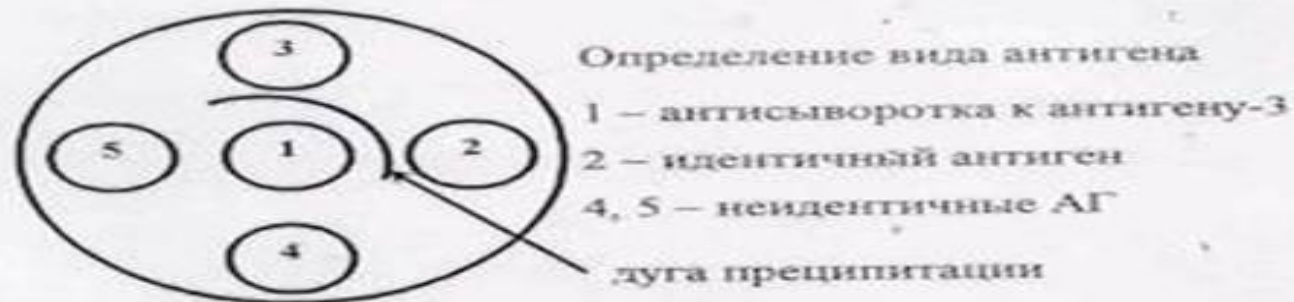


Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони. Эта реакция проводится в агаровом геле. В слое геля равномерной толщины на определенном расстоянии друг от друга вырезают лунки и заполняют их антигеном и иммунной сывороткой соответственно. После этого антигены и антитела диффундируют в гель, встречаются друг с другом и образуют иммунные комплексы, которые преципитируют в геле и становятся видимыми как линии преципитации. Эту реакцию можно использовать для определения неизвестных антигенов или антител, а также для проверки сходства между различными антигенами: если антигены идентичны, линии преципитации сливаются, если антигены неидентичны, линии преципитации пересекаются, если антигены частично идентичны, формируется шпора.

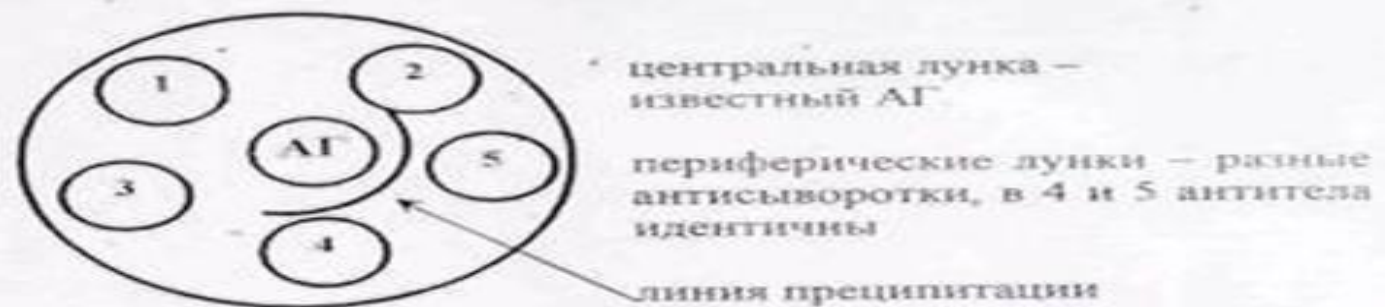
Кольцепреципитация



Метод двойной диффузии по Оухтерлоуни

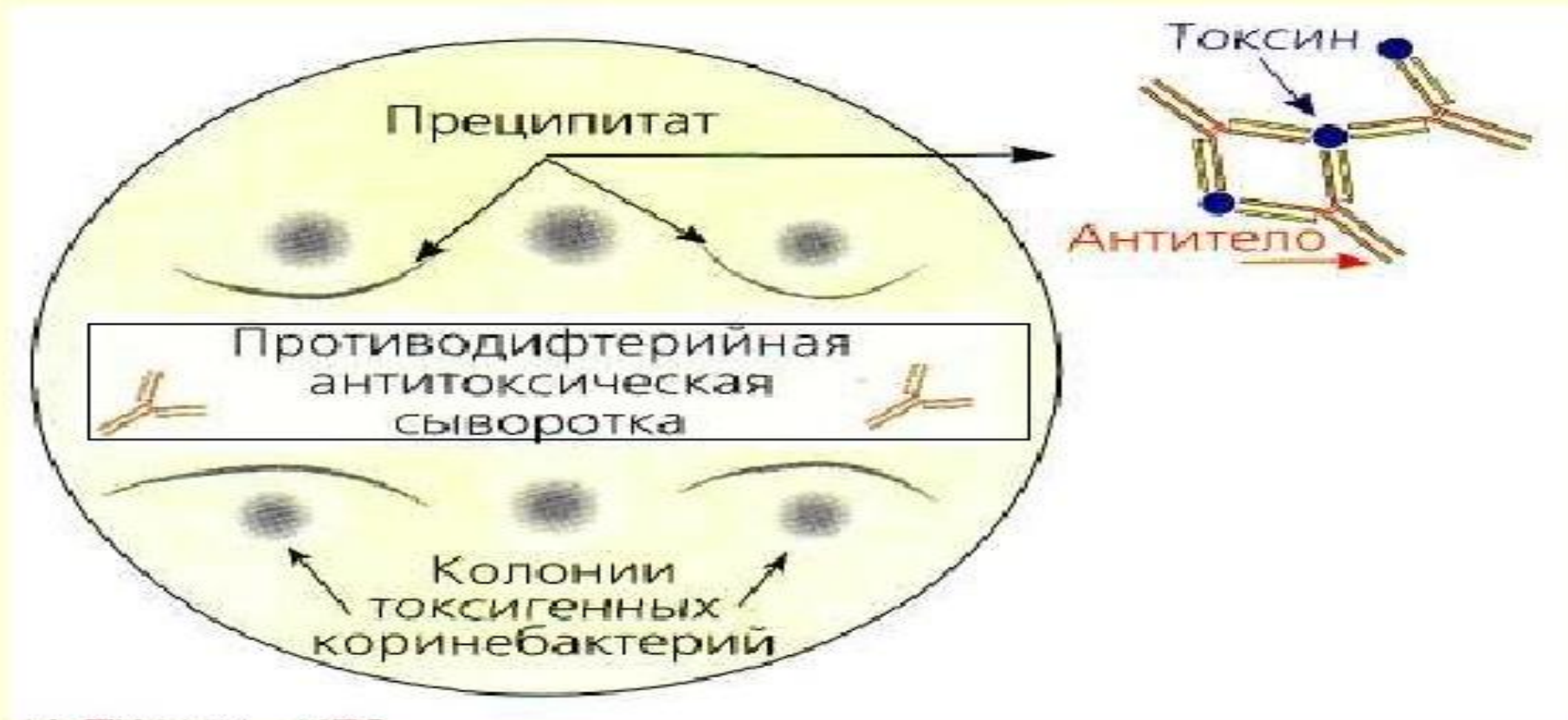


Обнаружение и титрование антител



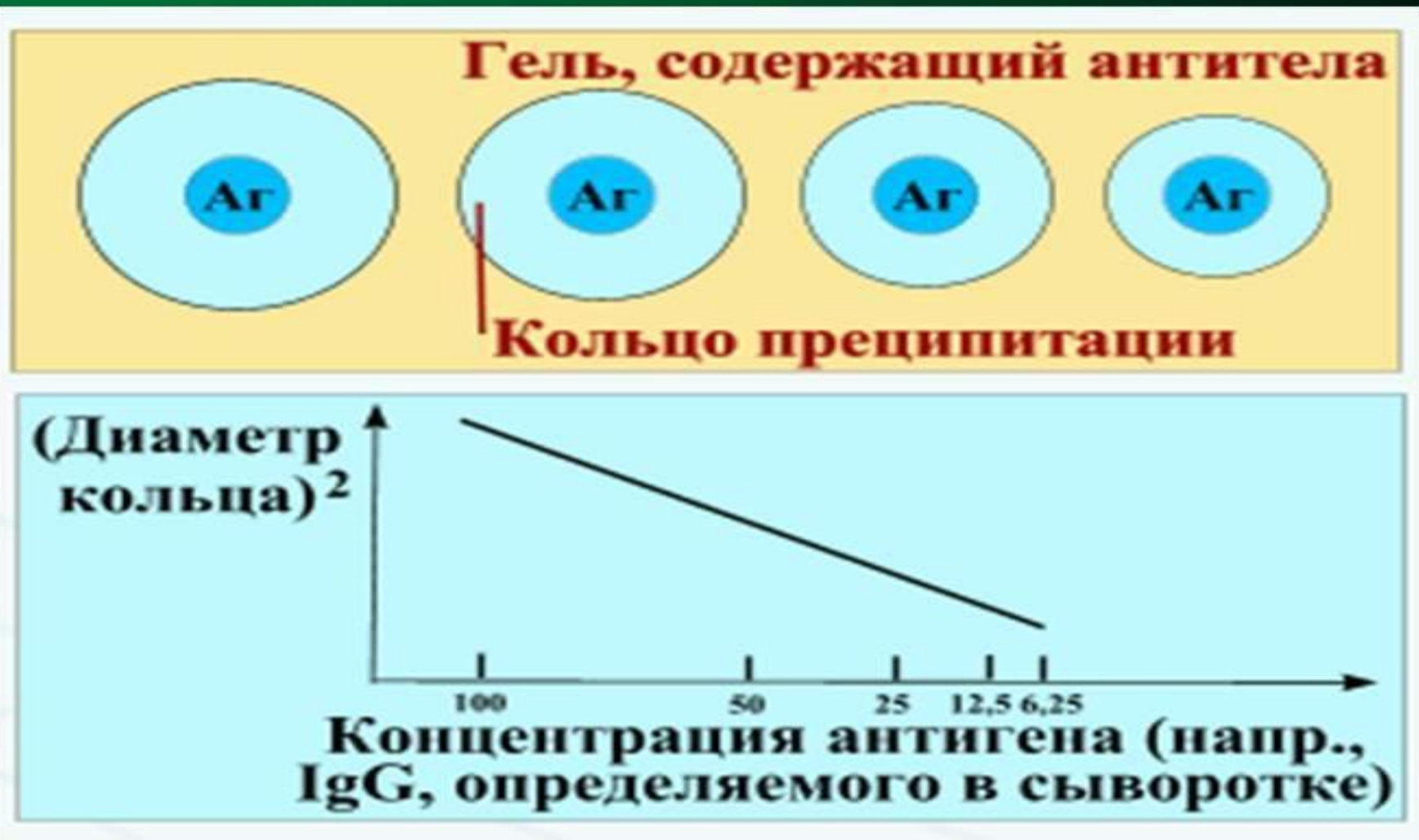
Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони.

Реакция преципитации в агаре.



Реакция радиальной иммунодиффузии. В расплавленный агаровый гель добавляют антитела и наносят гель равномерным слоем на стекло. В геле вырезают лунки и вносят в них стандартный объем различных по концентрации растворов антигена. Во время инкубации антигены радиально диффундируют из лунки и, встретившись с антителами, образуют кольцо преципитации.

Реакция радиальной иммунодиффузии

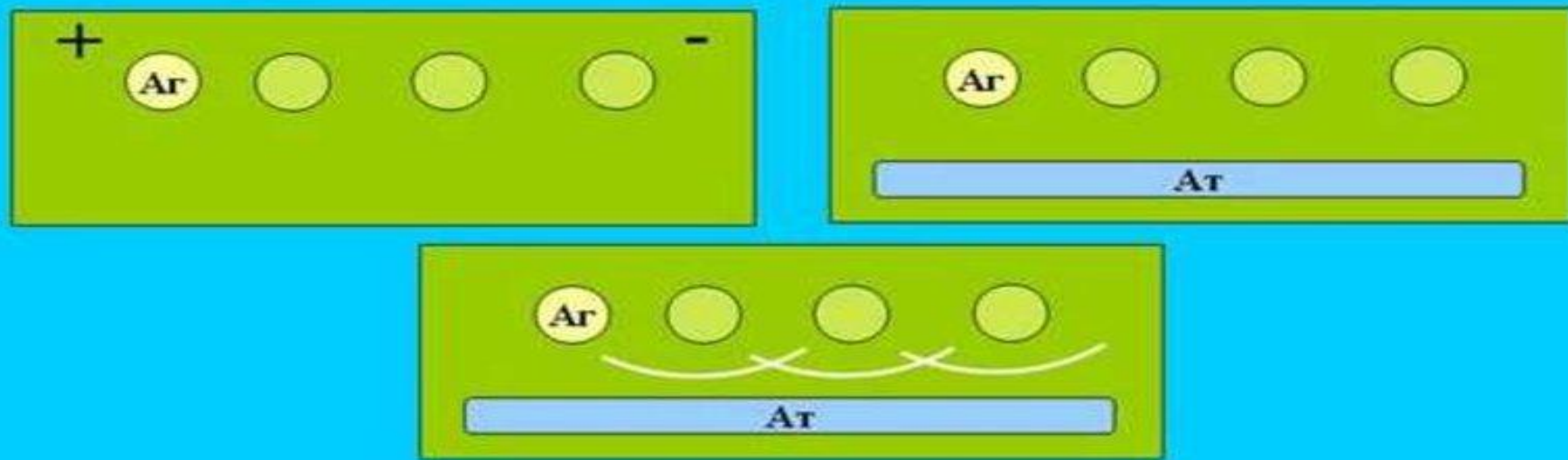


До тех пор пока в лунке сохраняется избыток антигена, происходит постепенное увеличение диаметра кольца преципитации. Этот метод используется для определения антигенов или антител в исследуемом растворе (например для определения концентрации иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови).

Иммуноэлектрофорез. Предварительно электрофоретически разделяют смесь антигенов, затем в канавку, идущую вдоль направления движения белков, вносят преципитирующую антисыворотку. Антигены и антитела диффундируют в гель навстречу друг другу; взаимодействуя, они образуют дугообразные линии преципитации.

Реакция флоккуляции (по Рабину) - разновидность реакции преципитации, которая используется для определения активности антитоксической сыворотки или анатоксина. Реакцию проводят в пробирках. В пробирке, где анатоксин и антитоксин находятся в эквивалентном соотношении, наблюдается помутнение.

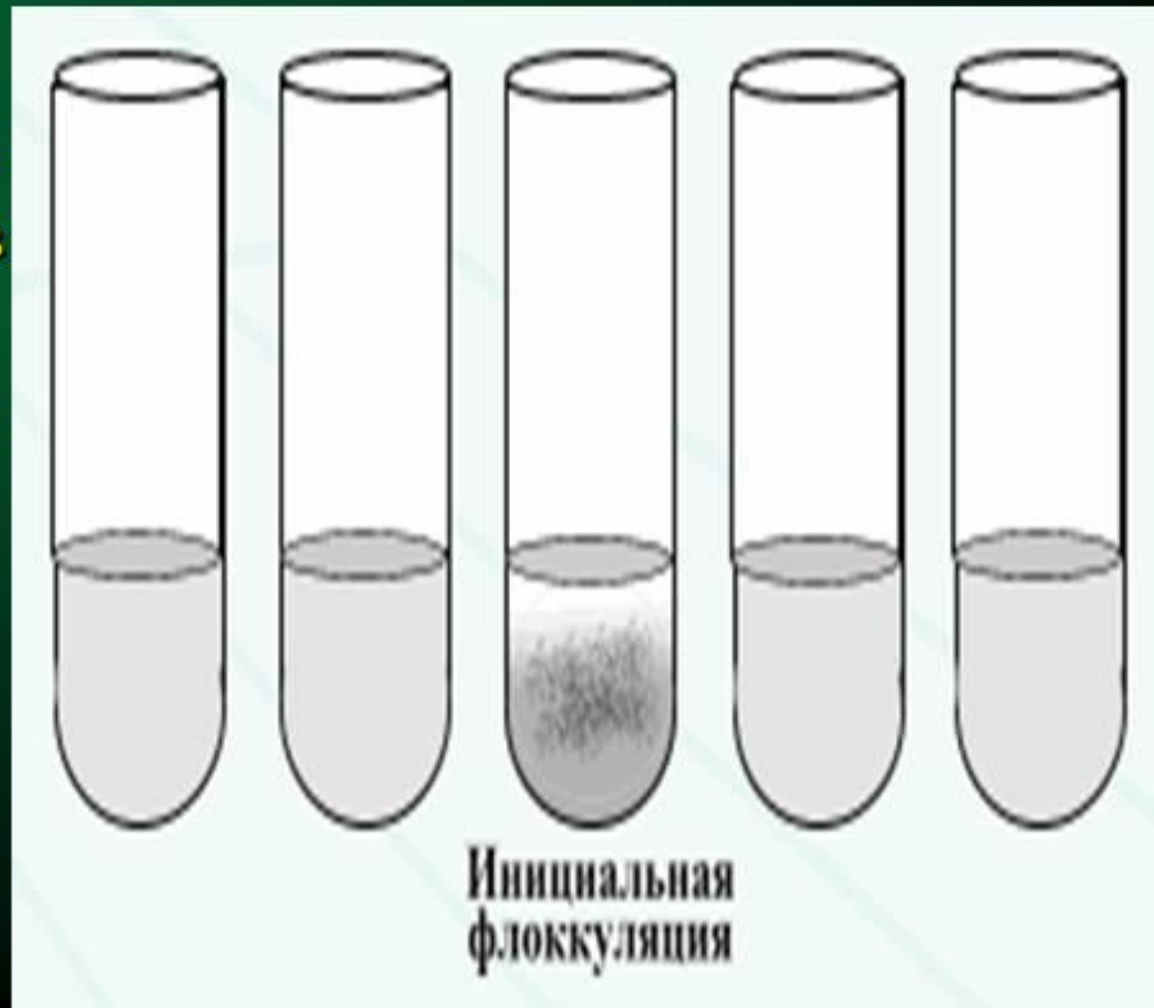
ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ



дуги преципитации.

Реакция флоккуляции (по Рамону)

- **появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммунопреципитации) в пробирке при реакции токсин – антитоксин или анатоксин – антитоксин.**
- **Ее применяют для определения активности антитоксической сыворотки или анатоксина.**



Реакция связывания комплемента

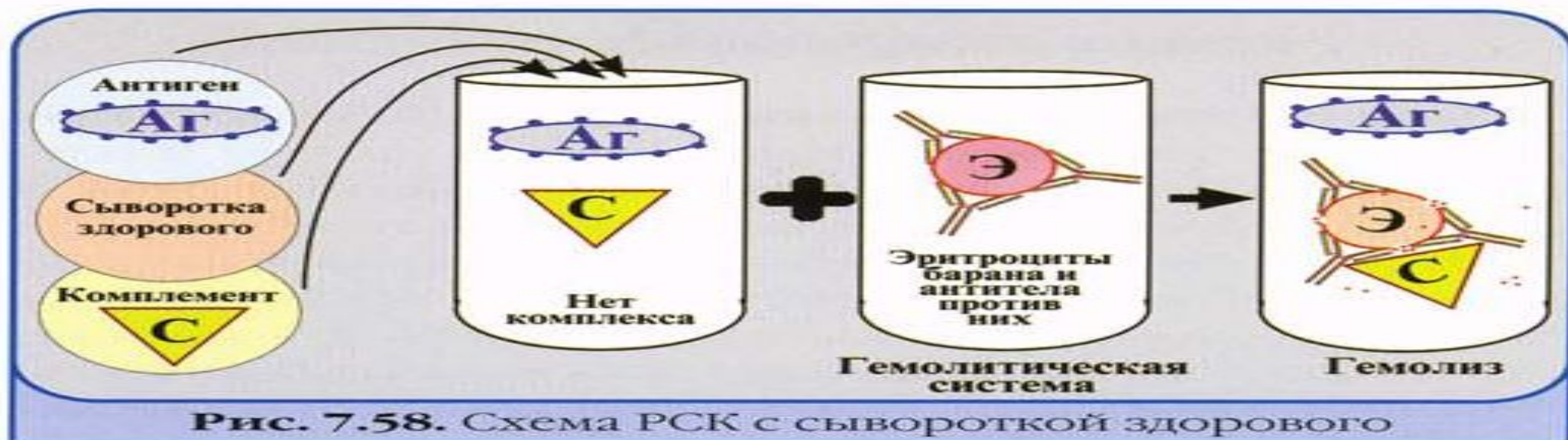
Антитела, взаимодействуя с соответствующим антигеном, связывают добавленный комплемент (1-я система). Индикатором связывания комплемента служат эритроциты, сенсibilизированные гемолитической сывороткой, т.е. антителами к эритроцитам (2-я система). Если комплемент не фиксируется в 1-й системе, т.е. не происходит реакция антиген-антитело, то сенсibilизированные эритроциты полностью лизируются (отрицательная реакция).



РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

- Для диагностики венерических болезней, риккетсиозов, вирусных инфекций.
- Реакция протекает в две фазы.
- **Первая фаза** - взаимодействие антигена и антител при обязательном участии комплемента.
- **Вторая** - выявление результатов реакции при помощи индикаторной гемолитической системы (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка).

При связывании комплемента иммунными комплексами 1-й системы после добавления сенсibilизированных эритроцитов гемолиз отсутствует (положительная реакция). Реакция связывания комплемента используется для диагностики инфекционных болезней (гонорееи, сифилиса, гриппа и др.).



Реакция нейтрализации

Микробы и их токсины оказывают повреждающее действие на органы и ткани организма человека. Антитела способны связываться с этими повреждающими агентами и блокировать их, т.е. нейтрализовать. На этой особенности антител основана диагностическая реакция нейтрализации. Ее проводят путем введения смеси антиген-антитело животным или в чувствительные тест-объекты (культуру клеток, эмбрионы).

Например для обнаружения токсинов в материале больного животным 1-й группы вводят материал больного. Животным 2-й группы вводят аналогичный материал, предварительно обработанный соответствующей антисывороткой. Животные 1-й группы при наличии токсина в материале погибают. Вторая группа животных выживает, повреждающее действие токсина не проявляется, так как происходит его нейтрализация.

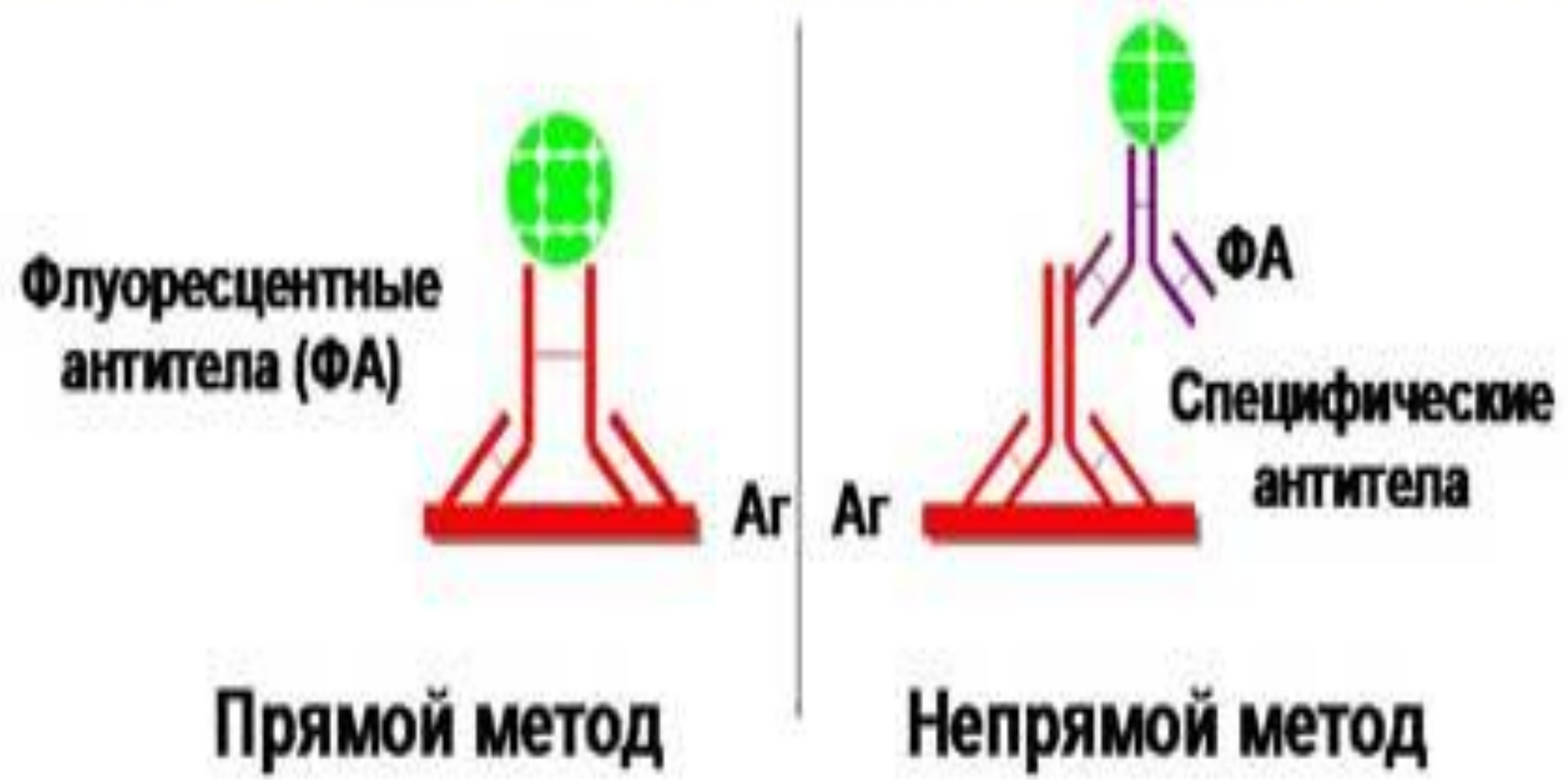
Реакции с использованием меченых антител или антигенов

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ, метод Кунса)

Этот метод используется для экспресс-диагностики. С его помощью можно выявлять как микробные антигены, так и антитела.

Прямой метод РИФ - иммунная реакция взаимодействия антител с антигенами, причем антитела метят флюорохромом - веществом, способным при попадании света определенной длины волны испускать кванты света также

Схема Реакции иммунофлюоресценции (РИФ) (Кунса)



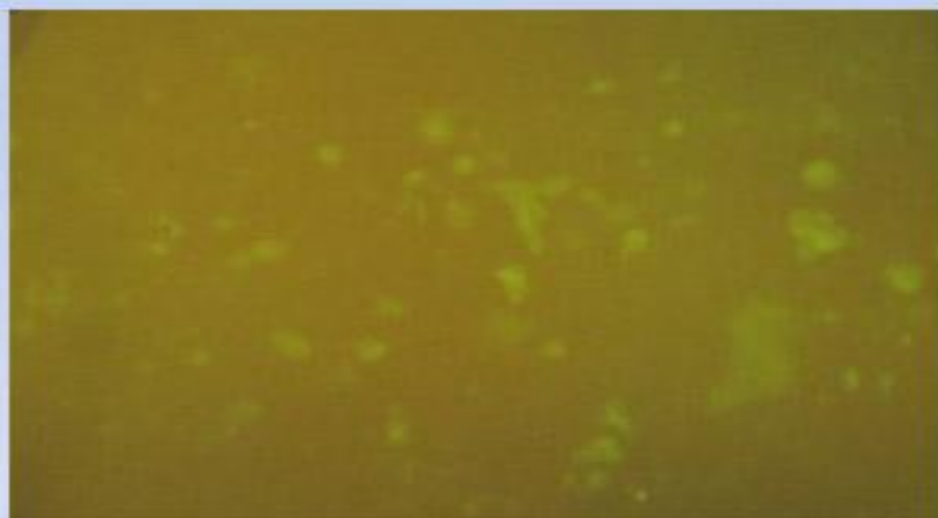
Особенность постановки этого метода заключается в необходимости удаления непрореагировавших компонентов, чтобы исключить выявление неспецифического свечения. Для этого проводят отмывание от непрореагировавших антител. Результаты оценивают с помощью люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся на темном фоне по периферии клетки.

Непрямой метод РИФ используется чаще предыдущего. Эта реакция проводится в два этапа. На первом этапе антигены взаи-

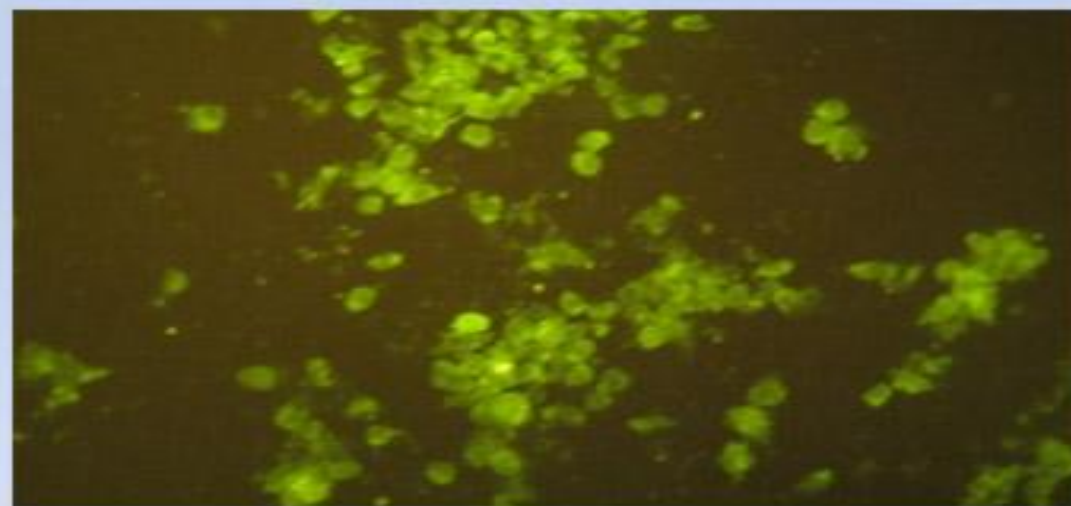
модействуют с соответствующими антителами, образуя иммунные комплексы. Все компоненты, которые не прореагировали (т.е. не в составе иммунных комплексов), должны быть удалены отмыванием. На втором этапе образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляется с помощью флюорохромированной антиглобулиновой сыворотки. В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антитела к иммуноглобулинам кролика, меченные флюорохромом. Результаты оценивают с помощью люминесцентного микроскопа.

метод прямой иммунофлюоресценции (РПИФ)

Легкие

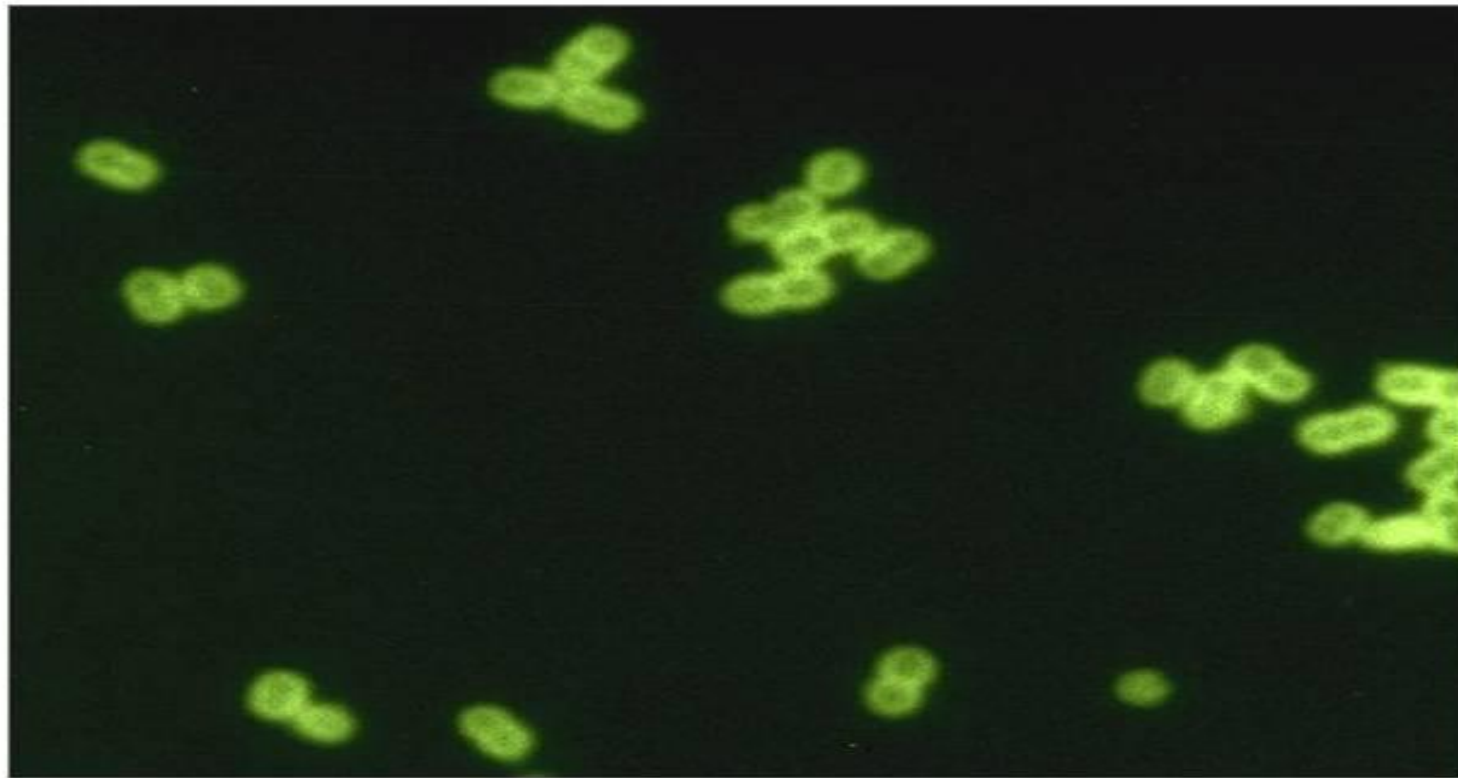


Отрицательный
образец



Положительные
образцы

Иммунофлуоресценция



Streptococcus pneumoniae

Иммуноферментный метод или анализ

ИФА - наиболее распространенный современный метод, используемый для диагностики вирусных, бактериальных, протозойных инфекций, в частности для диагностики ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов и др.

Модификаций ИФА очень много. Широко используется твердофазный неконкурентный вариант ИФА. Его проводят в 96-луночных полистироловых планшетах (твердая фаза). При проведении реакции необходимо на каждом этапе отмывать непрореагировавшие компоненты.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Содержание набора

(Содержит 100 шт.)

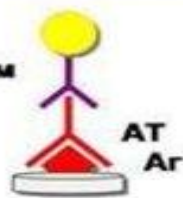


Иммуноферментный анализ

Общая схема

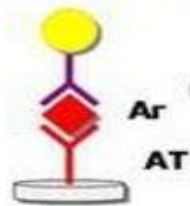
Иммуноферментный анализ (ИФА)

Антитела к АТ,
меченные ферментом



Выявление антител

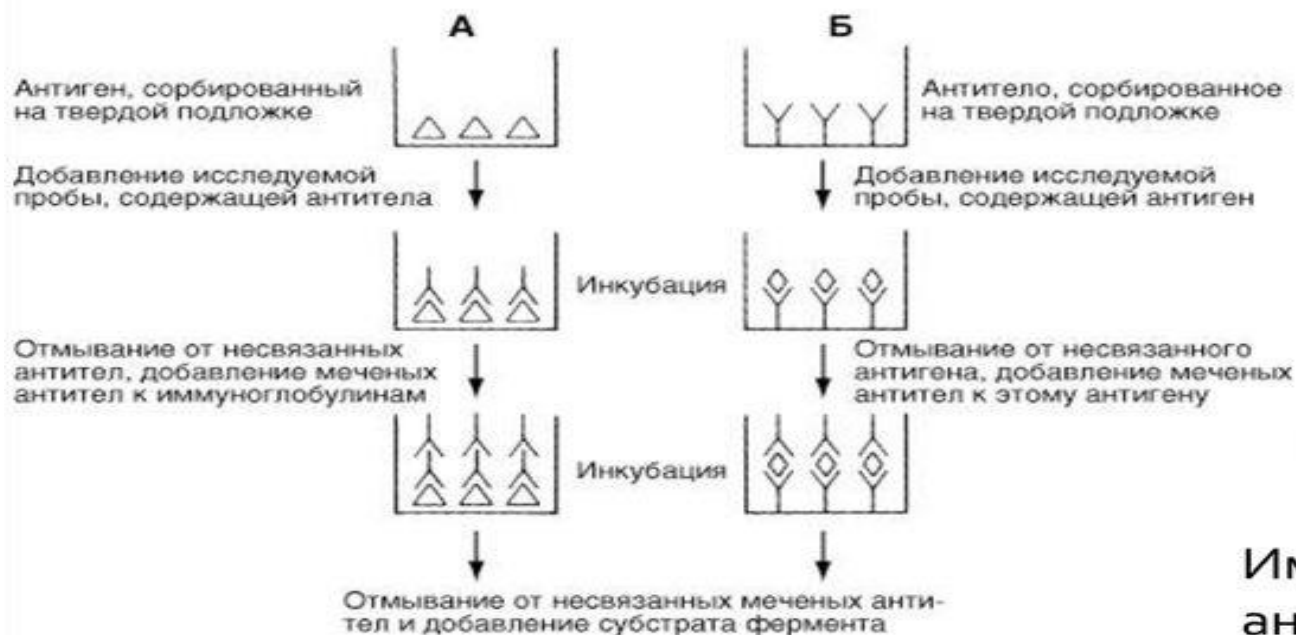
Антитела к Аг,
меченные ферментом



Выявление антигена



Анализатор иммуноферментный
полуавтоматический



Иммуноферментный автоматический
анализатор

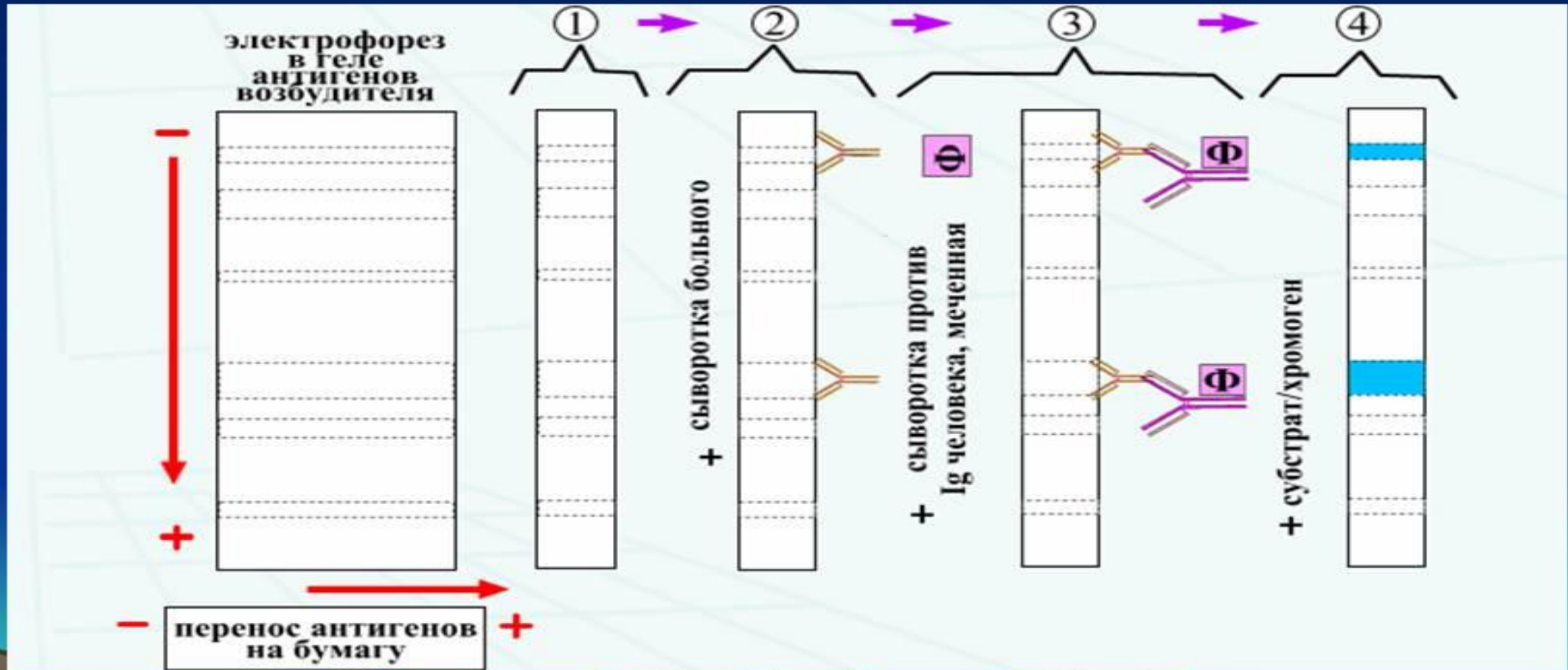
При определении антител в лунки, на которых сорбированы антигены, вносят исследуемую сыворотку крови, затем антиглобулиновую сыворотку, меченную ферментом. Проявляют реакцию, добавляя субстрат для фермента. В присутствии фермента субстрат изменяется, причем ферментсубстратный комплекс подбирают таким образом, чтобы образующийся в реакции продукт был цветным.

Таким образом, при положительной реакции наблюдается изменение цвета раствора. Для определения антигенов твердофазный носитель сенсibiliзируется антителами, затем последовательно вносятся исследуемый материал (антигены) и сыворотка к антигенам, меченная ферментом. Для проявления реакции вносят субстрат для фермента. Изменение цвета раствора происходит при положительной реакции.

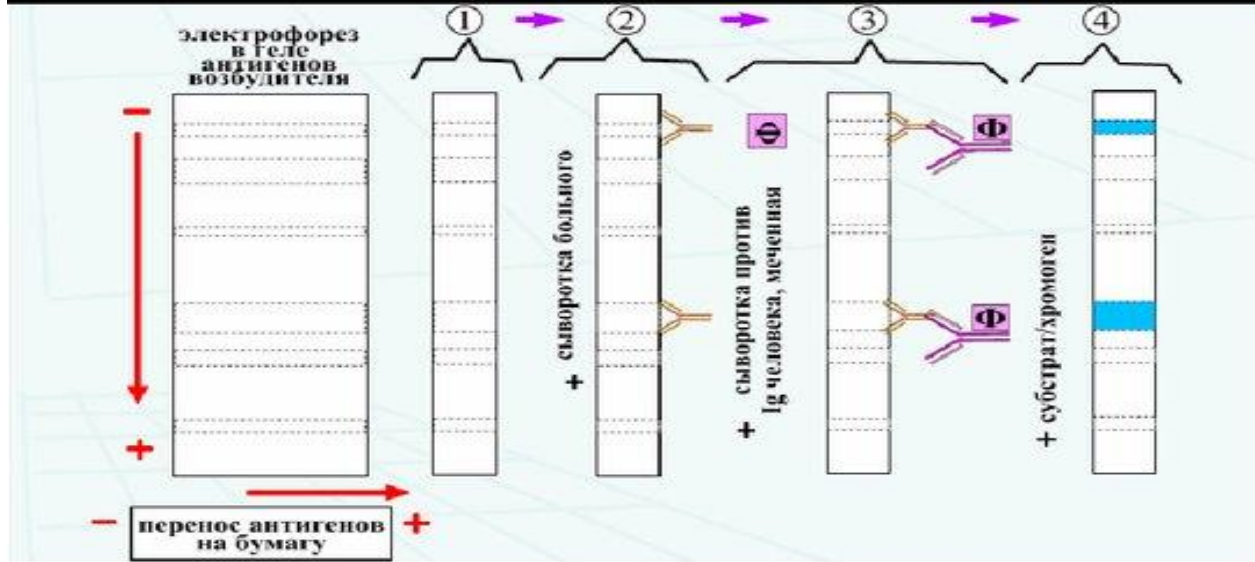
Иммуноблоттинг

Этот метод основан на сочетании электрофореза и ИФА. При проведении иммуноблоттинга (блоттинг от англ. *blot* - пятно) сложную смесь антигенов вначале подвергают электрофорезу в полиакриламидном геле. Полученные фракционированные антигенные пептиды переносят на нитроцеллюлозную мембрану. Затем блоты обрабатывают антителами к специфическому антигену, мечеными ферментом, т.е. проводят ИФА блота. Иммуноблоттинг используют в диагностике инфекций, например ВИЧ.

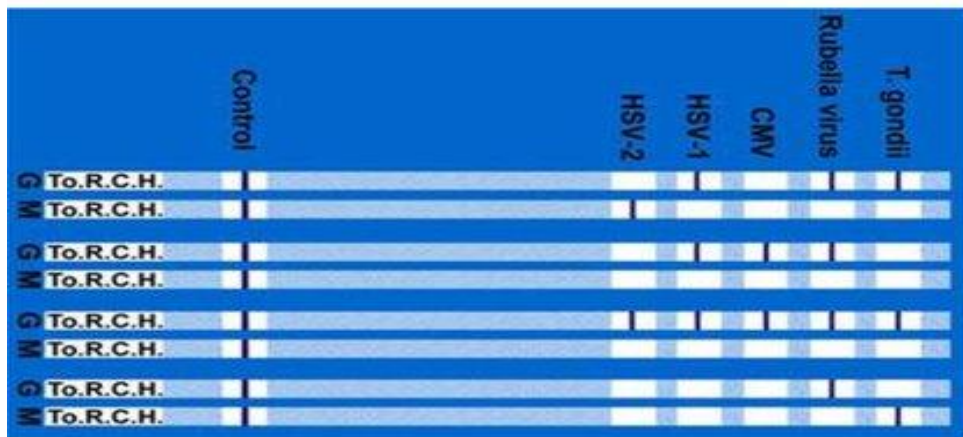
Иммуноблоттинг



Иммуноблоттинг



- ❑ Антигены возбудителя разделяют с помощью **электрофореза** в полиакриламидном геле,
- ❑ затем переносят их (блоттинг - от англ, blot, пятно) из геля на активированную бумагу (1) или нитроцеллюлозную мембрану
- ❑ и проявляют с помощью **ИФА**.
- ❑ Фирмы выпускают такие полоски с "блота́ми" антигенов. На эти полоски (стрипы) наносят сыворотку больного (2). Затем, после инкубации, отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом (3).
- ❑ Образовавшийся на полоске комплекс [антиген + антитело больного + антитело против Ig человека] выявляют добавлением хромогенного субстрата (4), изменяющего окраску под действием фермента.



Пример: Лайн-блот для диагностики TORCH-инфекций (Токсоплазмоз, Краснуха, Цитомегаловирус, ВПГ 1 и ВПГ 2)

Иммунная электронная микроскопия

Метод заключается в микроскопировании в электронном микроскопе вирусов (реже других микробов), предварительно обработанных соответствующей иммунной сывороткой, меченной электроннооптически-плотными препаратами, например ферритином - железосодержащим белком.

АКТИВИРОВАННЫЕ МАКРОФАГИ



При активации макрофаги
увеличиваются и
«взъерошиваются».
Сканирующая электронная

Проточная цитометрия

Клетки крови дифференцируют на основе лазерной цитофлуорометрии. Для этого искомые клетки окрашивают флуоресцирующими моноклональными антителами к CD-антигенам. Образец крови после обработки мечеными антителами пропускают через тонкую трубку и через него пропускают лазерный луч, который возбуждает свечение флуорохрома.

Проточная цитометрия

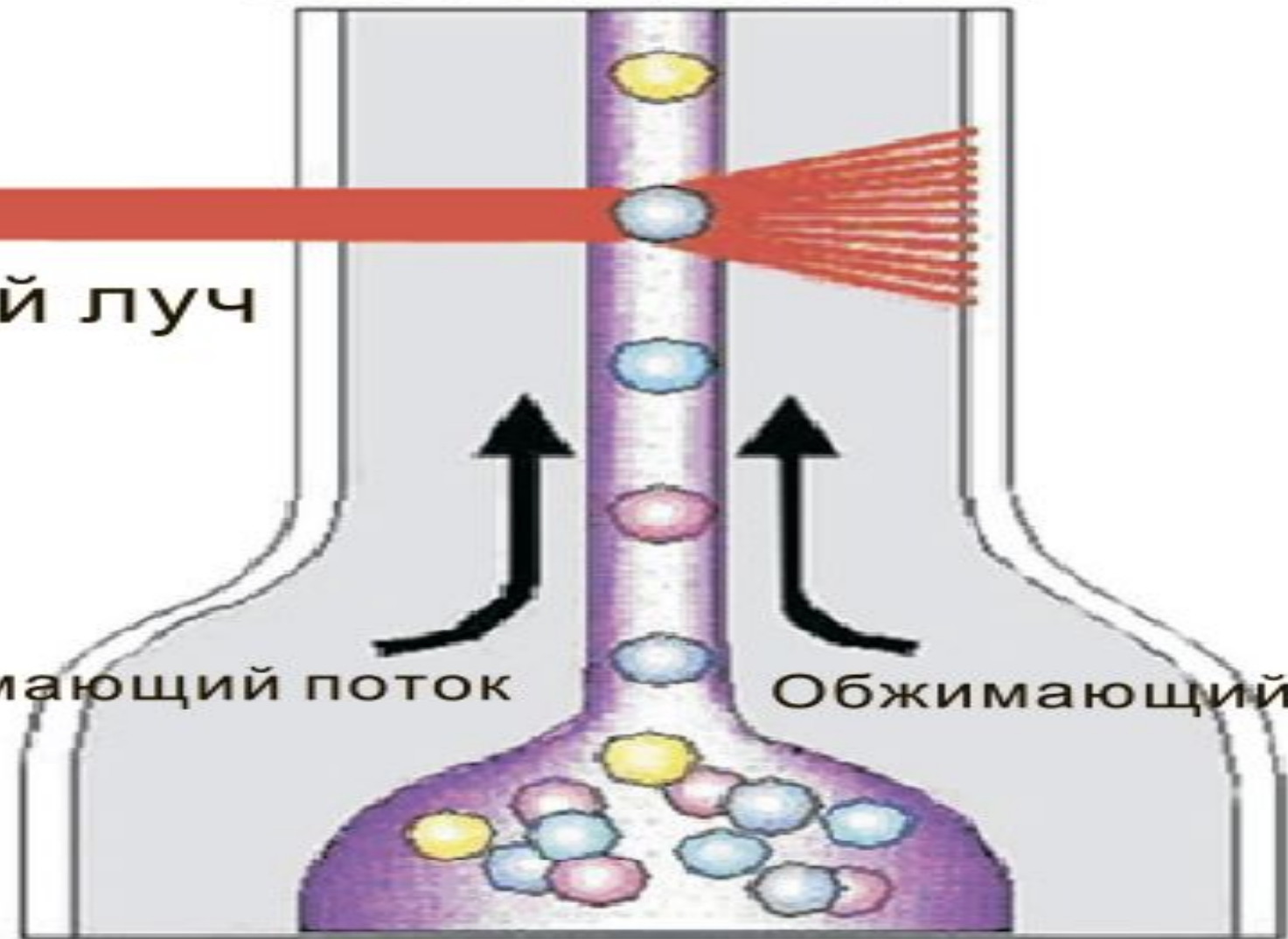
Flow Cytometer



Поток клеток



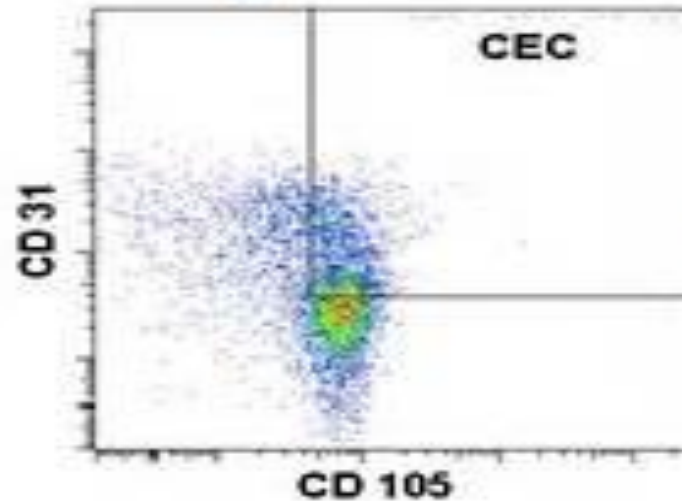
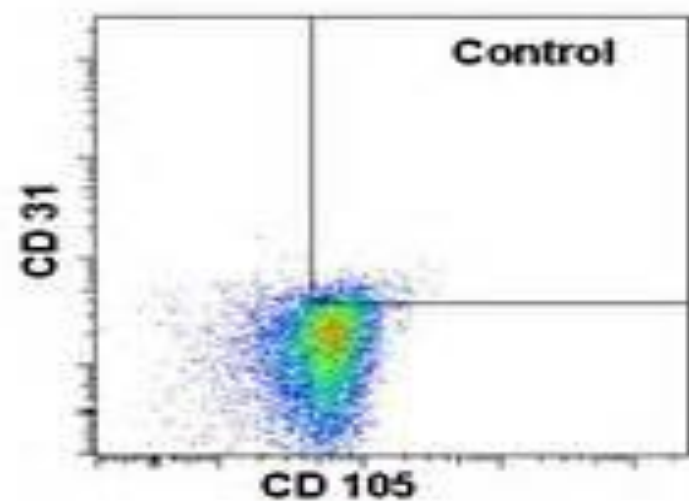
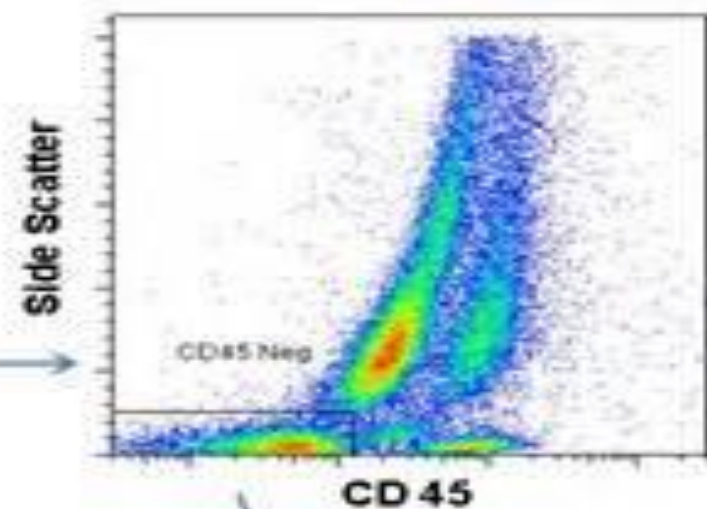
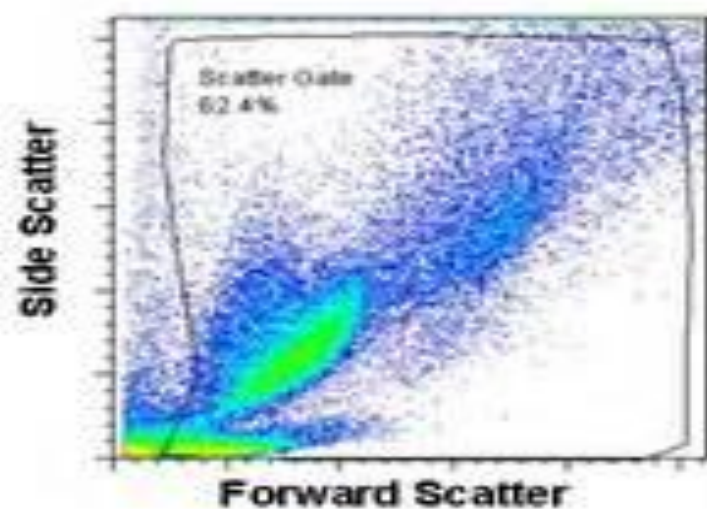
Лазерный луч



Обжимающий поток

Обжимающий поток

Образец



- VEGFR-2
 - pVEGFR-2
- PDGFR β
 - pPDGFR β
- *Your Target or Biomarker*

Интенсивность флюоресценции коррелирует с плотностью антигенов на поверхности клеток и может быть количественно измерена с помощью фотоумножителя. Полученные результаты преобразуются в гистограмму.

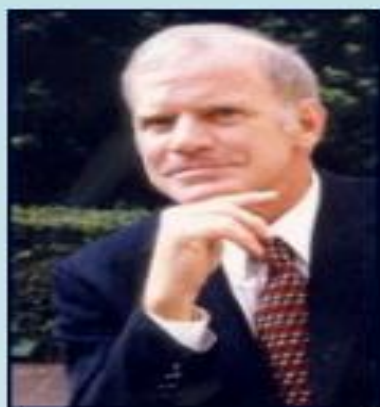
Проточную цитометрию применяют для определения иммунного статуса (содержание основных популяций лимфоцитов, содержание внутриклеточных и внеклеточных цитокинов, функциональная активность НК-клеток, активность фагоцитоза и др.).

Полимеразная цепная реакция

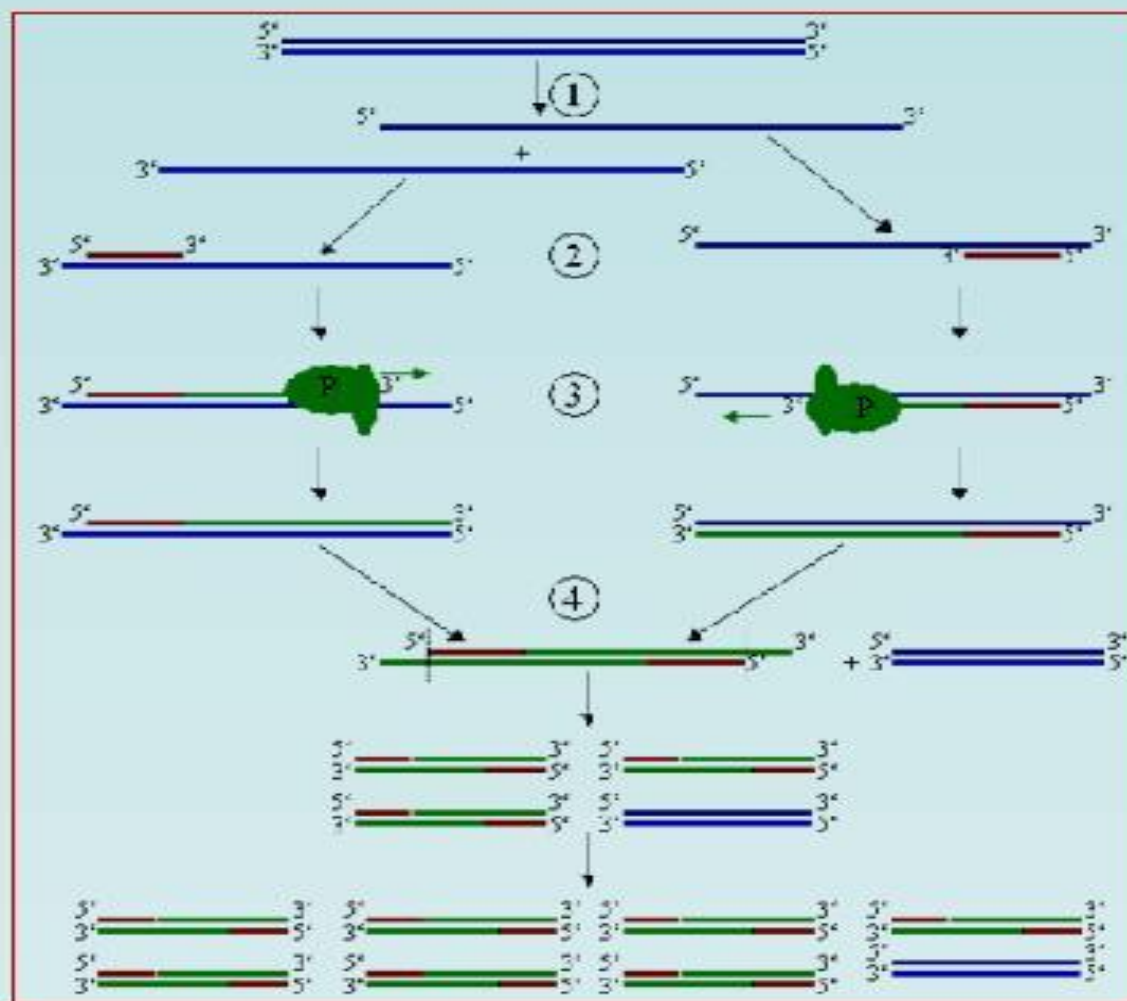
- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК) в биологическом материале (пробе).



Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - диагностика заболеваний (наследственных, инфекционных), малых количеств ДНК, установление отцовства (Кари Муллис 1983)

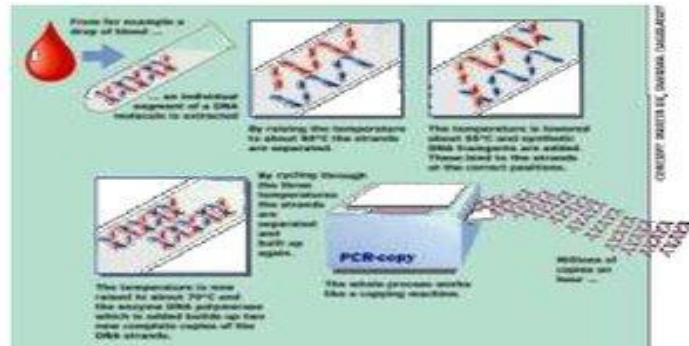


In vitro (в амплификаторе) происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

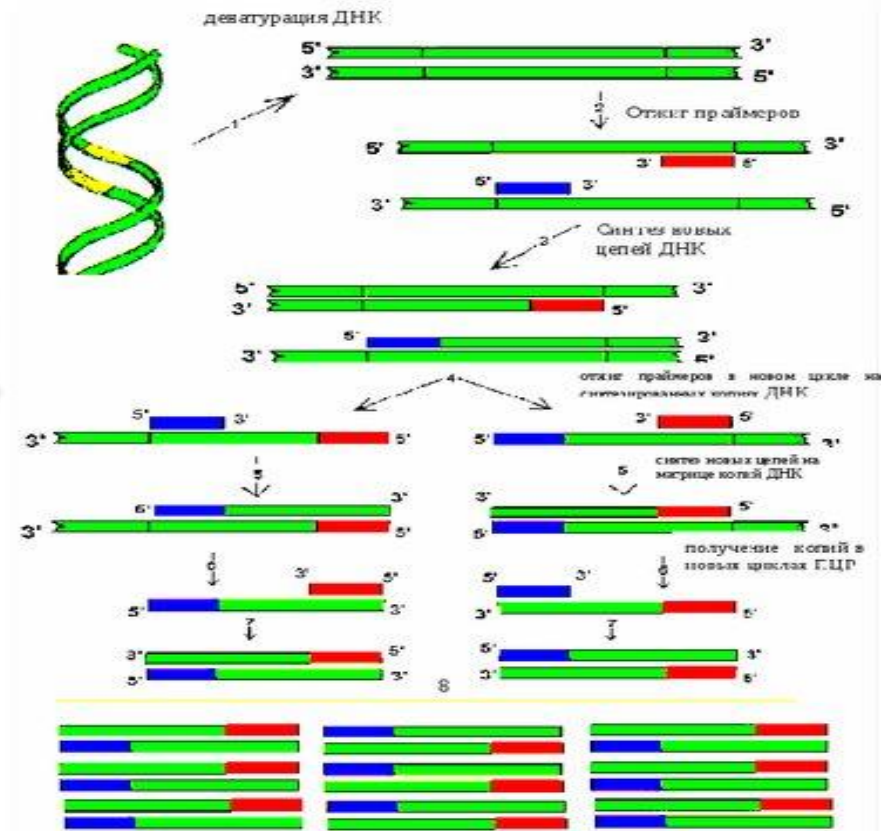


Полимеразная цепная реакция

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была открыта в 1983 году американским биохимиком К. Муллисом.
- Амплификация ДНК в ходе многократных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента **ДНК-полимеразы**.



Лекция "О геномах" СФУ Дейч К.О.



1 – денатурация двухцепных ДНК; 2 – отжиг праймеров; 3 – синтез новых цепей на основе первоначальной матрицы ДНК; 4 – отжиг праймеров на синтезированной копии в новом цикле; 5 – синтез новых цепей на матрице синтезированной копии ДНК; 6, 7 – в новом цикле отжиг праймеров и синтез копий на матрице полученных фрагментов ДНК; 8 – полученные копии.

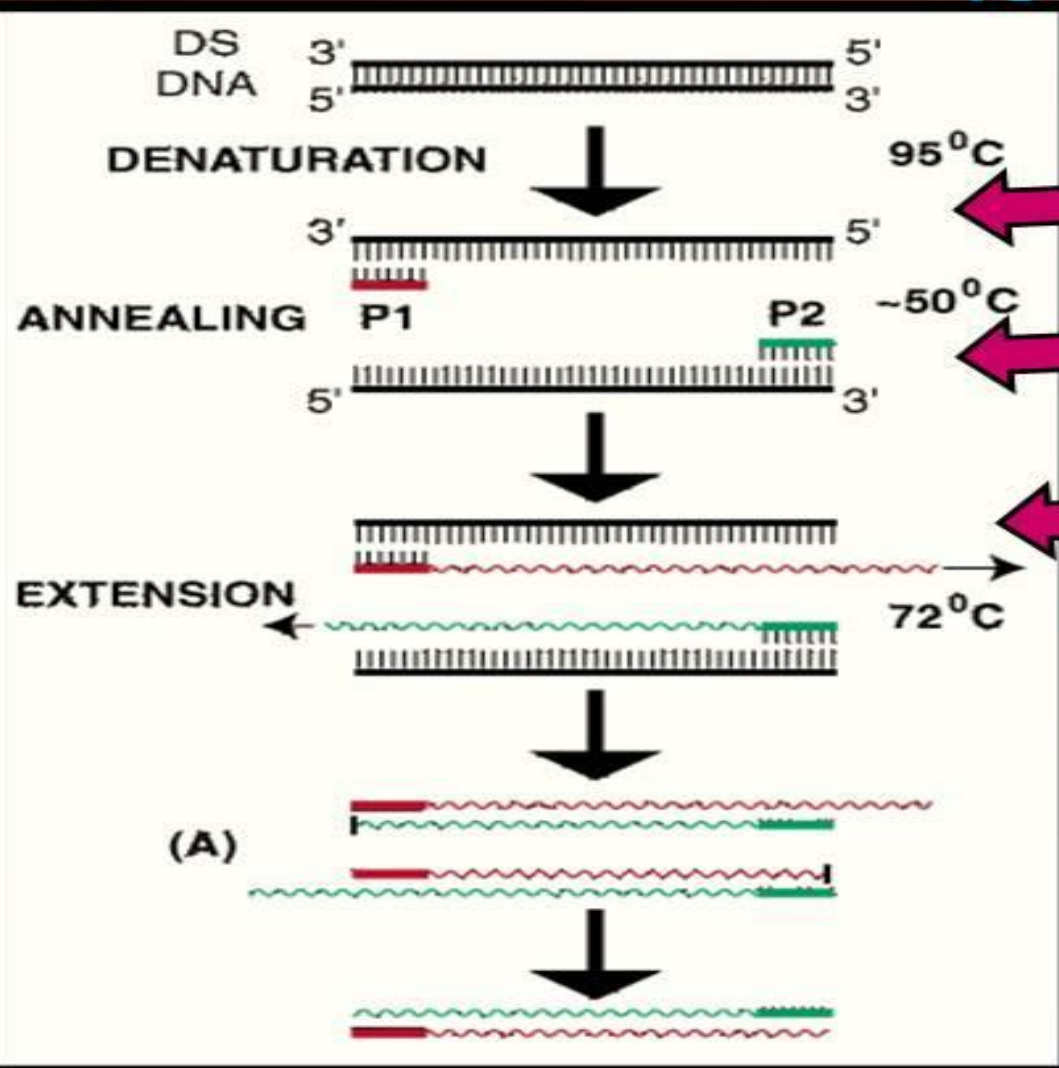
Диагностика методом ПЦР позволяет использовать для анализа различный биологический материал:

- кровь, плазма, сыворотка;
- биологические жидкости (сок простаты, плевральная, спинномозговая, околоплодная, суставная жидкость, бронхоальвеолярный лаваж, слюна);
- моча;
- мокрота;
- биоптаты (желудка и двенадцатиперстной кишки);
- соскоб эпителиальных клеток.



Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Вспоминаем репликацию ДНК!



1. Термическая денатурация
двухцепочечной ДНК

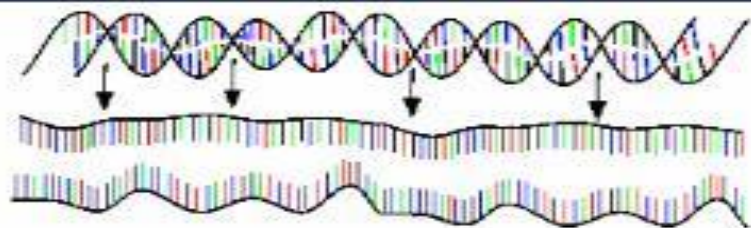
2. Отжиг (гибридизация) праймеров

3. Синтез ДНК (удлинение цепи)
по матрице одноцепочечной
исходной ДНК

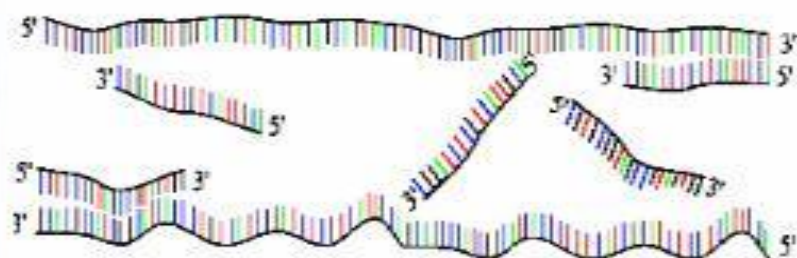
Необходимы 2 праймера, фланкирующие
нужный участок ДНК.

Принцип ПЦР

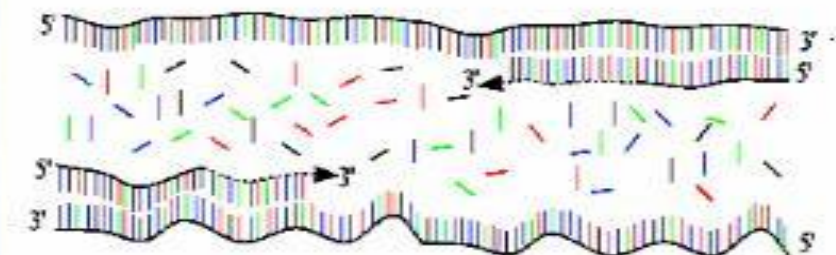
ФРАГМЕНТ ДНК



Этап 1: Денатурация
1 минута 94°C



Этап 2: Отжиг праймеров
45 секунд 54°C



Этап 3: Синтез цепи ДНК

*Метод классической ПЦР заключается в синтезе *in vitro* коротких нуклеотидных последовательностей для последующего анализа.
*Для проведения ПЦР нужны пара праймеров, комплементарных исследуемому фрагменту, и фермент ДНК-полимераза.
*В определенных условиях праймеры способны распознавать гомологичные последовательности в денатурированной ДНК, связываться с ними и служить затравкой для ферментативного синтеза копий участка изучаемого гена.
*Каждый цикл синтеза удваивает число копий фрагмента-мишени и количество продукта (амплификата) в процессе ПЦР нарастает в геометрической прогрессии.

ПЦР - диагностика 21 века



Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - основа современной диагностической технологии, при которой проводится генетическое распознавание микроорганизмов и вирусов, а также человека. Диагностика проста для пациента - необходимо небольшое количество крови или другого биологического материала.

Преимущества метода ПЦР:

- ✓ прямое определение возбудителя в пробе,
- ✓ высокая специфичность,
- ✓ высокая чувствительность,
- ✓ возможность диагностики возбудителей, не выявляемых другими методами

Надежная диагностика:

- ✓ вирусных гепатитов В,С, D
- ✓ герпетической инфекции, заболеваний, передающихся половым путем,
- ✓ онковирусов
- ✓ наследственных заболеваний
- ✓ урогенитального туберкулеза

Возможность выявить:

- ✓ маркеры онкологических заболеваний (рака яичников, рака молочной железы, рака желудка, саркомы, меланомы, рака простаты)
- ✓ резистентность к инсулину, глюкокортикоидам

высокая чувствительность

простота для пациента



ПЦР-лаборатории МСЧ 2 -
10 лет!



уникальные возможности

высокая специфичность

Уникальная возможность:

- ✓ подобрать оптимальные дозы лекарств длительного приема (аспирин, варфарин, клопидогрель, статины, омега-3 жирные кислоты, контрацептивы);
- ✓ исключить возникновение осложнений и побочных эффектов от приема этих лекарств

Метод позволяет провести:

- ✓ оценку индивидуального риска развития заболеваний
- ✓ оценку индивидуальной предрасположенности к инфекционным заболеваниям
- ✓ определение индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам
- ✓ грамотное планирование семьи

Выявление повышенного риска:

- ✓ инфаркта миокарда и
- ✓ кардиоваскулярных осложнений;
- ✓ венозных тромбозов,
- ✓ болезни Крона,
- ✓ алкогольной зависимости,
- ✓ метаболической ретинопатии,
- ✓ сахарного диабета и других болезней

Вы заинтересовались?

Обращайтесь к своему лечащему врачу, либо по телефону лаборатории 995-12-96 с 9 до 17 часов в будние дни. Подробнее - на сайте ММБУ МСЧ №2:

msc-2.ru

