

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии ОмГМУ

ТЕМНИКОВА НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА
К.М.Н., ДОЦЕНТ

ЛЕКЦИЯ

Серологические реакции

Основные вопросы

- Реакция агглютинации
- Реакция преципитации
- Реакции нейтрализации
- Реакция связывания комплемента
- Реакция иммунофлюоресценции Иммуноферментный метод (ИФ)
- ПЦР
- Иммунный блоттинг
- Реакция торможения гемагглютинации

•2018



Серологические реакции

- Реакция агглютинации
- Реакция преципитации
- Реакции нейтрализации
- Реакция связывания комплемента
- Реакция иммунофлюоресценции
Иммуноферментный метод (ИФА)
- ПЦР
- Иммунный блоттинг
- Реакция торможения гемагглютинации

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ, СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (лат. serum сыворотка + logos учение) –

- методы изучения **определенных антител** в сыворотке крови больных,
 - выявления **антигенов микроорганизмов или тканей** с целью их идентификации,
- основанные на реакциях иммунитета.

Серологические реакции – это реакции между антигенами и антителами in vitro

Цели применения:

- *серодиагностика* (определение АТ) при бактериальных и вирусных инфекционных заболеваниях по известным антигенам;
- *сероидентификация* выделенных культур различных микроорганизмов (определение родовой, видовой и типовой принадлежности микроорганизма или его антигенов с известными иммунными сыворотками);

Классификация серологических реакций в зависимости от характера и физического состояния антигена

- **Прямые серологические реакции**, основанные на прямом взаимодействии антигена с антителом (агглютинация, преципитация).
- **Опосредованные реакции** – реакции со индикаторными системами (реакция связывания комплемента).
- **Реакции с использованием меток-иммуносенсорные** (ферментных, флюоресцирующих и т.д.) для антигена или антитела (иммуноферментный анализ, реакция иммунофлюоресценции, радиоиммунный анализ).

Основные понятия

- **Титр сыворотки** – это наиболее высокое разведение сыворотки (то *наименьшее количество антител*), при котором данная серологическая реакция будет положительной.
- По природе антитела могут быть: **инфекционные, прививочные, анамнестические.**
- **Парные сыворотки**– это две сыворотки, взятые у больного с интервалом в 5-10 дней. Титр инфекционных антител в парных сыворотках возрастает в 4 раза и более, что подтверждает клинический диагноз заболевания.
- Титр анамнестических и прививочных антител в парных сыворотках не меняется или меняется незначительно.
- **Для обнаружения антител** необходимы *известные антигены*.
Диагностические препараты, содержащие антитела и используемые для серологической диагностики, называются **диагностикумы**.
- Диагностикумы могут содержать взвесь убитых микробов, отдельные антигены микробов, эритроциты с нагруженным на их поверхность антигеном (эритроцитарные диагностикумы)
- **Специфичность серологической реакции** – способность антигена реагировать только с гомологичным антителом.
- **Чувствительность серологической реакции** - минимальное количество антигенов или антител, которое можно выявить с помощью данной реакции.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

- При определении **антигена** - минимальная концентрация вещества, определяемая данной тест-системой.
- При определении **антител** – процент образцов, давших положительный результат в данной тест-системе, от общего количества обследованных образцов, содержащих выявляемые антитела.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Процент образцов, давших отрицательный результат в данной тест-системе, от общего количества обследованных образцов, действительно не содержащих выявляемый маркер.

Серологические реакции

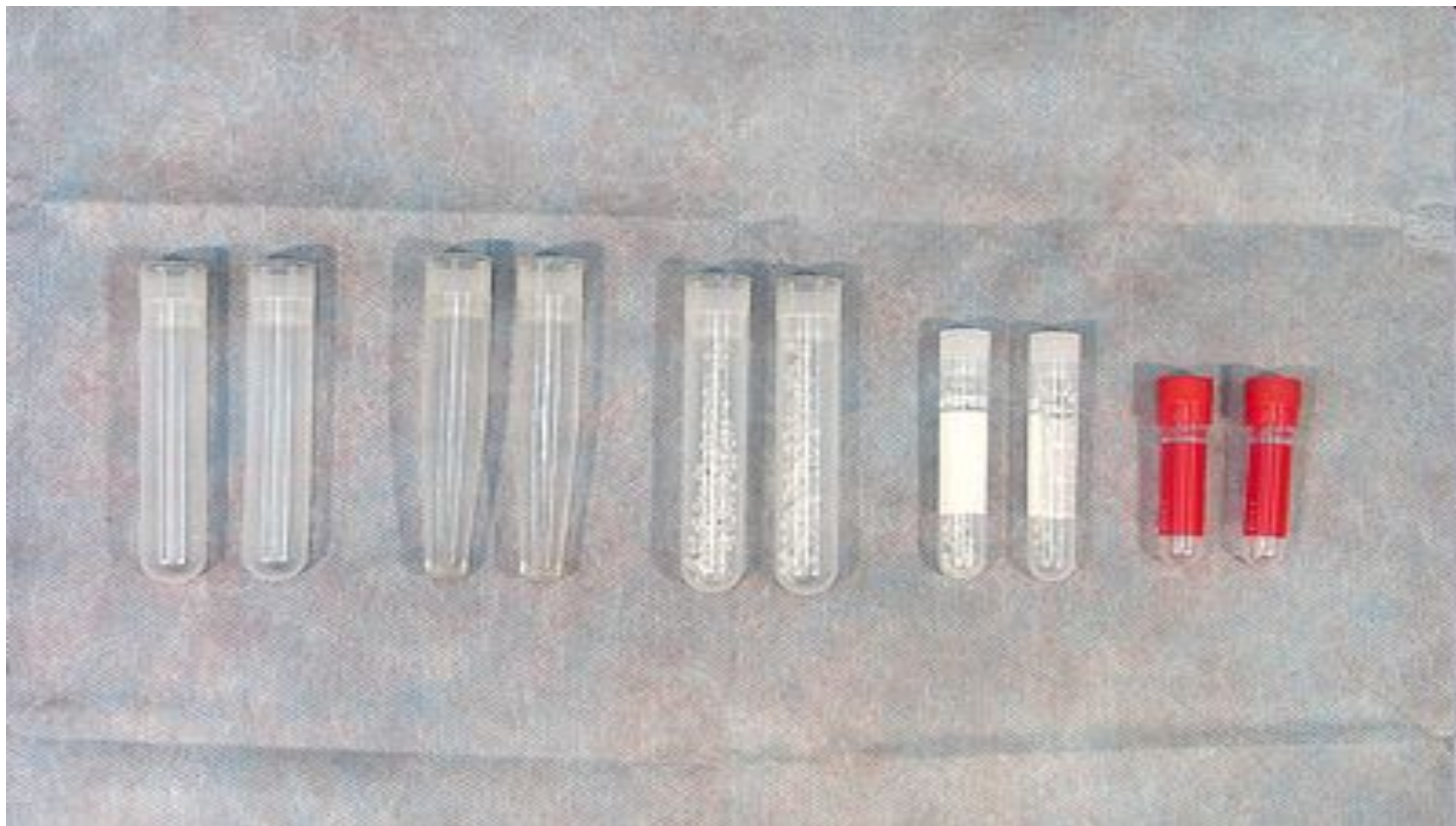
- Реакция агглютинации
- Реакция преципитации
- Реакции нейтрализации
- Реакция связывания комплемента
- Реакция иммунофлюоресценции
Иммуноферментный метод (ИФА)
- ПЦР
- Иммунный блоттинг
- Реакция торможения гемагглютинации

Компоненты реакций

Сыворотка крови



Пробирки - контейнеры для получения сыворотки крови



Сыворотка больного

Необходим ряд последовательных разведений, чаще всего от 1 : 50—1 : 100 до 1 : 1600— 1:3200.

Основной - раствор сыворотки используют для приготовления ряда последовательных разведений.

Диагностические препараты, содержащие антитела и используемые для серологической диагностики, называются **диагностикумы**.

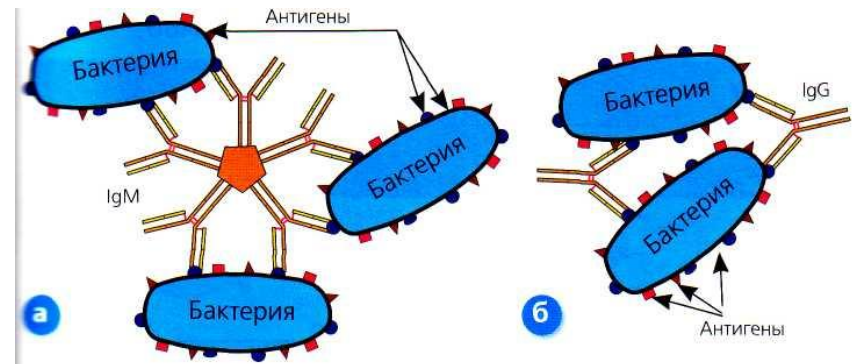
- *для приготовления диагностикумов подбираются штаммы микроорганизмов с высокой чувствительностью к антителам и способностью длительно сохранять антигенные свойства и быть безопасными для человека (инактивирование).*
- Для инактивации микроорганизмов при приготовлении диагностикумов чаще всего используются химические вещества, особенно формалин, являющийся лучшим консервантом.
- Убитые нагреванием микробы хуже сохраняют антигенные свойства и применяются редко.
- **Бактериальные диагностикумы** могут содержать инактивированную микробную взвесь или отдельные антигенные компоненты бактерий: О, Н или Vi-антигены и используются в реакциях агглютинации.
- **Эритроцитарные диагностикумы** представляют собой эритроциты (обработанные танином или формалином) с адсорбированными на них антигенами, извлеченными из бактерий, и применяются в РНГА
- **Вирусные диагностикумы** — препараты, содержащие инактивированные вируссодержащие жидкости (культуральные, из куриных эмбрионов или организма животных, зараженных соответствующим вирусом), применяются в РСК (реакции связывания комплемента), реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции нейтрализации.

Реакция агглютинации

Реакция агглютинации

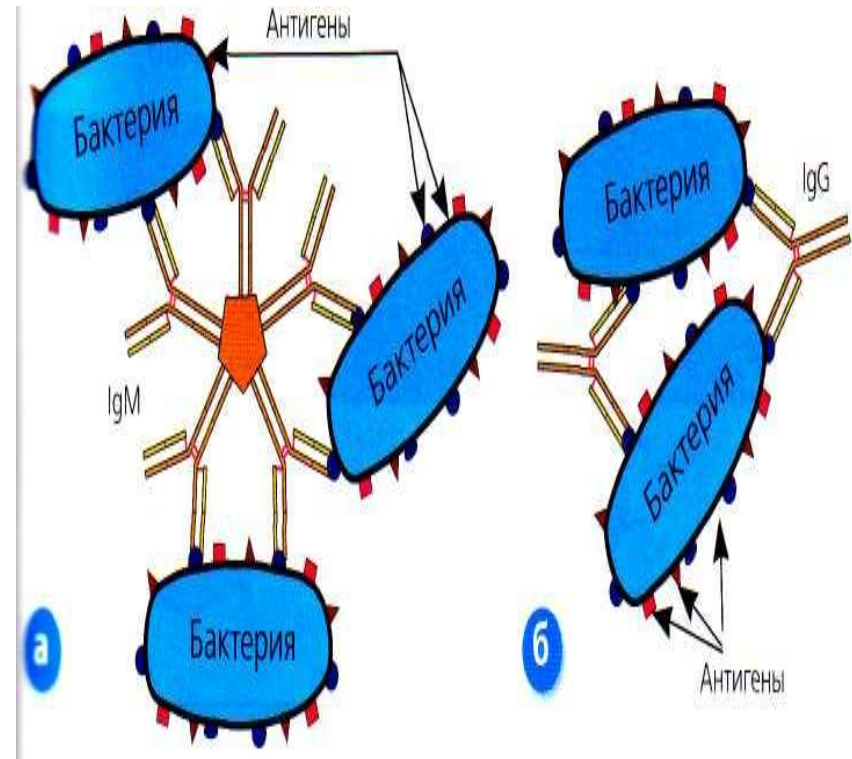
(лат. *agglutinatio* -
приклеивание) —
склеивание и выпадение
в осадок из однородной
взвеси
бактерий, эритроцитов и
др. клеток,
несущих антигены, под
действием
специфических антител..

Условие реакции: !
**корпускулярный
антиген**



Фазы агглютинации

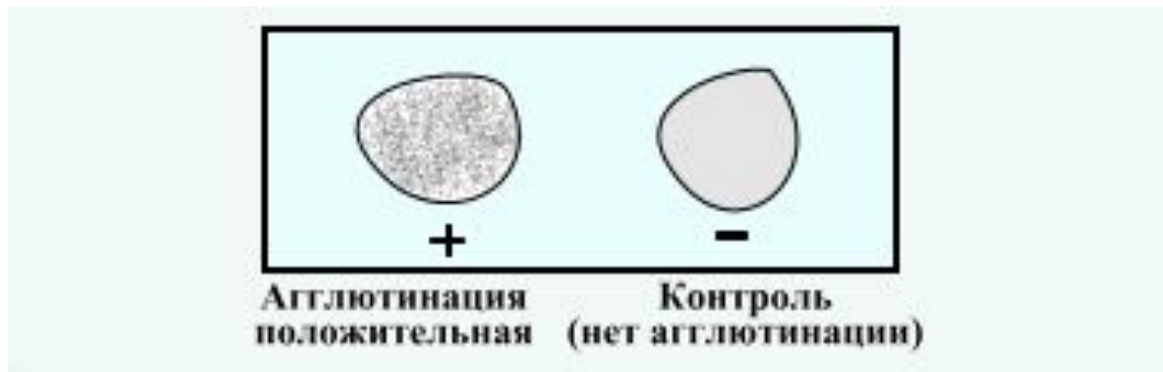
1. Специфическое взаимодействие активного центра антител с антигеном.
2. Образование агглютината.



Методы агглютинации

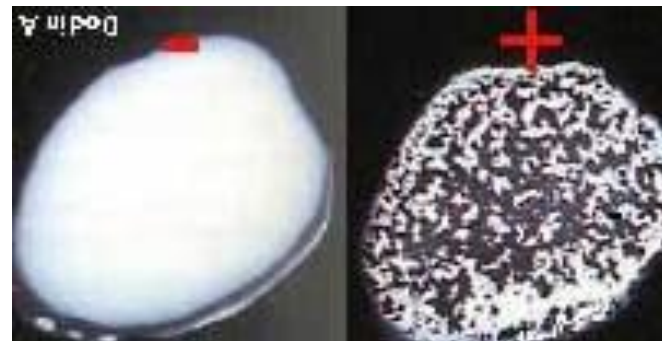
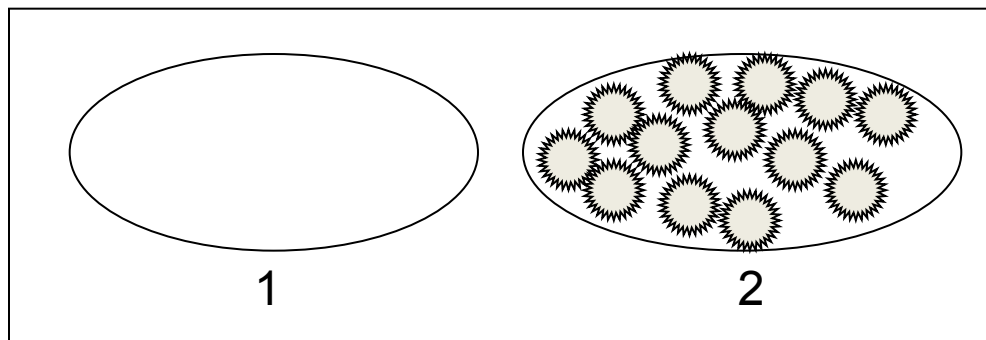
1. Пластинчатая (ориентировочная) реакция агглютинации.

- ставят на стекле.
- используют сыворотки с небольшим разведением или неразведенные.
- используют ее как ускоренный метод идентификации микроорганизмов (сероидентификация).



Реакция агглютинации (ориентировочная, для идентификации микроорганизма)

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



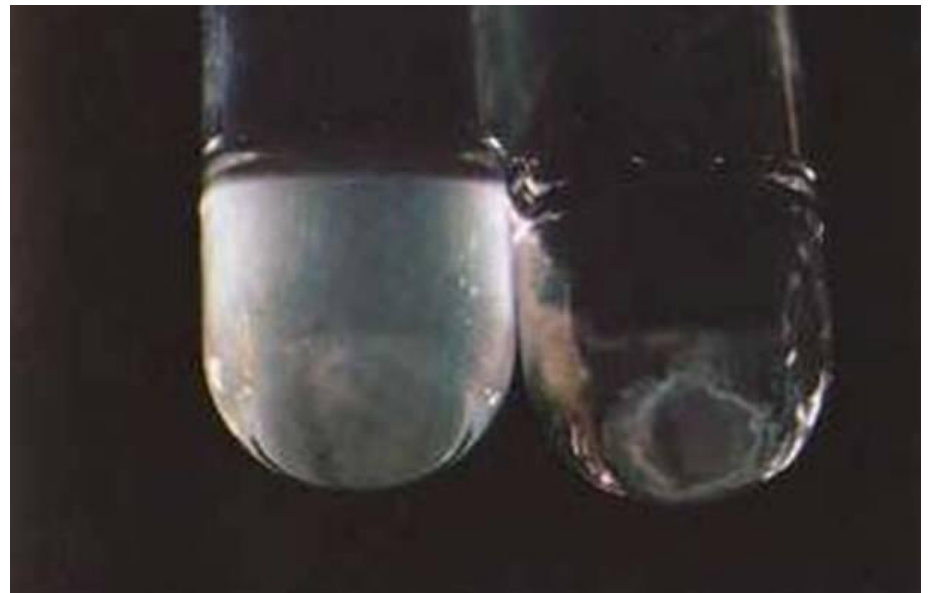
1. Отсутствие агглютинации
2. Наличие агглютинации

Возможна спонтанная агглютинация – R-формы бактерий

Методы агглютинации

2. Развернутая реакция агглютинации.

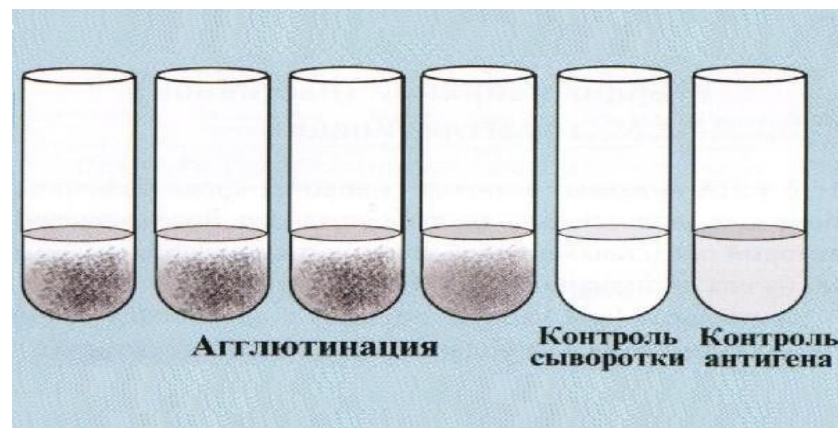
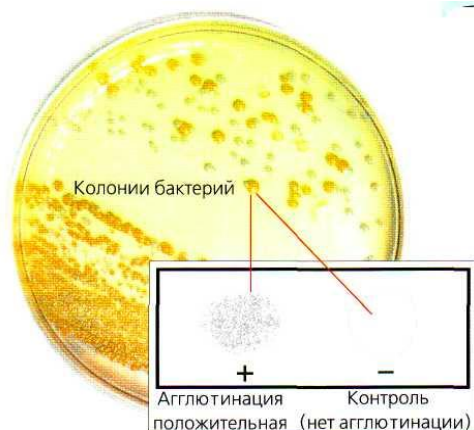
- проводят в пробирках или лунках пластин
- диагностическую сыворотку разводят до титра и вносят одинаковые количества антигена.



Развернутая реакция агглютинации



В штатив устанавливают ряд агглютинационных пробирок. На первой пробирке ряда пишут наименование антигена, который будет введен в реакцию, и указывают номер исследуемой сыворотки. На каждой пробирке ряда обозначают степень разведения находящейся в ней сыворотки. Две последние пробирки ряда предназначены для контроля антигена и сыворотки. На них ставят условные обозначения: КА — контроль антигена и КС — контроль сыворотки.



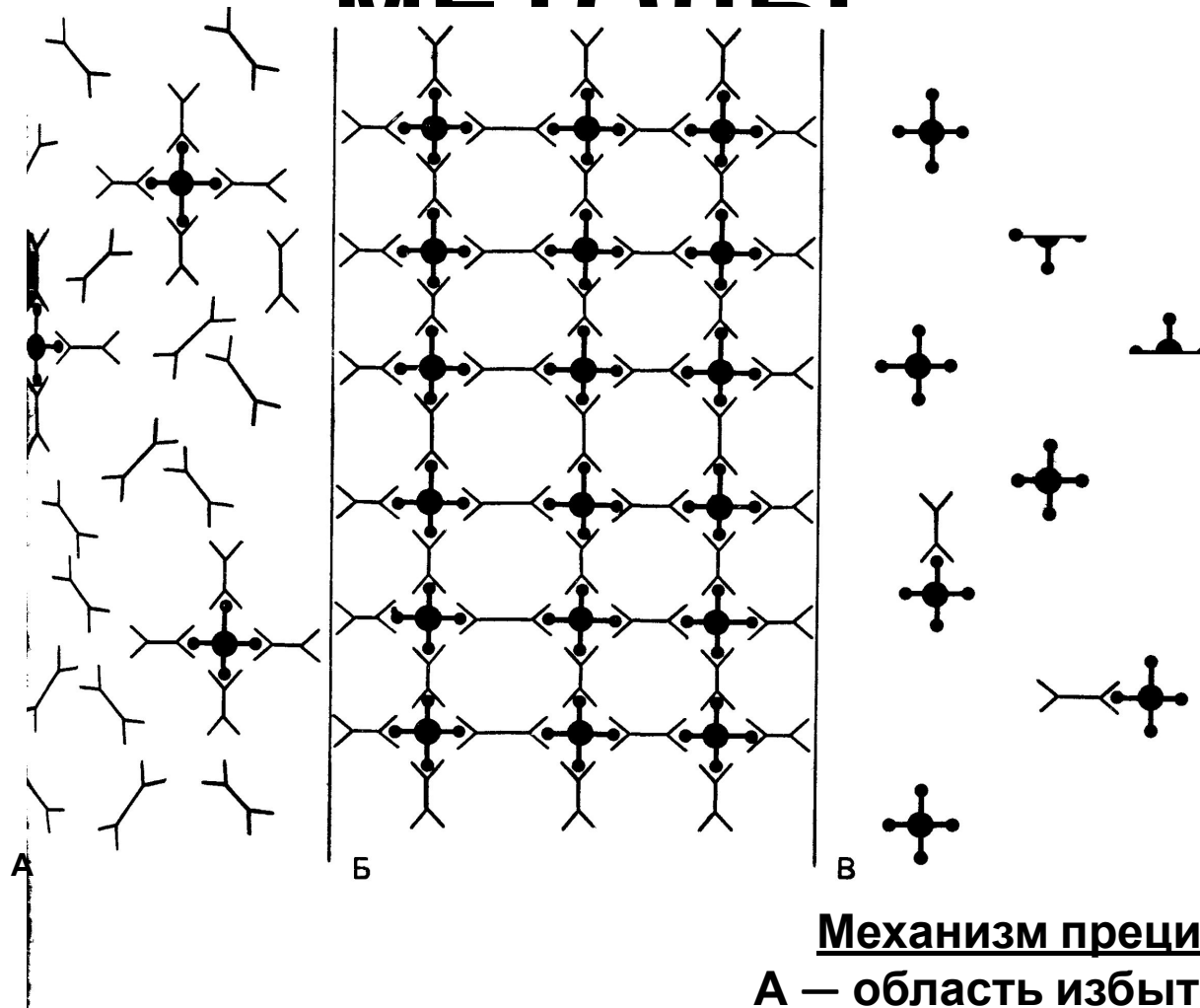
Реакция преципитации

Реакция преципитации

- Принцип: При взаимодействии **растворимого антигена !!!** с антителом в присутствии электролитов (NaCl) образуется комплекс Аг-Ат в виде *нерастворимого преципитата*.
- РП применяют в двух целях: выявление антигенов с помощью известной иммунной преципитирующей сыворотки или антител с использованием известных антигенов.
- Используется как качественный, так и количественный анализ (реакция Манчини).
- Очень чувствительная реакция для определения антигенов.
- **Избыток одного из компонентов резко снижает уровень образования иммунного комплекса.**

ПРЕЦИПИТАЦИОННЫЕ

МЕТОДЫ

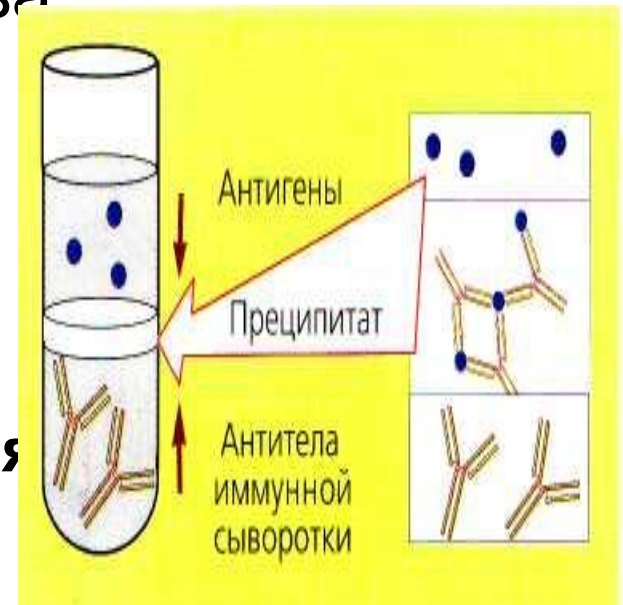


Механизм преципитации

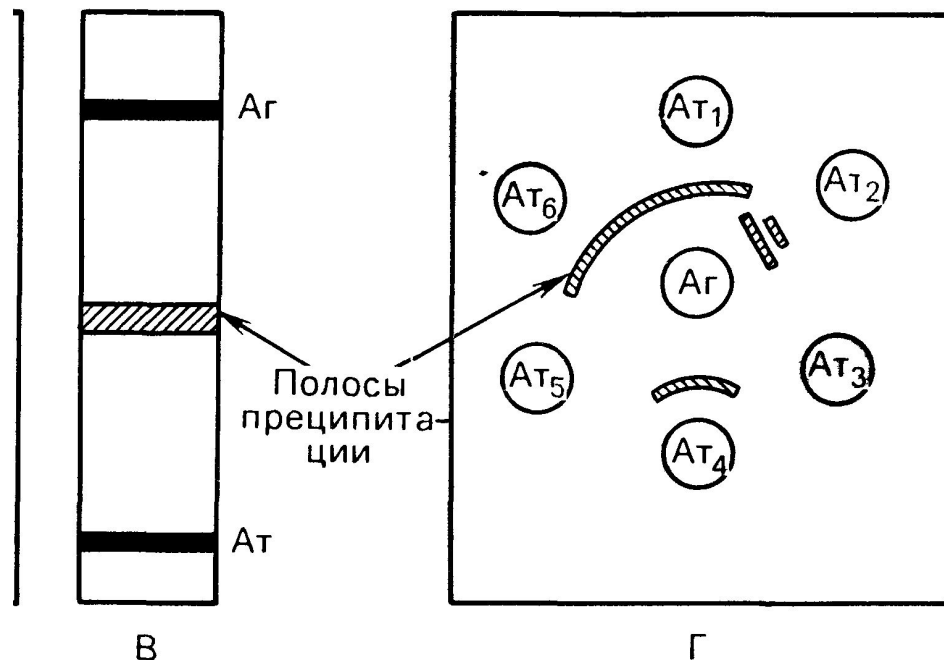
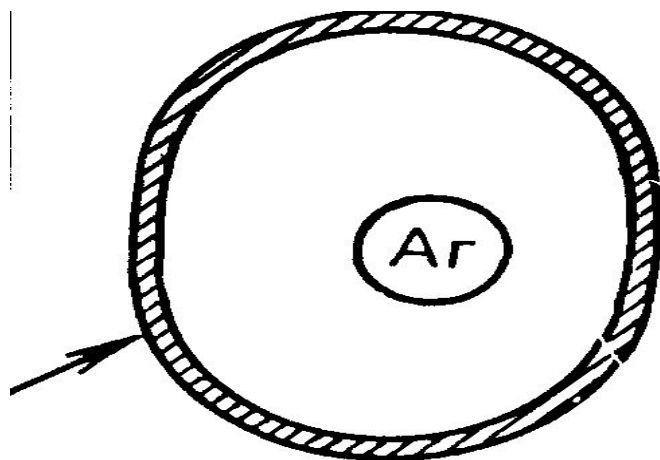
А — область избытка антител,
Б — область эквивалентности,
В — область избытка антигена

Варианты реакции преципитации

- **в жидкой среде** - по типу реакции флоккуляции, кольцепреципитации.
- **в плотной среде** (в агаре, полиакриламидном геле) - реакция преципитации по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия по Манчини, реакция иммуноэлектрофореза
- *В плотной среде возможна:*
 - **одиночная иммунодиффузия**
 - **двойная иммунодиффузия**
 - **линейная иммунодиффузия**
 - **радиальная иммунодиффузия**



иммунопреципитация (радиальная и линейная иммунодиффузия) в геле



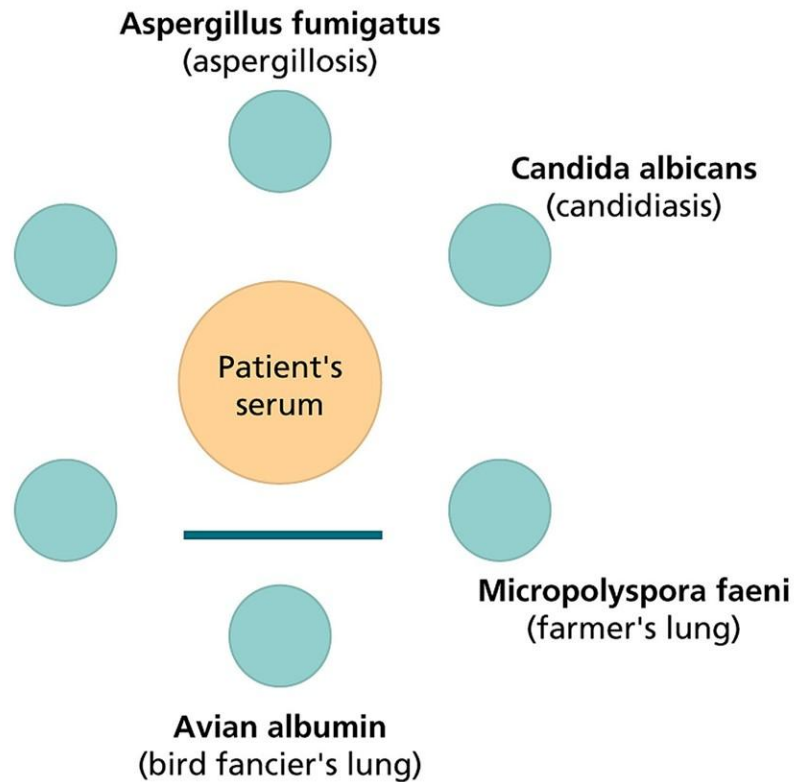
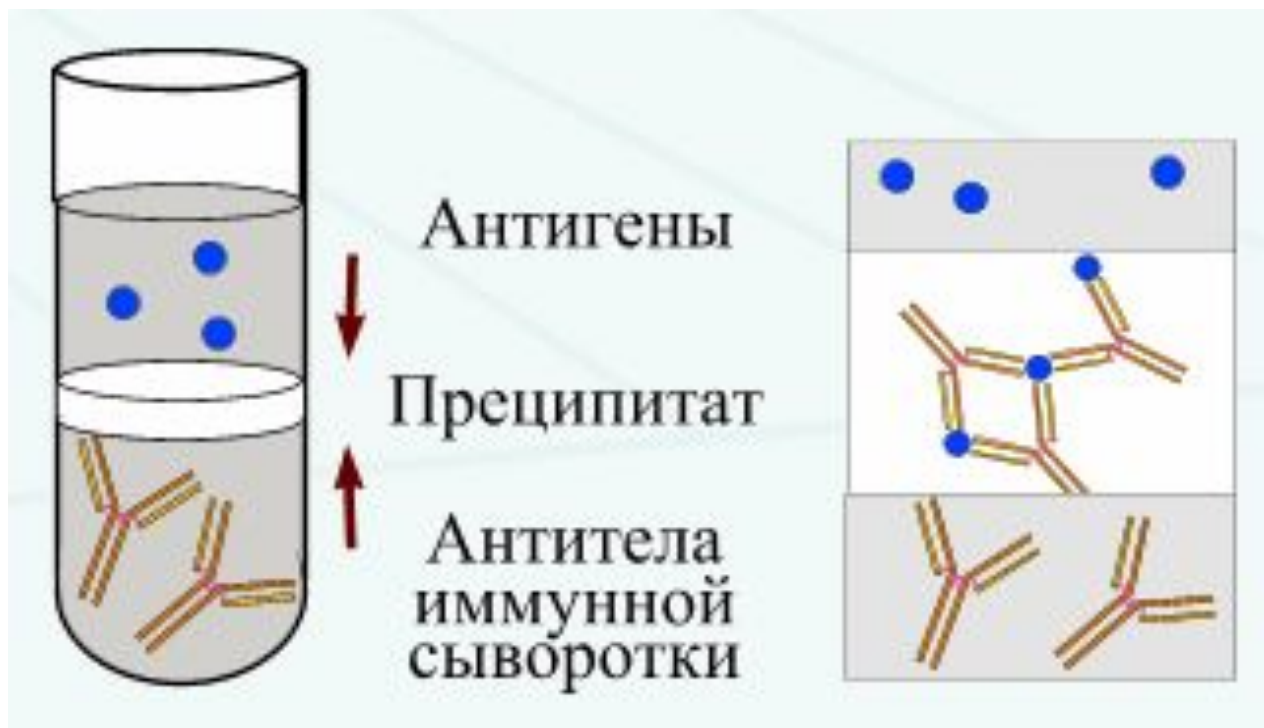
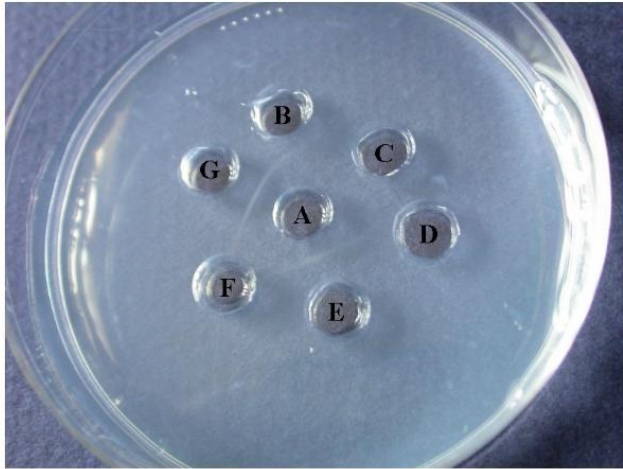


Fig. 19.13 Detection of precipitating antibodies in extrinsic allergic alveolitis. The patient has precipitating antibodies to avian albumin, suggesting possible bird fanciers' lung.

Реакция кольцепреципитации



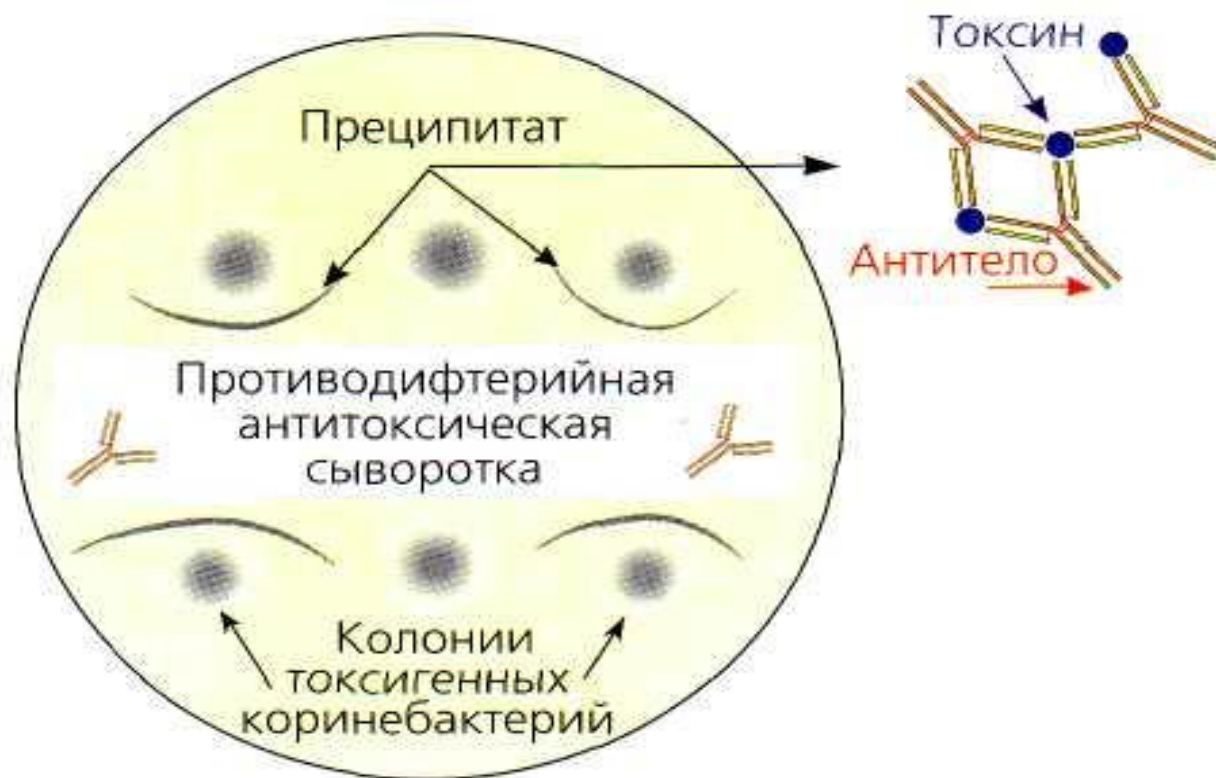
Реакция преципитации в геле по Оухтерлони



Полосы преципитации между антигенами в лунках G, E и иммунной сывороткой (антителами) в лунке А.

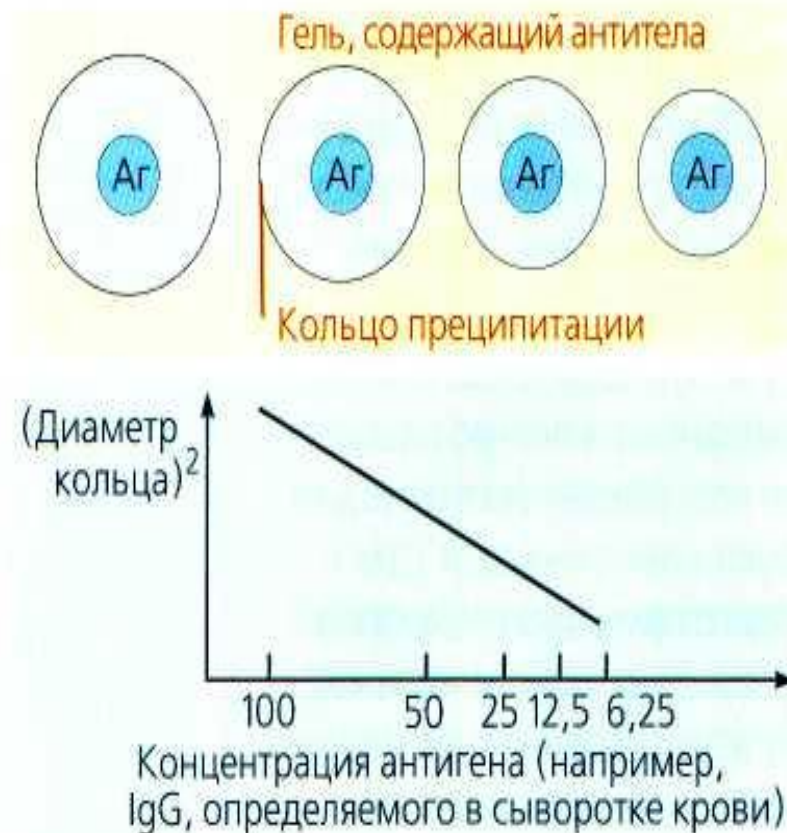
- Для постановки реакции используют 1% агар Дифко, который разливают расплавленным на предметные стекла или чашки Петри .
- Антиген и антитела из лунок диффундируют в питательную среду, вступают в иммунную реакцию и образуют полосы преципитации.
- Учет реакции проводят предварительно через 4 часа, окончательно – через 24–48 часов.

Определение токсигенности коринебактерий (Элека)



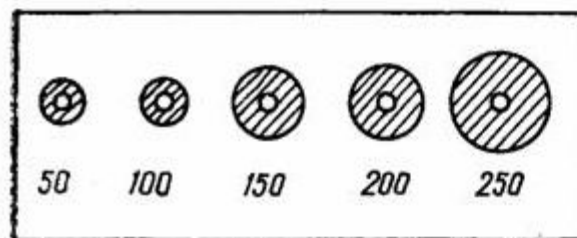
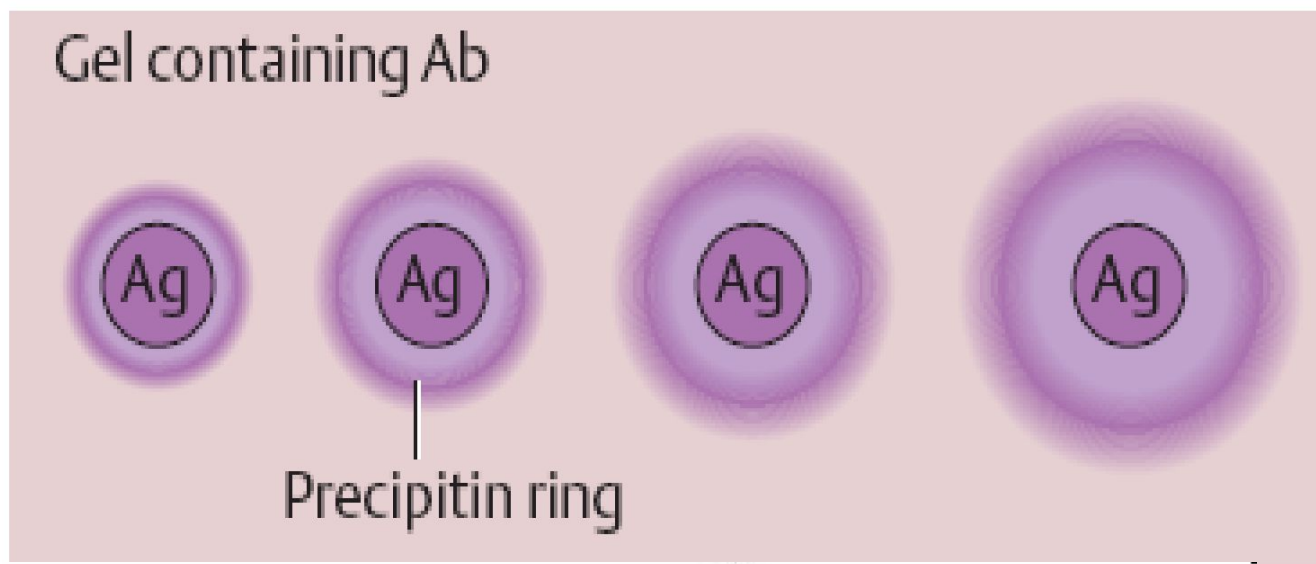
Радиальная иммунодиффузия

ПО Манчини(определение классов иммуноглобулинов)

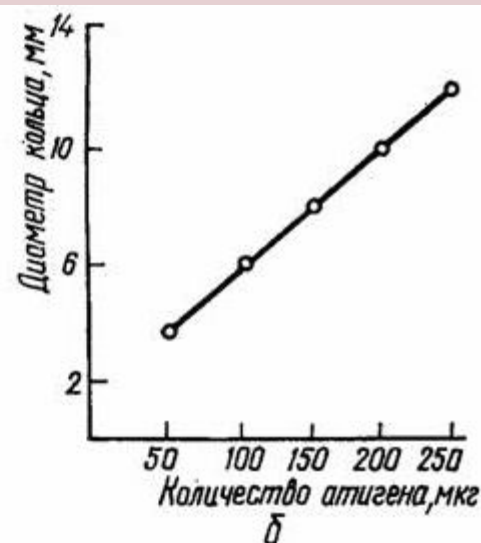


- Антиген диффундирует в гель и, соединившись со специфическими антителами, формирует кольца преципитации, диаметры которых зависят от концентрации антигена в лунках.
- Полученные результаты используют для построения калибровочной кривой, выражающей зависимость диаметров преципитатов от концентрации антигена в исследуемых растворах.
- Условие !: эталон с известным содержанием антигена.

Реакция преципитации в геле по Манчини



a



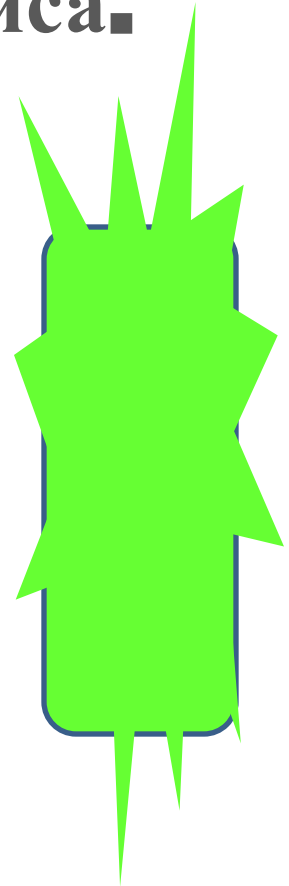
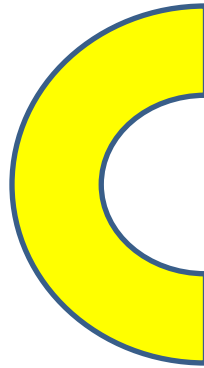
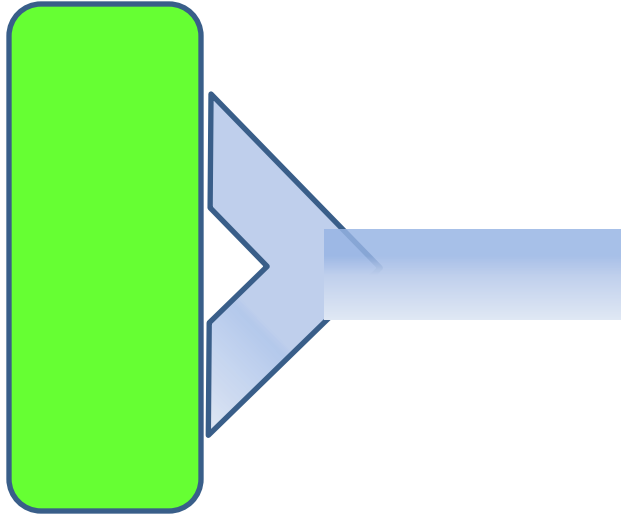
Реакция связывания комплемента РСК

Реакция иммунного лизиса:

Реакция связывания комплемента (РСК)

Реакция Борде—Жангу [по имени бактериологов Ж. Борде (J. Bordet) и О. Жангу (O. Gengou), 1901], высокоспецифичная и очень чувствительная серологическая реакция, основанная на свойстве комплекса антиген — антитело фиксировать свободный комплемент, применяемая при диагностике многих бактериальных и вирусных и некоторых протозойных и гельминтозных болезней, а также для изучения процессов, сопровождающихся изменением количества антигена или антител.

Принцип реакций иммунного лизиса.



**Клетка-мишень,
сенсibilизированная
антителами-лизинами**

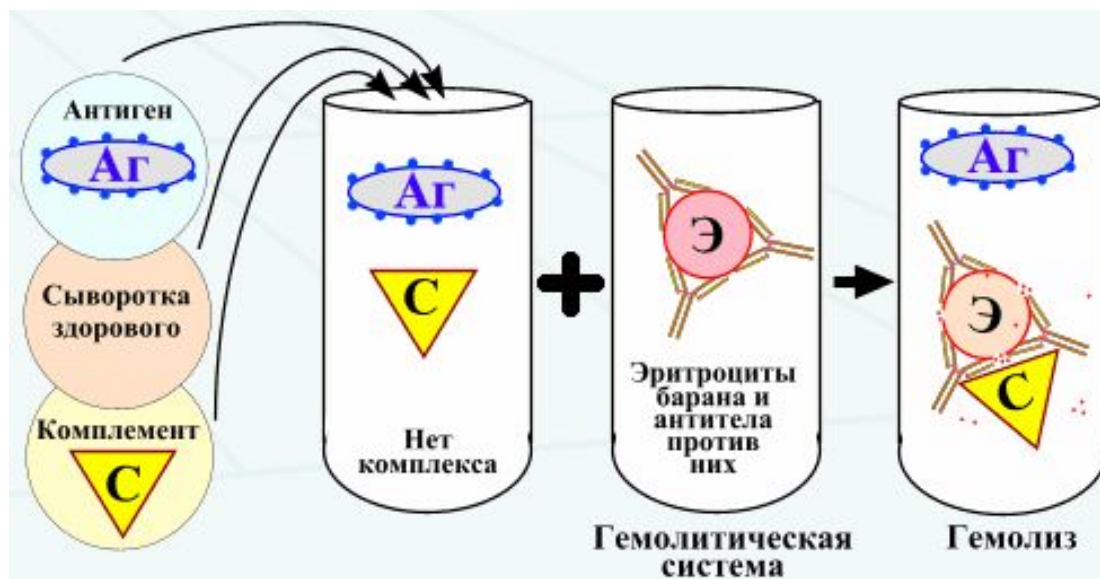
Комплемент

**Лизис
клетки-
мишени**

РСК протекает в 2 фазы:

- 1) Взаимодействие АТ, АГ и комплемента, в результате которого свободный комплемент связывается образовавшимся **СПЕЦИФИЧЕСКИМ комплексом АГ—АТ** (специфич. фаза);
- 2) индикация реакции эритроцитами и антителами к ним (неспецифич. фаза).

Реакция связывания комплемента



1 фаза – диагностическая

АТ + АГ
(сыворотка больного) (диагностикум)



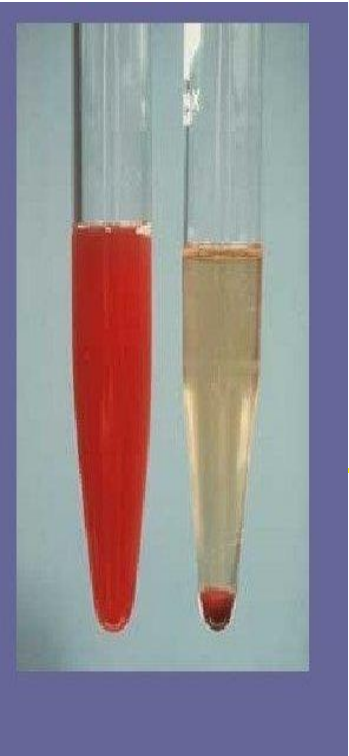
Комплемент

2 фаза – индикаторная

АТ + АГ
(гемолитическая сыворотка кролика) (эритроциты барана)

Нет гемолиза

Реакция положительная



1 фаза – диагностическая

АГ
(сыворотка больного)

АГ
(диагностикум)

Комплемент



2 фаза – индикаторная

АГ

+

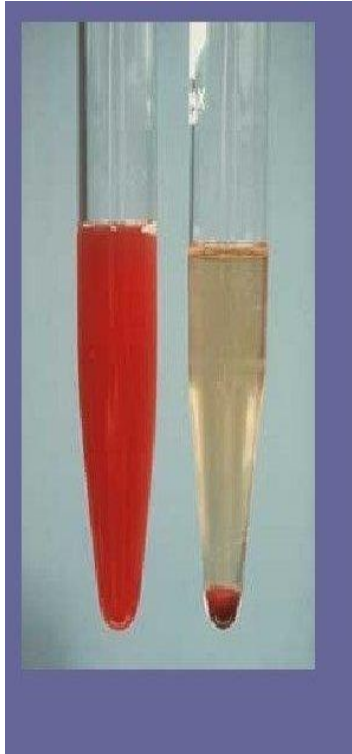
АГ

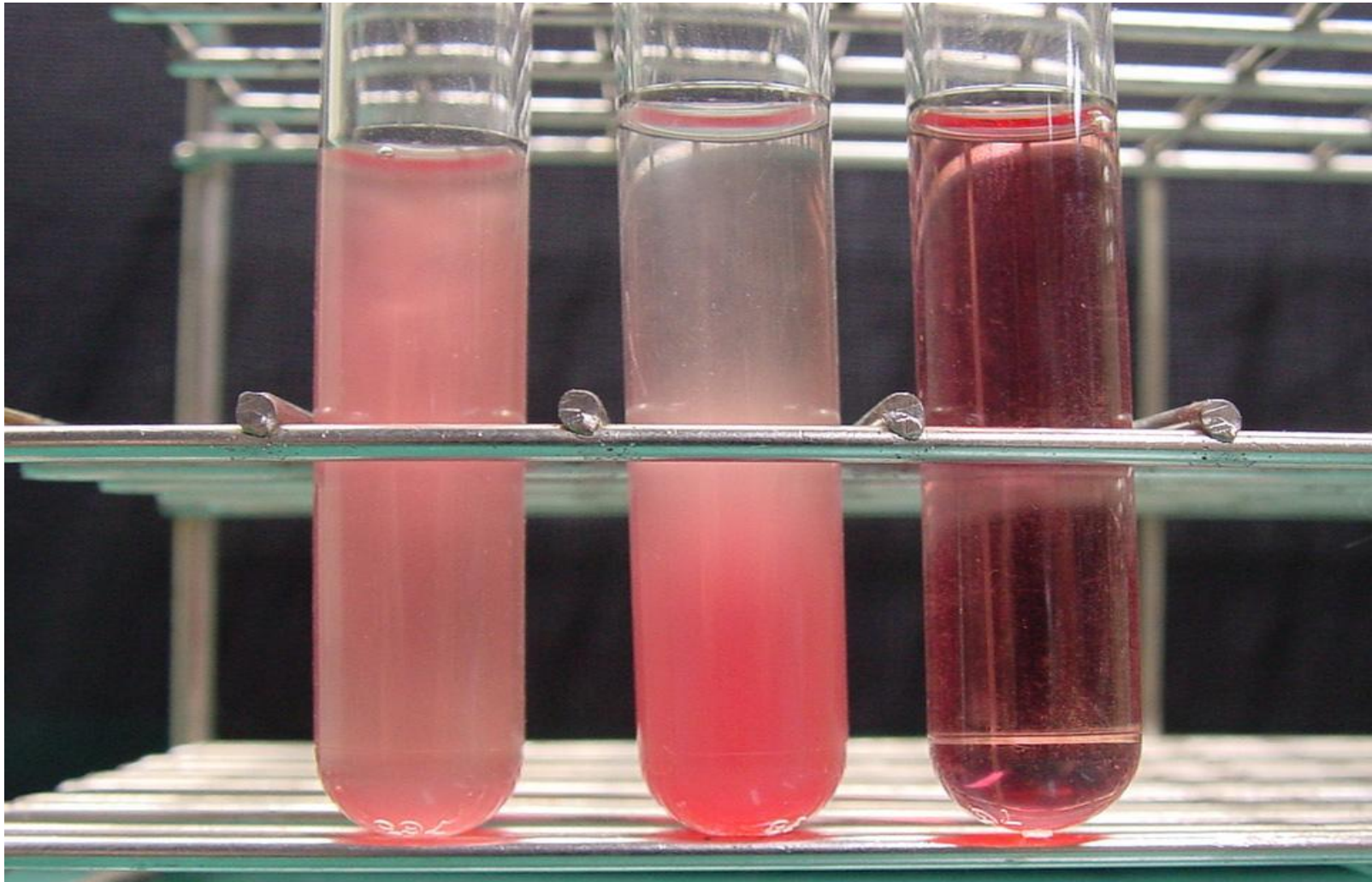
(гемолитическая сыворотка кролика)

(эритроциты барана)

Гемолиз

Реакция отрицательная





Основной опыт РСК

Фаза реакции	Ингредиенты, участвующие в реакции	Номера пробирок				
		1, опыт	2, КС	3, КА	4, КГ	5, КК
1.	1. Исследуемая сыворотка, мл	0,5	0,5	-	-	-
	2. Антиген в раб. дозе, мл	0,5	-	0,5	-	-
	3. Комплемент в раб. дозе, мл	0,5	0,5	0,5	-	0,5
	4. Изотонический раствор, мл	-	0,5	0,5	1,5	1,0
Инкубация при 37 С в течение 30 мин						
2.	5. Гемолитическая система, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Инкубация при 37 С в течение 30 мин						
Результат:						

Условные обозначения:

(+) задержка гемолиза;

(-) гемолиз.

**Реакция непрямой
гемагглютинации**

**Реакция коагглютинации
реакция латексагглютинации**

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Метод обнаружения и идентификации антигенов или антител, основанный на возникающем в их присутствии феномене агглютинации эритроцитов, на поверхности которых были предварительно адсорбированы соответствующие специфические антитела или антигены.

Отличается большей чувствительностью и специфичностью.

1. АГ (АТ) + эритроциты → нагруженные эритроциты

2. Нагруженные эритроциты + иммунная сыворотка или АГ

Положительная
Реакция (зонтик)

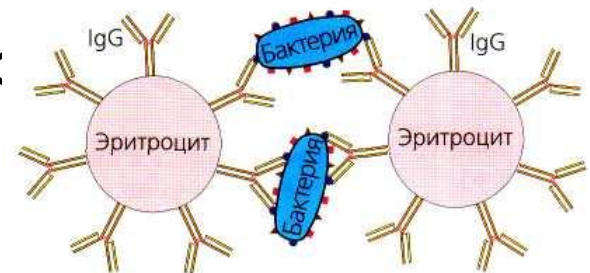
Отрицательная
Реакция (пуговка)

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

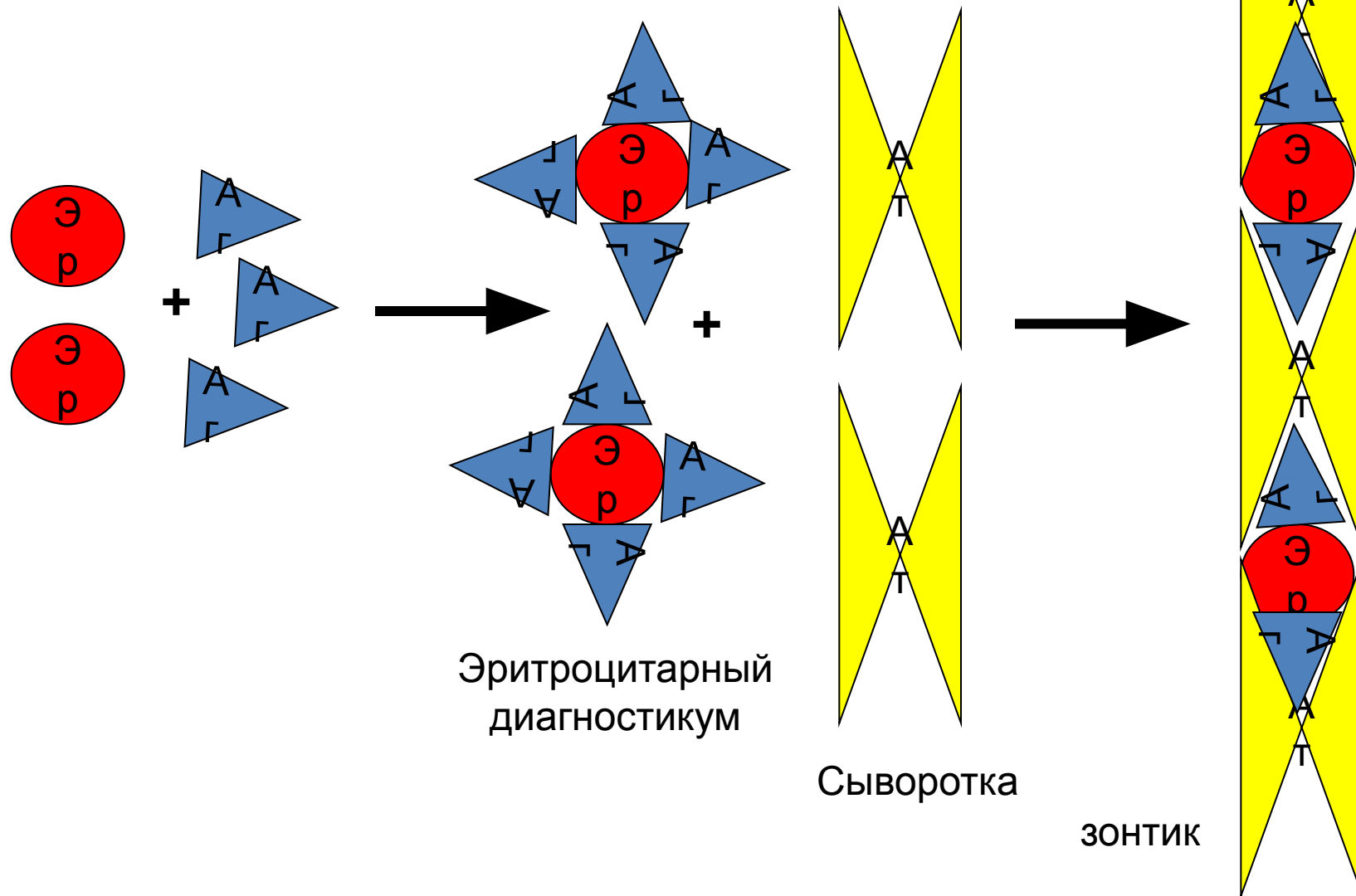


реакция непрямой гемагглютинации

- Сущность реакции состоит в том, что молекулы антигена адсорбируются на поверхности эритроцитов.
- Такие "нагруженные" антигенами эритроциты приобретают способность агглютинироваться иммунной сывороткой, специфичной для данного антигена.
- Эритроциты склеиваются и выпадают в осадок, образуя на дне пробирки гемагглютинат - **выпадение на дно в виде фестончатого осадка («зонтика»).**
- При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговки» .



Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) – или пассивная гемагглютинация (РПГА)



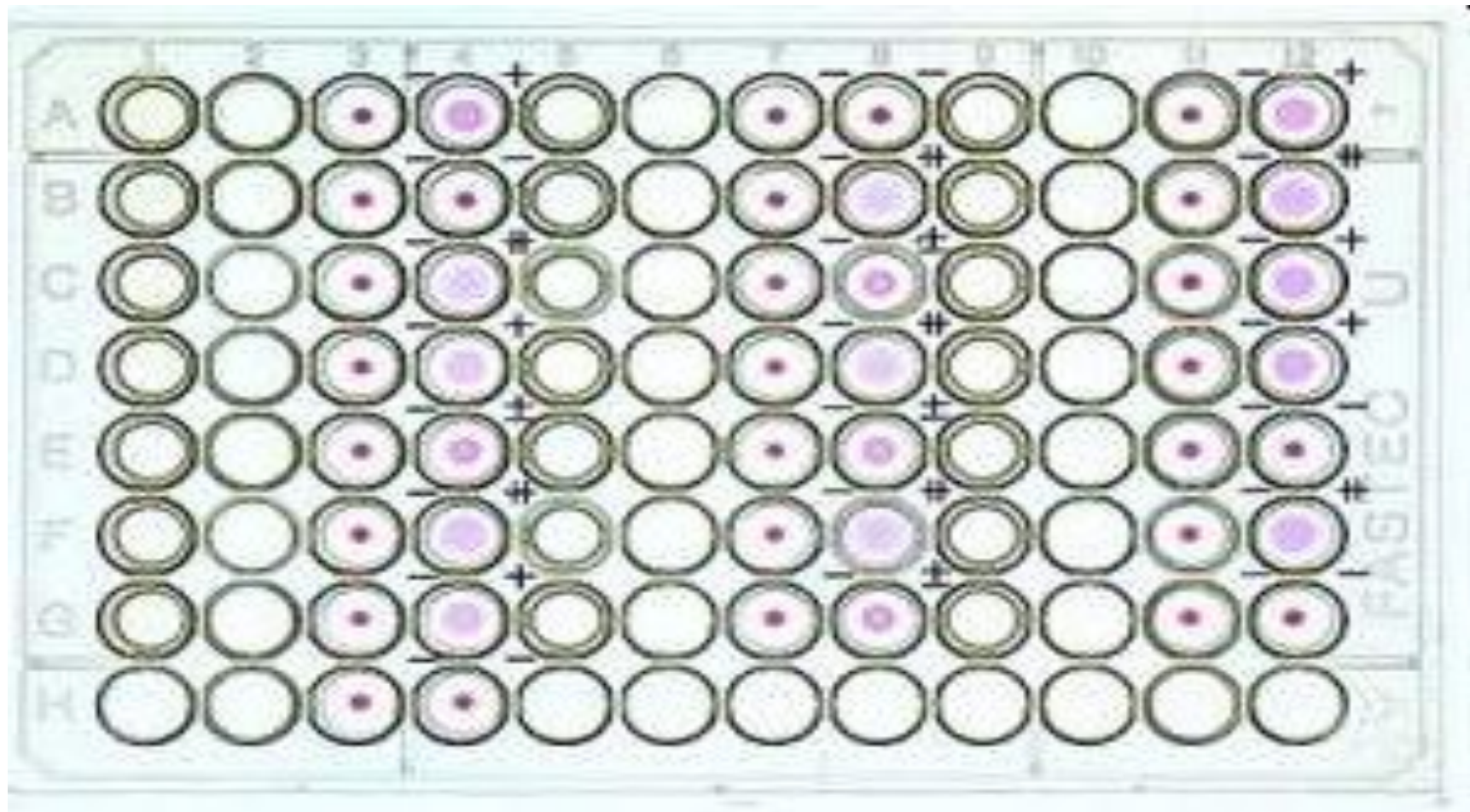
Тест-система для проведения РНГА



Нормальная
сыворотка

Эритроцитарный
диагностикум

РНГА в иммунологическом планшете на выявление HBsAg



Реакция непрямой агглютинации

позволяет выявить антитела сыворотки крови больного с помощью **антигенного эритроцитарного диагностикума**, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами (с О-антигенами брюшнотифозных бактерий).

Постановка и учет РНГА

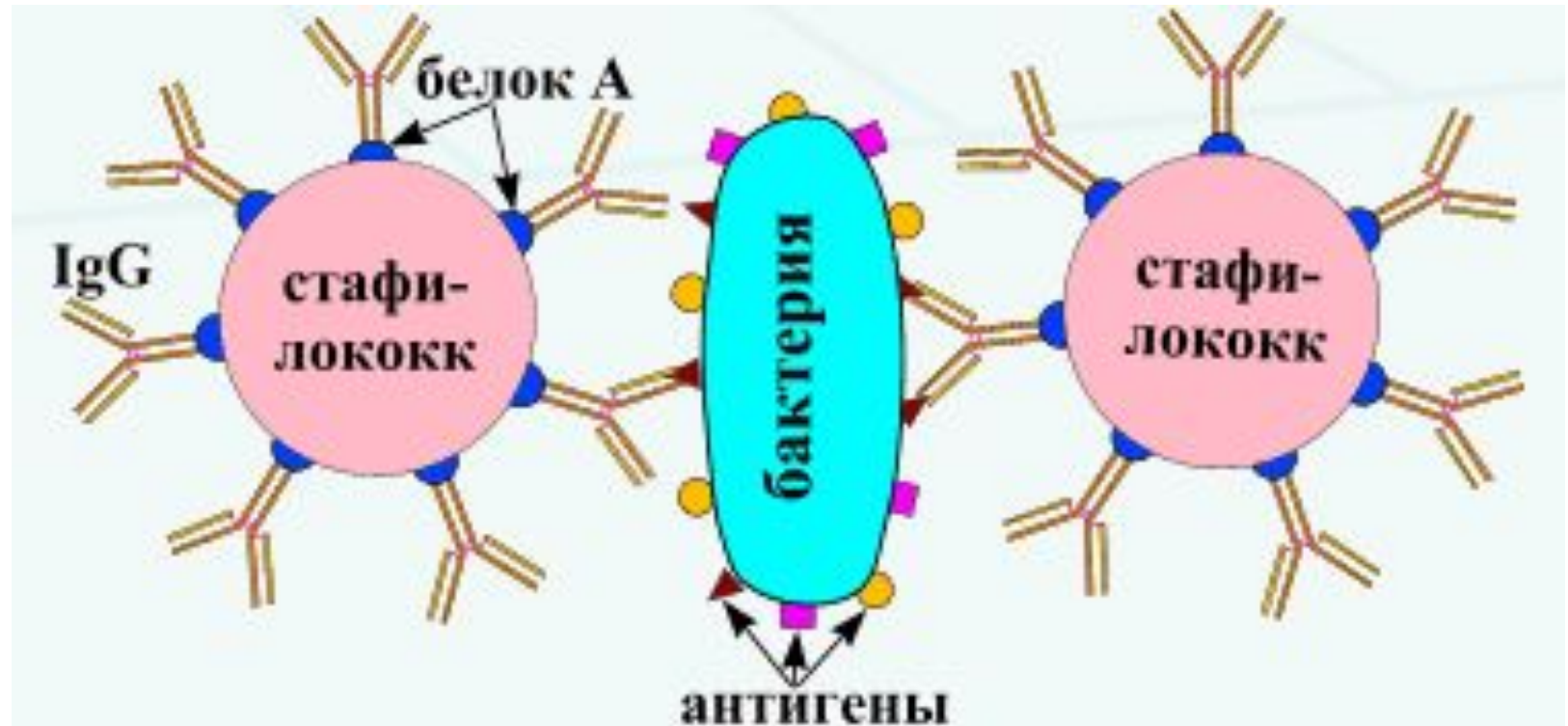


Реакция коаггутинации (РКА)

В качестве носителя используются:

- **Белок А *S.aureus*** (неспецифически адсорбирует на своей поверхности Fc-фрагменты иммуноглобулина G)
- **Белок G стрептококков**
- **Инертные носители** (активированный уголь)

Схема реакции коагглютинации



Реакция латекс-агглютинации (РАЛ)

- **Частицы латекса** (искусственные эритроциты) используют в качестве носителя АГ.

Для постановки РАЛ применяют сенсibilизированные частицы полистирольного латекса, которые в присутствии гомологичного реагента склеиваются.

Обычно эта реакция проходит очень быстро (3...8 мин), что позволяет применить ее в качестве экспресс-метода для выявления антигенов и антител.

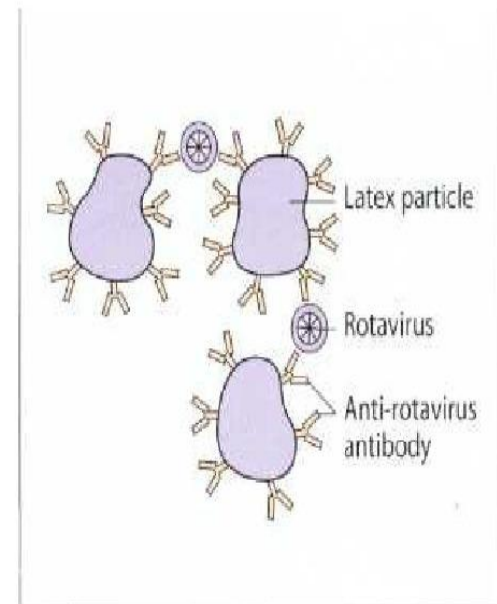
Преимущества РАЛ в том, что частицы латекса в отличие от эритроцитов не имеют перекрестно реагирующих антигенов, поэтому она специфичнее РНГА.

- Эта реакция применяется с целью: 1) обнаружения присутствия антител в сыворотке крови обследуемых лиц; 2) идентификации возбудителя заболевания.

Ход исследования РЛА

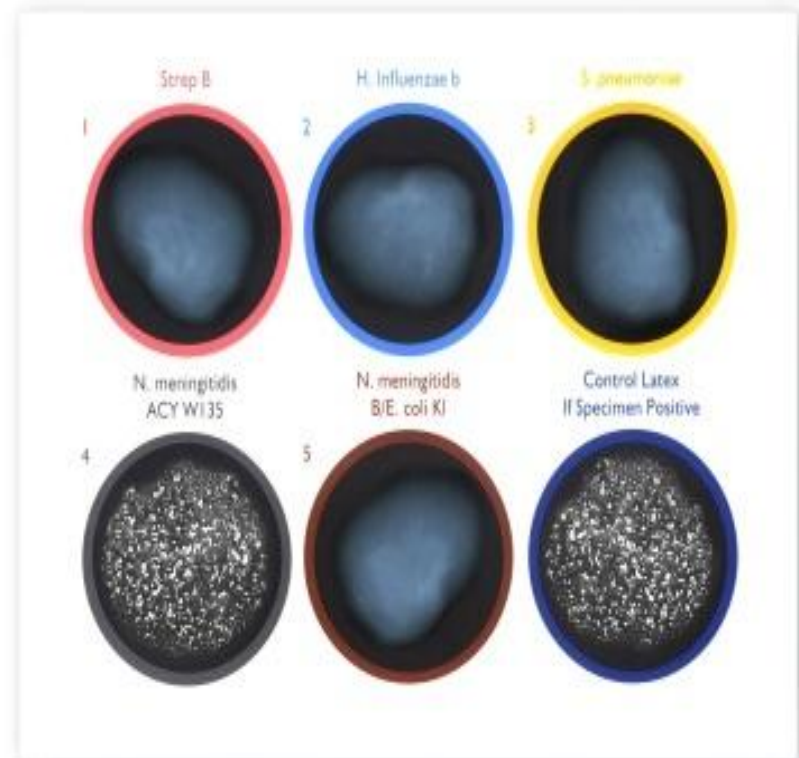
- Для приготовления антигенного латексного диагностикума растворимые мелкодисперсные антигены бактериальной клетки белковой или полисахаридной природы адсорбируют на поверхности окрашенных частиц инертного монодисперсного латекса.
- Нагруженные бактериальным антигеном латексные частицы склеиваются под действием иммунной сыворотки, содержащей антитела против данного антигена, что приводит к образованию характерного осадка - тонкой пленки с неровными краями ("зонтик").

Латекс-агглютинация



Использование РЛА

- для прямого определения различных антигенов в жидкостях тела (цереброспинальной жидкости, сыворотке, моче, крови, культуре с питательной среды):
- Видео про РЛА можно посмотреть :
<https://youtu.be/zXyfez>



Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ

-

- Иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой или щелочной фосфатазой). в качестве метки для регистрации сигнала.

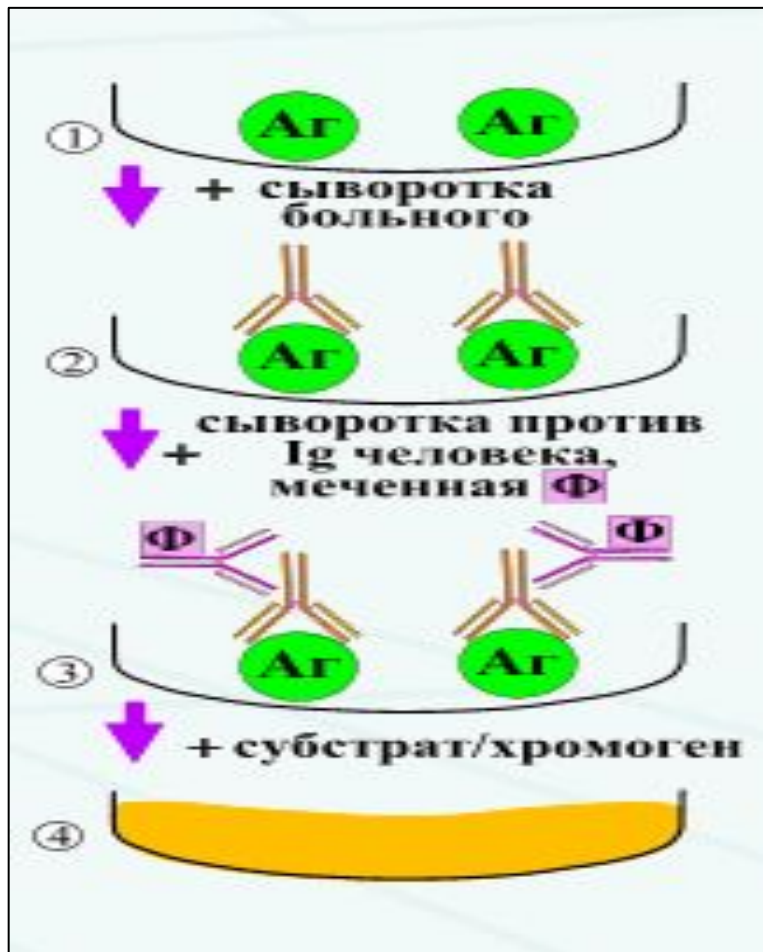
Иммуноферментный анализ (ИФА)

Содержание набора

(Сифилис ИФА 96)

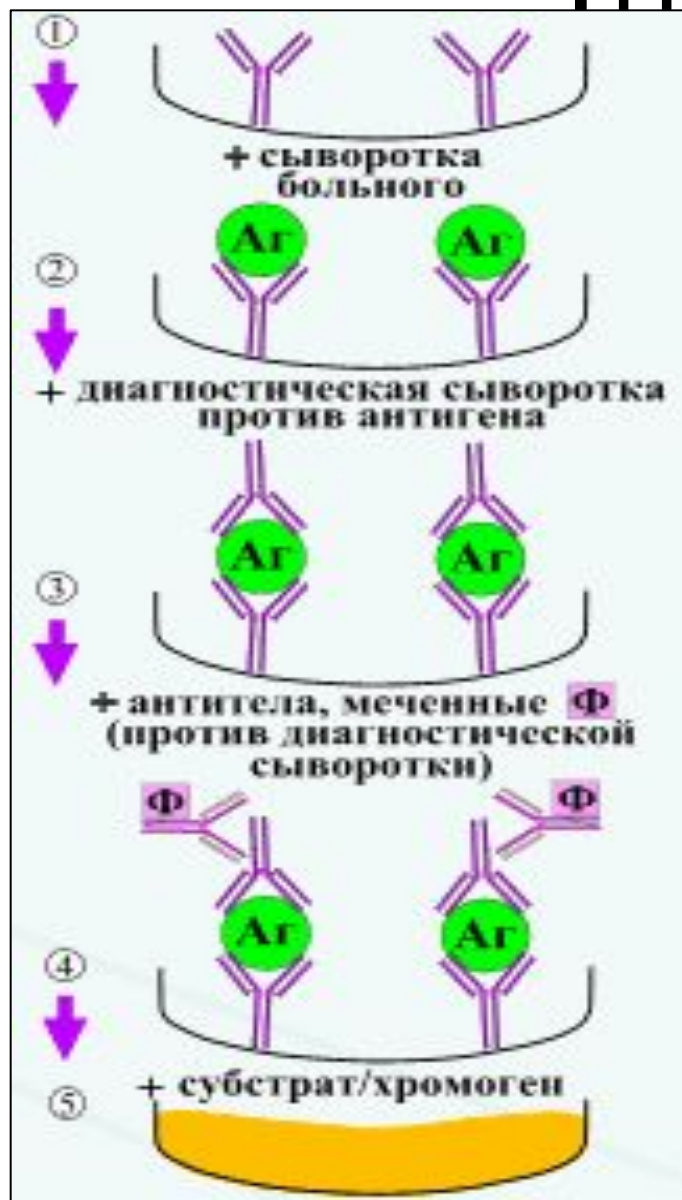


Схема иммуноферментного анализа твёрдофазный вариант



Определение
антител в
сыворотке
больного с
сорбированным
антигеном

Схема иммуноферментного анализа твёрдофазный вариант



Определение антигена в сыворотке больного с сорбированными диагностическими антителами

Ход исследования (для серодиагностики)

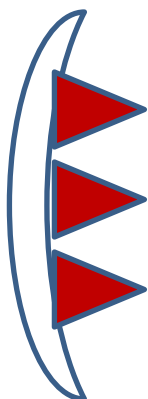


- Фиксация ИЗВЕСТНОГО **антигена (АГ)** и ковалентное связывание с поверхностью планшета.
- Добавление сыворотки пациента(**АТ**) и инкубация.
- Отмывка
- Добавление **конъюгированных ферментом АТ(антиидиотипические)**
- Отмывка
- Введение системы **субстрат-хромоген**.
- Субстрат расщепляется ферментом, а его продукты деградации вызывают химическую модификацию хромогена.
- При этом хромоген меняет свой цвет – интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству

Иммуноферментный анализ

выявление антител

ЛУНКА
С НАНЕСЕННЫМИ
АНТИГЕНАМИ

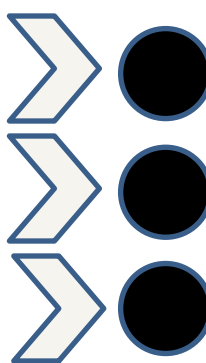


1 фаза

СЫВОРОТКА
БОЛЬНОГО



АНТИГЛОБУЛИНОВАЯ
СЫВОРОТКА
С ФЕРМЕНТОМ
(ПЕРОКСИДАЗОЙ)



2 фаза

СУБСТРАТ
К ФЕРМЕНТУ
(ТМБ –
ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИН)



3 фаза

биохимический и иммуноферментный



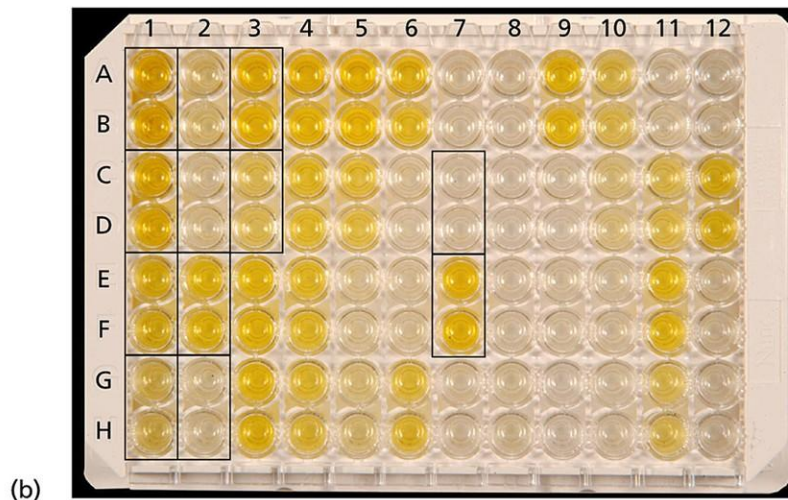
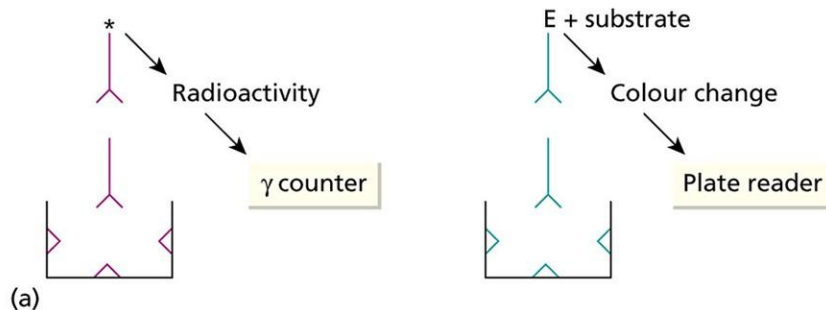


Fig. 19.10 (a) Principle of radioimmunoassay vs. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). E, Enzyme-labelled antibody which binds to human IgG. *Radioisotopically labelled antibody which binds to human IgG. (b) An ELISA assay plate. In this example, anti-cardiolipin antibodies are being measured. Wells 1AB, 1CD, 1EF, 1GH, 2AB and 2CD contain duplicate samples of standard anticardiolipin antibody activity ranging from highest (1AB) to lowest (2CD). Wells 2EF, 2GH, 3AB and 3CD contain duplicates of known positive and negative quality control samples. Remaining wells contain test sera tested in duplicate. Wells 7CD contain a negative patient serum while wells 7EF contain a strong positive serum sample.

Иммунный блоттинг

Иммуный блоттинг



- сочетает в себе иммуноферментный анализ (ИФА) с предварительным электрофоретическим переносом на нитроцеллюлозную полоску (стрип) антигенов вируса.

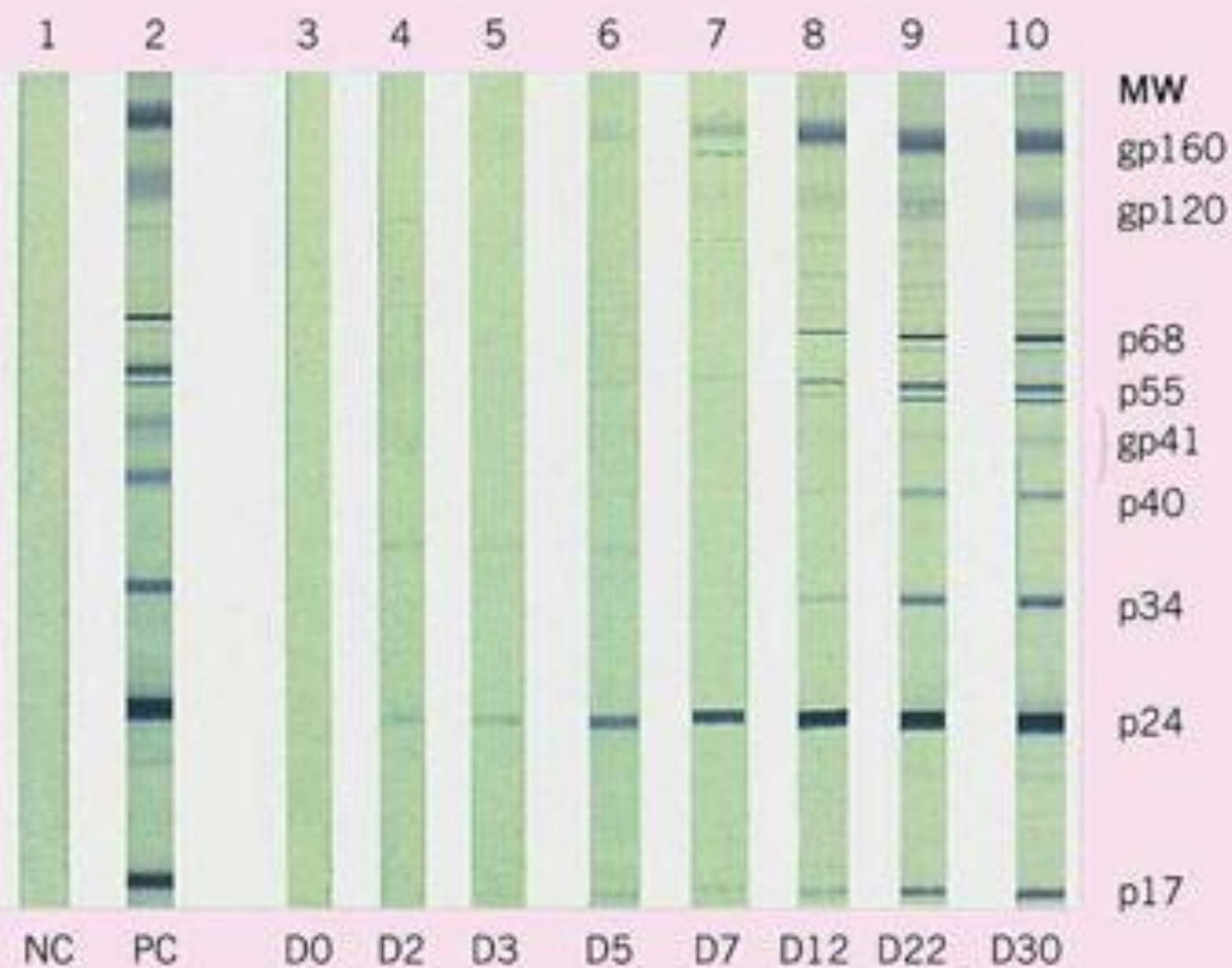
Суть метода

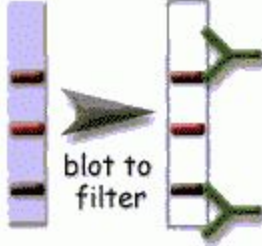
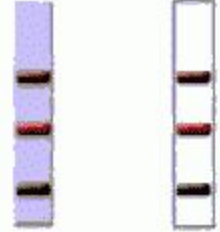
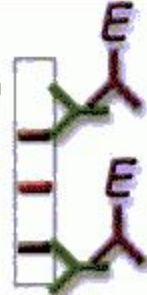
- «иммунный блот» заключается в том, что иммуноферментную реакцию проводят не со смесью антигенов или одним !!, а с **антигенами, предварительно распределенными методом иммунофореза по фракциям, располагающимся согласно молекулярному весу по поверхности нитроцеллюлозной мембраны.**
- В результате основные белковые АГ , носители антигенных детерминант, распределяются по поверхности в виде отдельных полос, которые и проявляются при проведении иммуноферментной

этапы(на примере ВИЧ):

- **Подготовка стрипа.** Предварительно очищенный и разрушенный до составных компонентов вирус иммунодефицита (ВИЧ) подвергается электрофорезу, при этом входящие в состав ВИЧ антигены разделяются по молекулярному весу. (Методом блоттинга (аналог выдавливания на "промокашку" избытка чернил) антигены переносят на полосу нитроцеллюлозы).
- **Исследование пробы.** На нитроцеллюлозную полосу наносится исследуемый, если в пробе есть специфические АТ образуются ИК с (комплиментарными) антигенными полосами.
- **Трактовка результата.** Наличие полос в на определённых участках нитроцеллюлозной пластины подтверждает присутствие в исследованной сыворотке антител к строго определённым антигенам ВИЧ.

WESTERN BLOT REACTIVITY IN ONE HIV-1 SEROCONVERTER



РЕАГЕНТЫ: образцовые антигены искомой патологии наносятся на пластину  для гель-электрофореза и разделяются по молекулярным массам	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ  ЭЛЕКТРОФОРЕЗ	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ  ЭЛЕКТРОФОРЕЗ
ПРОЦЕДУРА: перенесение (blot) разделенных антигенов на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр на фильтр наносят исследуемую сыворотку. дают время на протекание реакции связывания антител (если есть), после чего несвязавшийся материал смывают 	 blot to filter	
РЕАГЕНТЫ: конъюгат антител к исследуемым антителам с ферментом (пероксидаза хрена или фосфатаза) реагирует на фильтре, после некоторого времени несвязавшийся конъюгат смывают 	конъюгат присоединяется только к тем антителам, против которых выработаны молекулы его антител 	
РЕАГЕНТЫ: фильтр обрабатывается неокрашенным субстратом фермента в конъюгате. Окрашивание появляется только по местам патологического антигена (ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ Р-Я) или окраска не появляется вовсе (ОТРИЦ. Р-Я), либо по местам примесных антигенов.	фермент превращает неокрашенный субстрат в окрашенный продукт точно в месте расположения полосы Ag 	в отрицательных образцах окрашивания не наблюдается или оно сравнимо с фоновым уровнем 

ПРОЦЕДУРА "WESTERN BLOT"

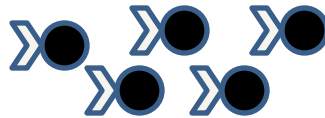
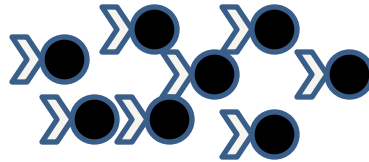
БЛОТ
С НАНЕСЕННЫМИ
АНТИГЕНАМИ
ВПГ-1 И ВПГ-2

ИММУНОБЛОТИНГ (Herpes Simplex Virus Ig)

СЫВОРОТКА
БОЛЬНОГО

АНТИГЛОБУЛИНОВАЯ
СЫВОРОТКА
С ФЕРМЕНТОМ

СУБСТРАТ
К ФЕРМЕНТУ



1 фаза

2 фаза

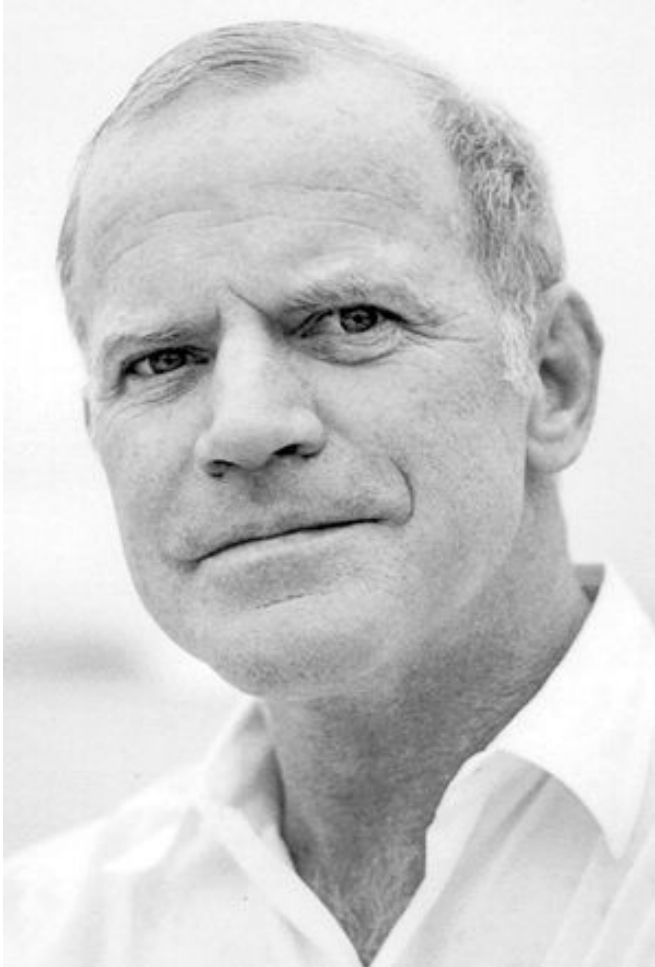
3 фаза

ПЦР

**Полимеразная цепная
реакция (ПЦР) —
метод молекулярной биологии,
позволяющий добиться
значительного увеличения малых
концентраций определённых
фрагментов нуклеиновой кислоты
(ДНК) в биологическом материале
(пробе).**

**ПЦР — гибридационный метод,
основанный на принципе
комплементарности**

Изобретение ПЦР



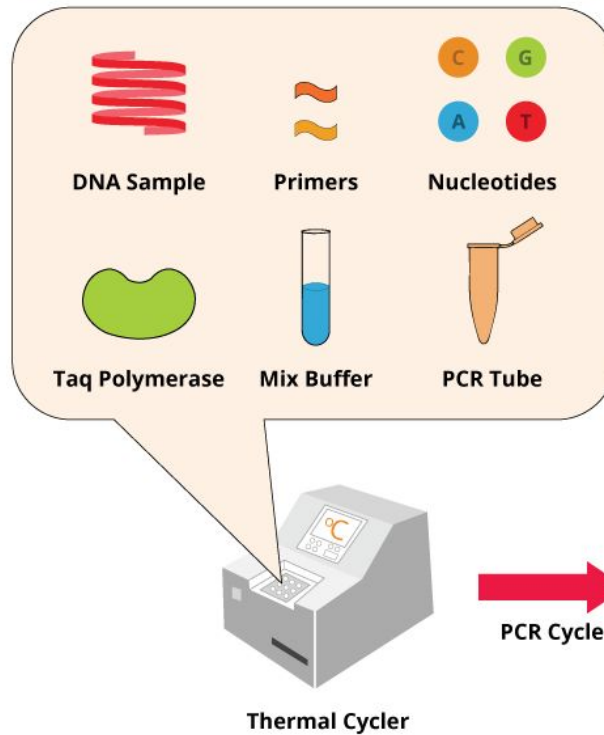
Полимеразную цепную реакцию (ПЦР, PCR) изобрел в 1983 году американский ученый Кэри Мюллис (Kary Mullis).

Kary Mullis, Лауреат
Нобелевской
премии 1993 г. по химии

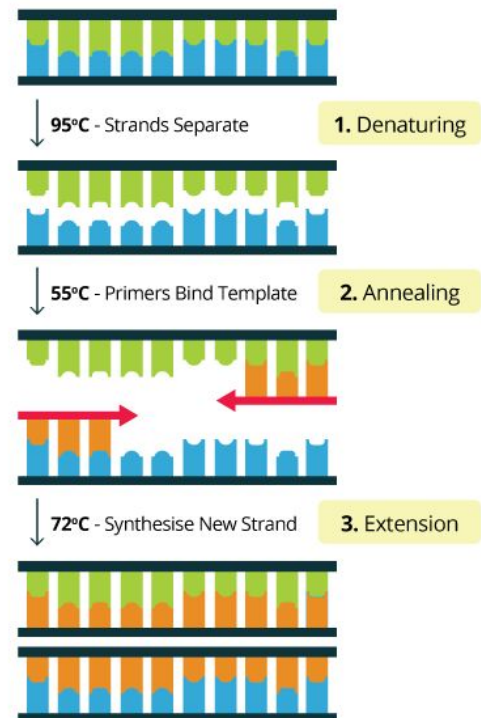
Принципы технологии ПЦР

- Мишень – генетический материал.
- Метод прямого выявления возбудителя, основанный на универсальности способа хранения и передачи генетической информации.
- Высокая чувствительность, основанная на принципе экспоненциального накопления продукта.
- Высокая специфичность, основанная на выявлении уникальных последовательностей генома.

PCR Components



PCR Process (One Cycle)

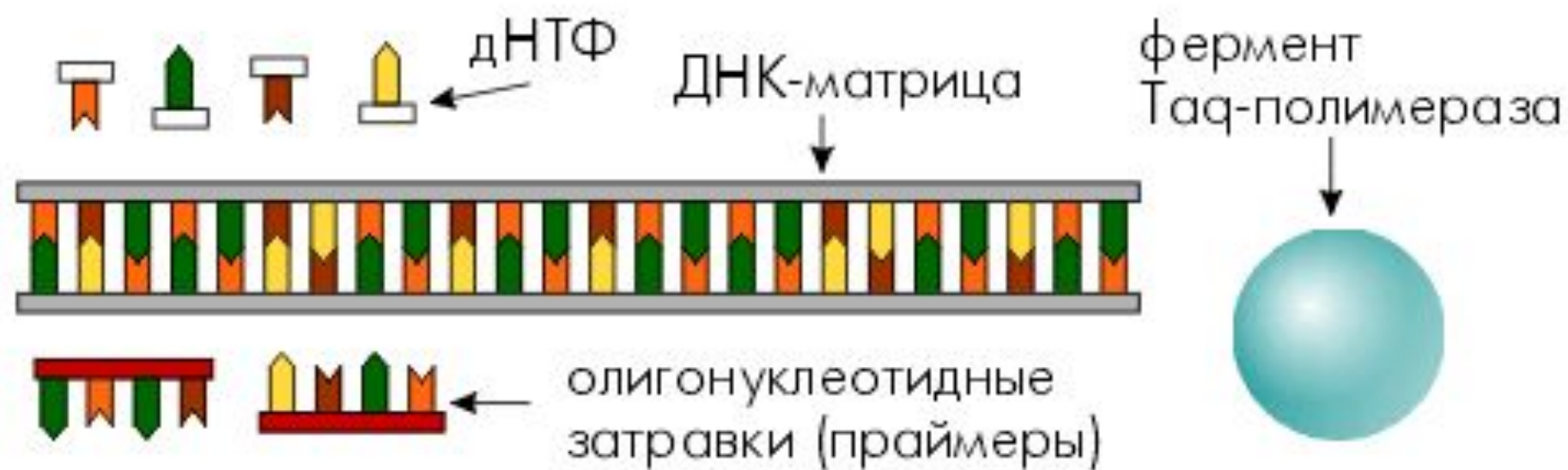


Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР - это метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул.



Исходные компоненты ПЦР



Исходные компоненты ПЦР

Компоненты реакции

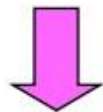
Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- **ДНК-матрица**
- **Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.** Дизайне праймеров осуществляет изготовитель тест системы.
- **Термостабильная ДНК-полимераза** — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК.
- **Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты** (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ).
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора.



Стадии Полимеразной Цепной Реакции

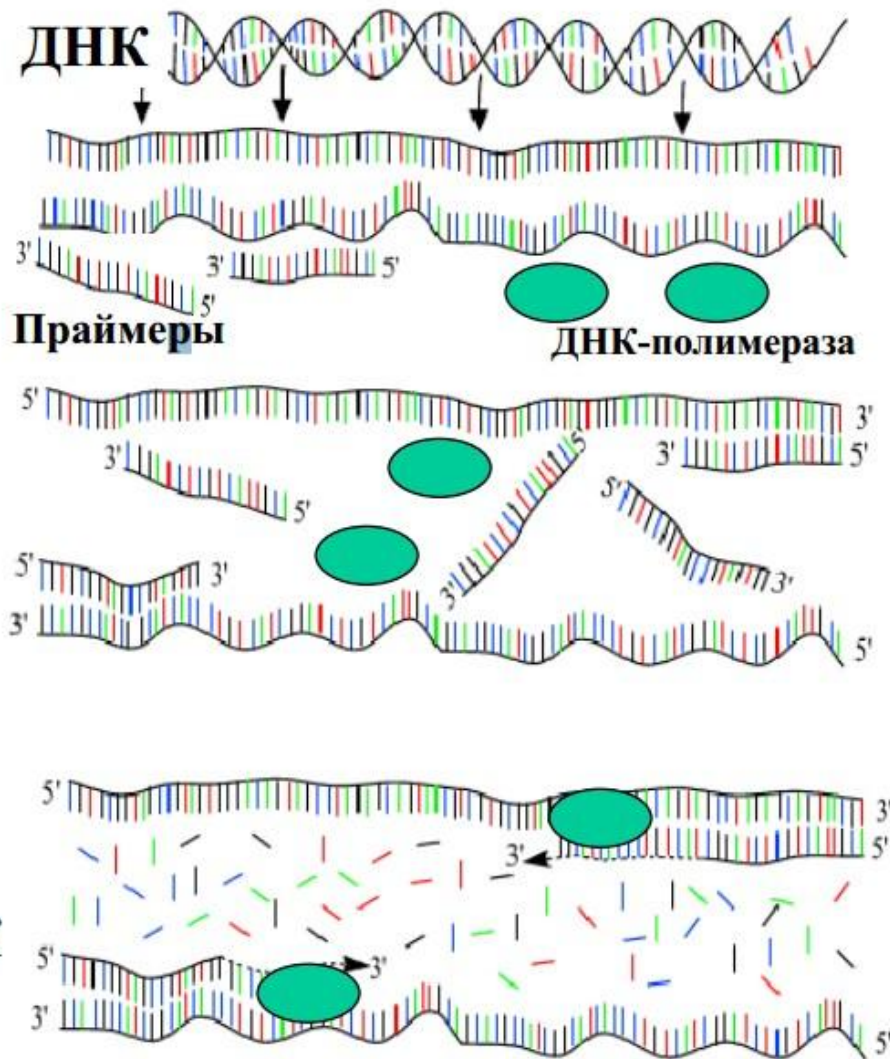
Денатурация ДНК
(95°C)



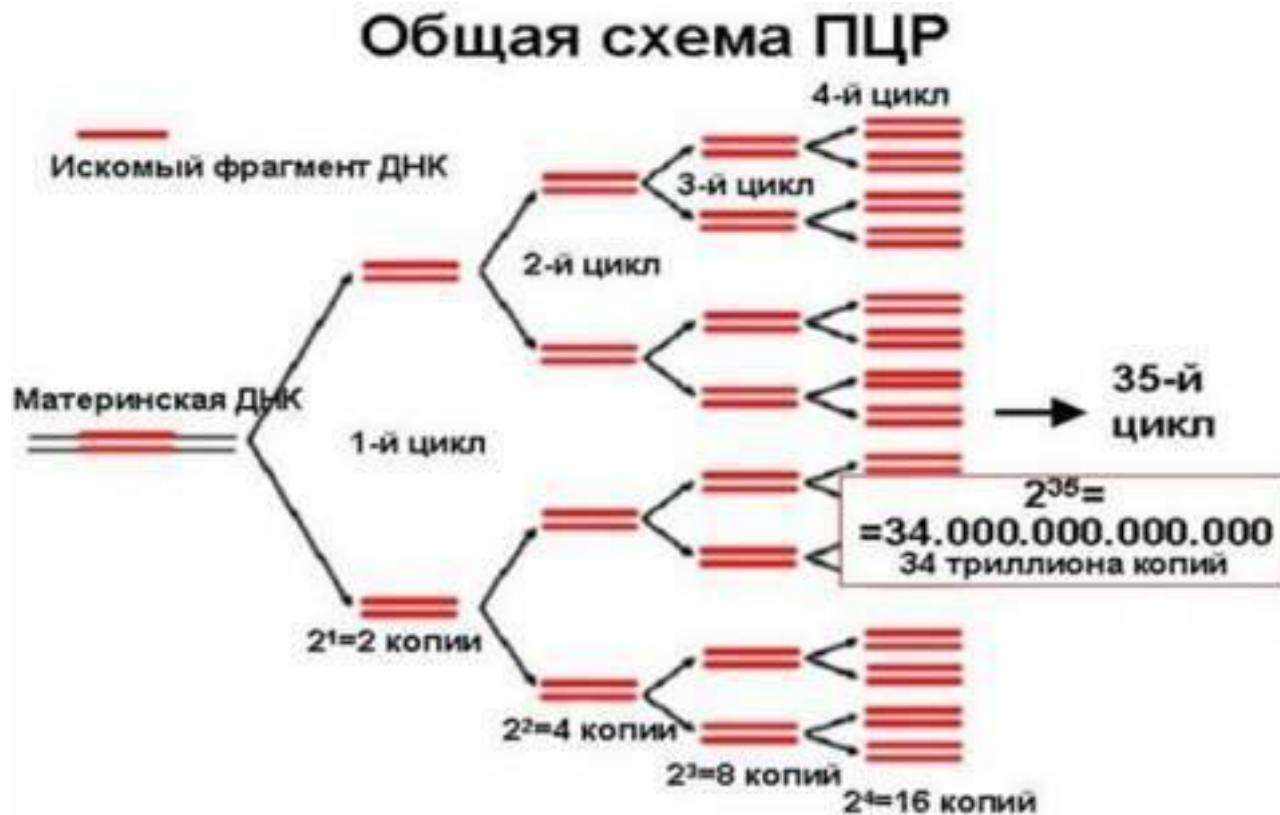
Отжиг праймеров
(55-65°C)



Полимеризация цепей ДНК
(72°C)



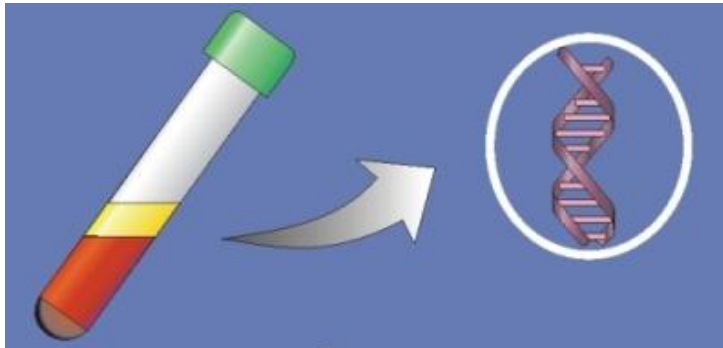
Принцип метода заключается в удвоении (амплификации) участка ДНК, ограниченного праймерами, при помощи фермента ДНК-полимеразы.



За каждый следующий цикл амплификации происходит удвоение как исходного участка ДНК, так и вновь синтезированных фрагментов (амплификатов).

Этапы классического ПЦР-анализа

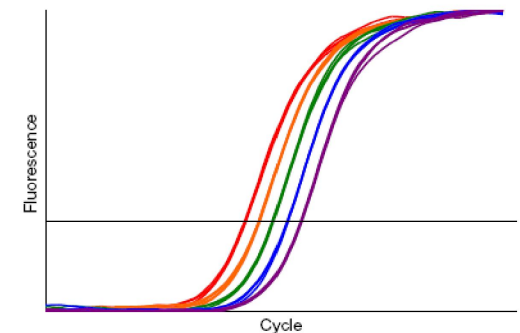
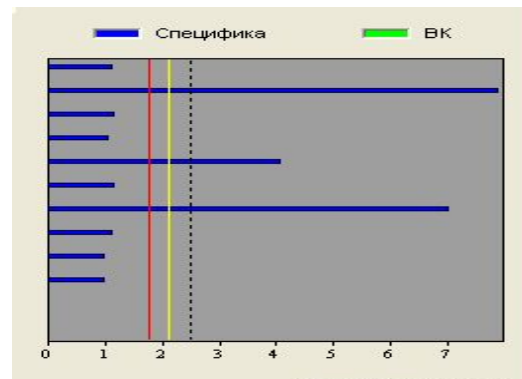
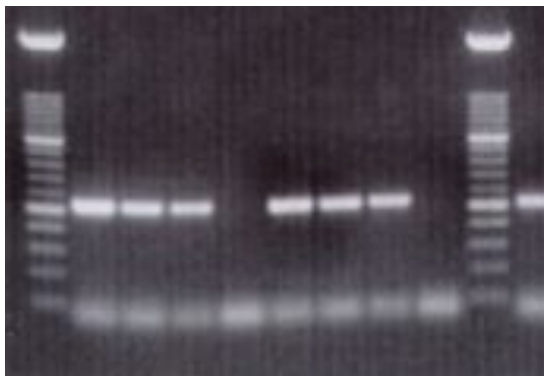
1. Пробоподготовка



2. Амплификация



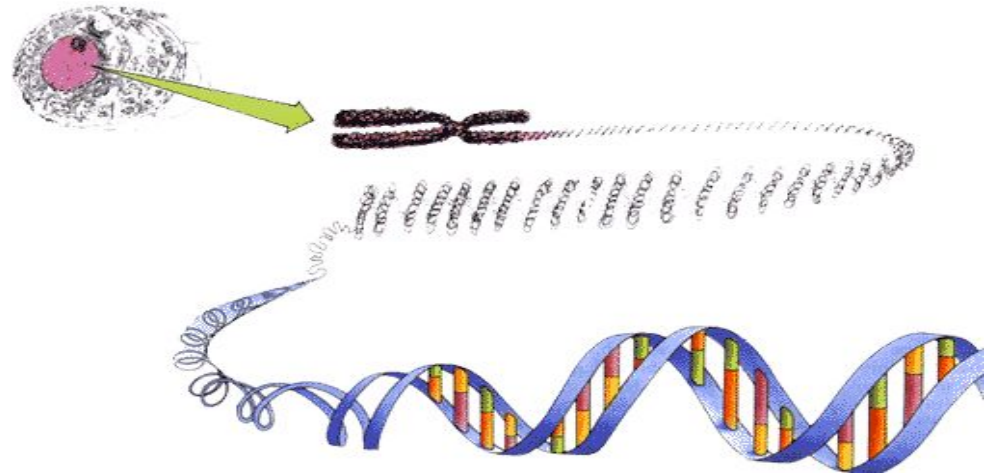
3. Детекция результатов



Пробоподготовка – выделение нуклеиновых кислот

Основные задачи

1. Максимальный выход НК
2. Удаление ингибиторов ПЦР
3. Удаление или ингибирование нуклеаз
4. Очистка НК



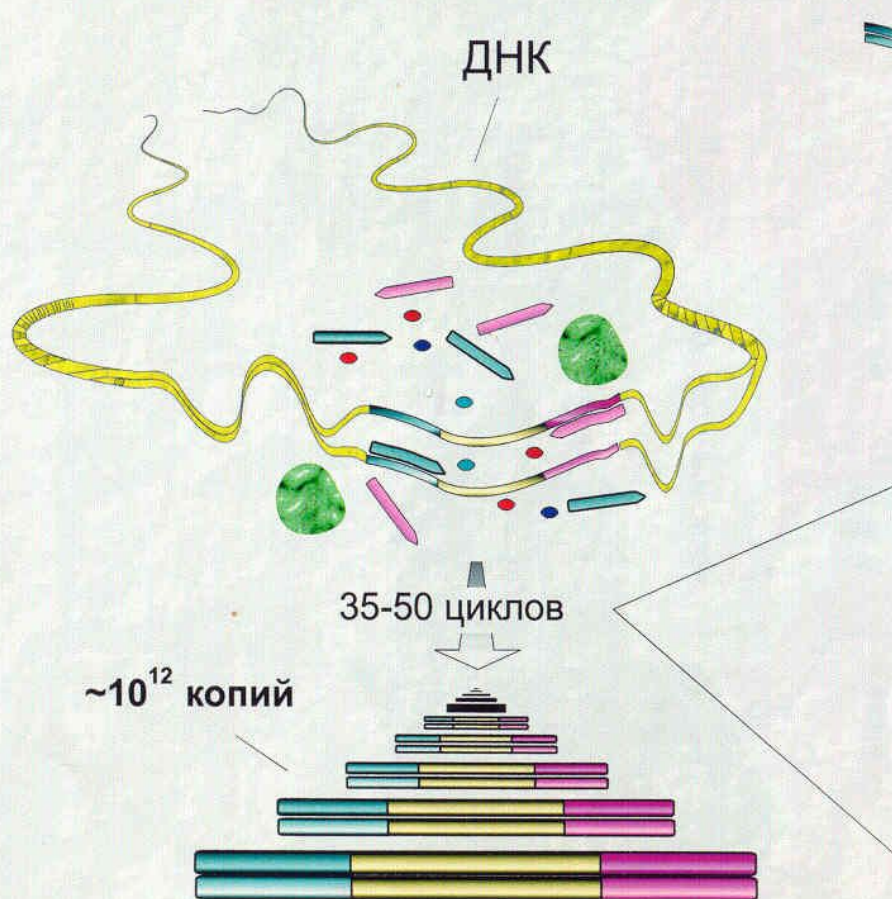
ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ:

- ЛИЗИС
- изоляция НК
- освобождение от ингибиторов
- элюция (переведение НК в раствор)

РЕПЛИКАЦИЯ

- 1) **Денатурация ДНК** (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК);
- 2) **Образование коротких двухцепочечных участков ДНК** (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК);
- 3) **Синтез новой цепи ДНК** (комплементарное достраивание обеих нитей)

Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР)

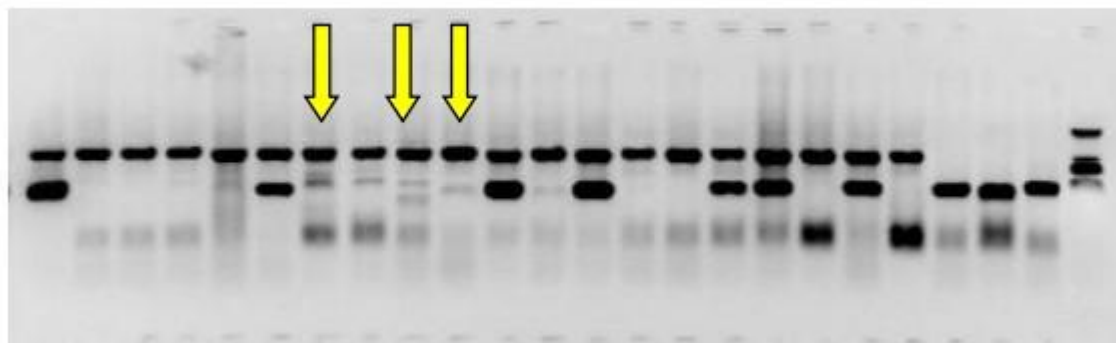


Детекция результатов ПЦР

- **Электрофорез в агарозном геле**
- Присутствие специфического ПЦР-продукта (ампликона) детектируют электрофоретическим разделением ПЦР-амплификационной смеси на окрашенном бромистым этидием агарозном или полиакриламидном гелях.
- Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением .
- Полосы визуализируют с помощью ультрафиолетового подсвечивания в трансиллюминаторе и последующим фотографированием. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждается ее положением (размерами) по отношению к маркерным фрагментам и ДНК-стандарту.

Проблема?

Субъективизм в интерпретации полученных данных, основанных на визуальном анализе электрофореграмм.

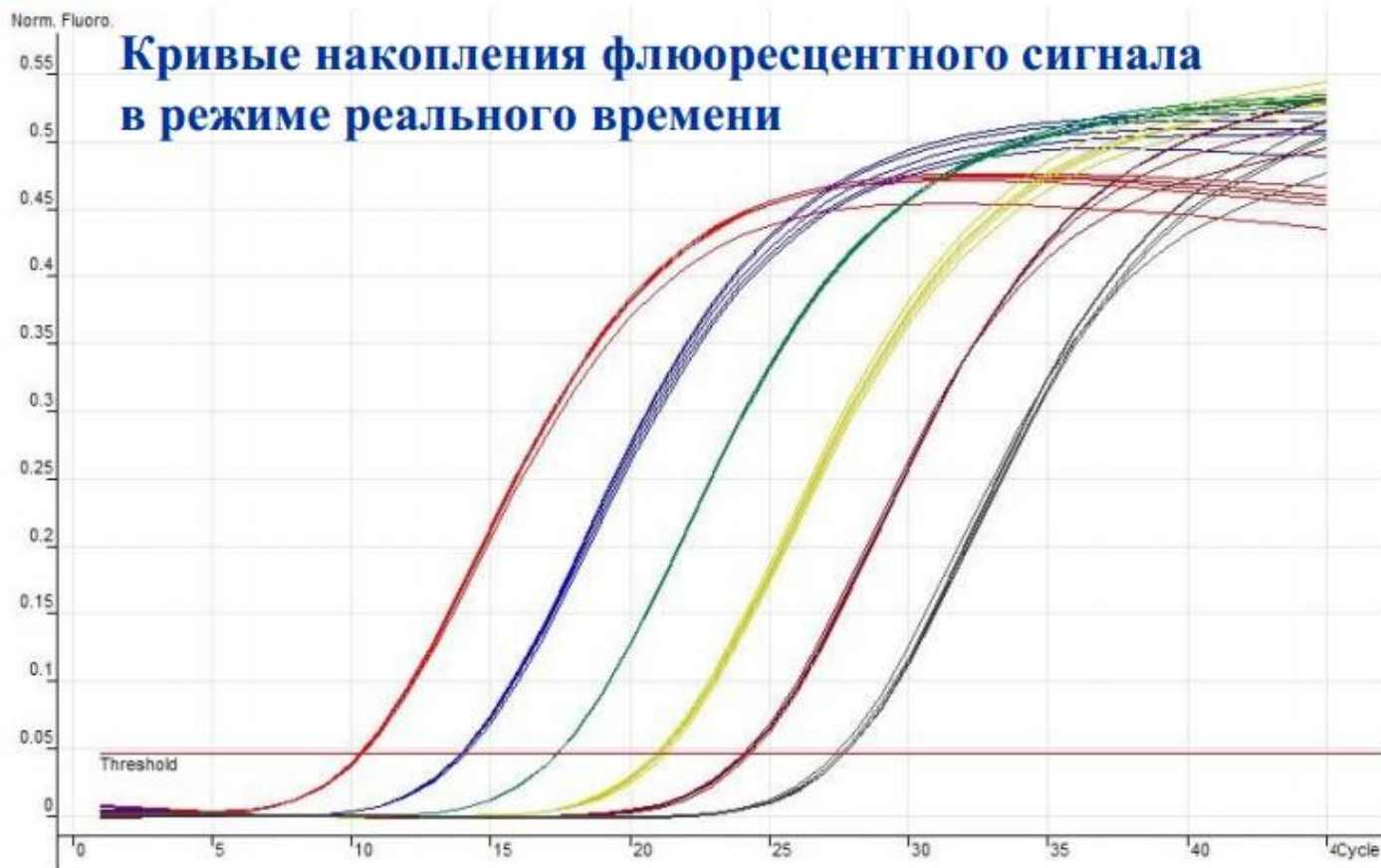


Детекция результатов ПЦР

- ***ПЦР в реальном времени***
- В этом методе используют флуоресцентно-меченые праймеры для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления;
-



Накопление флюоресцентного сигнала



Амплификаторы для Real-Time PCR



“ABI Prism 7000”

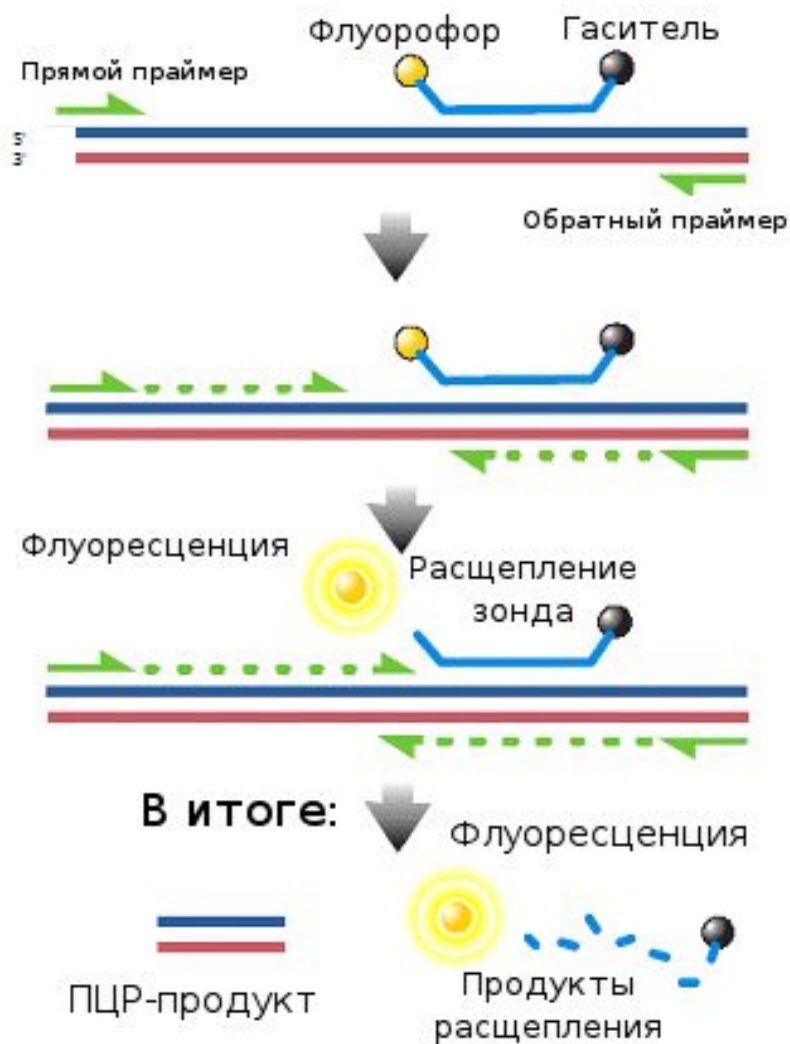


“RotorGene”



“iCycler iQ”



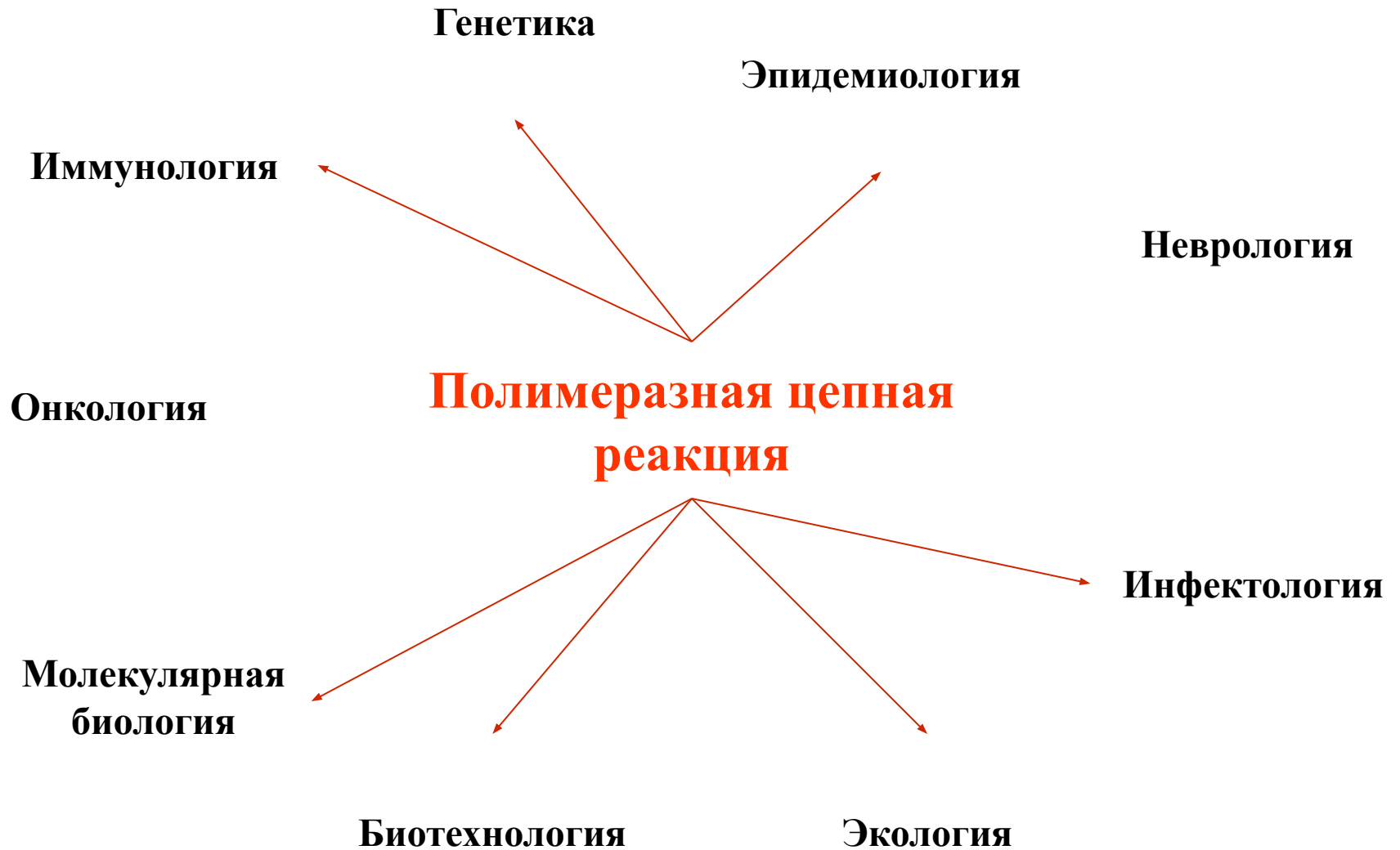


Метод выщепления флуорофора за счет разрушения зонда.

В этом случае в реакционной смеси должен присутствовать еще один компонент — специальный одноцепочечный ДНК-зонд: молекула ДНК, комплементарная последовательности амплифицируемого фрагмента, расположенной между праймерами. При этом к одному его концу должен быть химически приделан *флуорофор* (флуоресцирующая молекула), а к другому — *гаситель* (молекула, поглощающая энергию флуорофора и «гасящая» флуоресценцию). Когда такой зонд находится в растворе или комплементарно связан с целевой последовательностью, флуорофор и гаситель находятся относительно недалеко друг от друга, и флуоресценции не наблюдается. Однако за счет 3'-экзонуклеазной активности, которой обладает ДНК-полимераза (то есть она расщепляет ДНК, на которую «натыкается» в ходе синтеза, и на ее месте синтезирует новую), зонд при синтезе второй цепи разрушается, флуорофор и гаситель за счет диффузии удаляются друг от друга, и появляется флуоресценция.

В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ МОГУТ ВЫЯВЛЯТЬСЯ:

- *Chlamydia trachomatis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Ureaplasma urealyticum*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma fermentans*
- *Mycoplasma genitalium*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Gardnerella vaginalis*
- (*Trichomonas vaginalis*)
- *Neisseria gonorrhoeae*
- Herpesviridae type 1,2
- (Herpes human virus type 6)
- Cytomegalovirus
- Epstein-Barr virus
- ДНК вирусов папилломы человека (type 16, 31, 33, 35; 18, 39, 45, 59; 52, 56, 58, 66)
- virus Hepatitis A
- virus Hepatitis B .
- virus Hepatitis C
- virus Hepatitis D
- virus Hepatitis E
- virus Hepatitis G
- virus Hepatitis TT
- клещевой энцефалит
- краснуха
- острый энтерит новорожденных и детей раннего возраста
- *Treponema pallidum* (сифилис)
- *Mycobacterium tuberculosis* (туберкулез)
- *Helicobacter pylori*
- *Corinebacterium diptheriae*
- *Salmonella* spp.
- *Shigella* spp.
- *Campylobacter jejuni*
- И целый ряд других клинически значимых микроорганизмов



**Реакция гемагглютинации
(РГА) и
реакция торможения
гемагглютинации (РТГА)**

Реакция гемагглютинации (РГА) и реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

- В основе РГА лежит способность эритроцитов склеиваться при адсорбции на них определенных антигенов.
- В качестве исследуемого материала при гемагглютинации используют амниотическую жидкость, экстракты из культур или органов животных, зараженных вирусами, нативный инфекционный материал.
- РГА не является серологической, поскольку происходит без участия иммунной сыворотки и используется для выбора рабочего разведения антигена для постановки РТГА или наличия антигена (вируса) в исследуемом материале (например, при гриппе).
- При положительном результате РГА исследование продолжают, определяя тип выделенного вируса с помощью реакции торможения гемагглютинации типоспецифическими сыворотками.

реакция торможения гемагглютинации

- РТГА основана на свойстве антисыворотки подавлять вирусную гемагглютинацию, так как нейтрализованный специфичными антителами вирус утрачивает способность агглютинировать эритроциты.
- Для окончательного установления типовой принадлежности выделенного вируса и титрования антител в сыворотках ставят разворнутую РТГА в

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

метод идентификации вирусов или выявления
противовирусных антител в сыворотке крови больного.

в присутствии иммунной к вирусу сыворотки крови
агглютинация эритроцитов отсутствует

РЕАГЕНТЫ:

тестовая сыворотка
(содержащая или нет искомые
антитела- (Ab)- Y

вирус- 

дается время для протекания
реакции в растворе

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ОБР-Ц

АНТИТЕЛА К ВИРУСУ
ПРИСУТСТВУЮТ

**ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ ОБР-Ц**

АНТИТЕЛА К ВИРУСУ
ОТСУТСТВУЮТ

**РЕАГЕНТЫ:**

красные кровяные тельца
(эритроциты)
подходящего организма
(RBC) 

связывание гликопротеинов
оболочки вируса с RBC
ингибируется

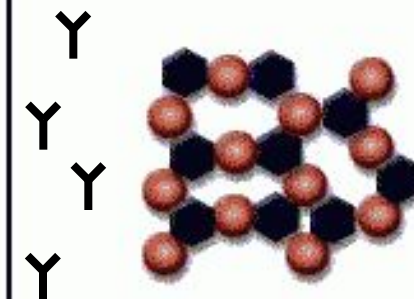
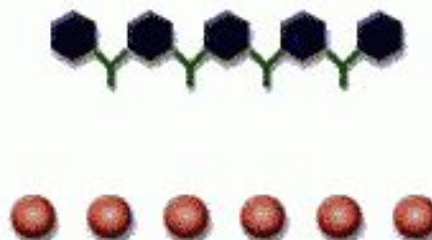


гликопротеины оболочки
вируса связываются с RBC

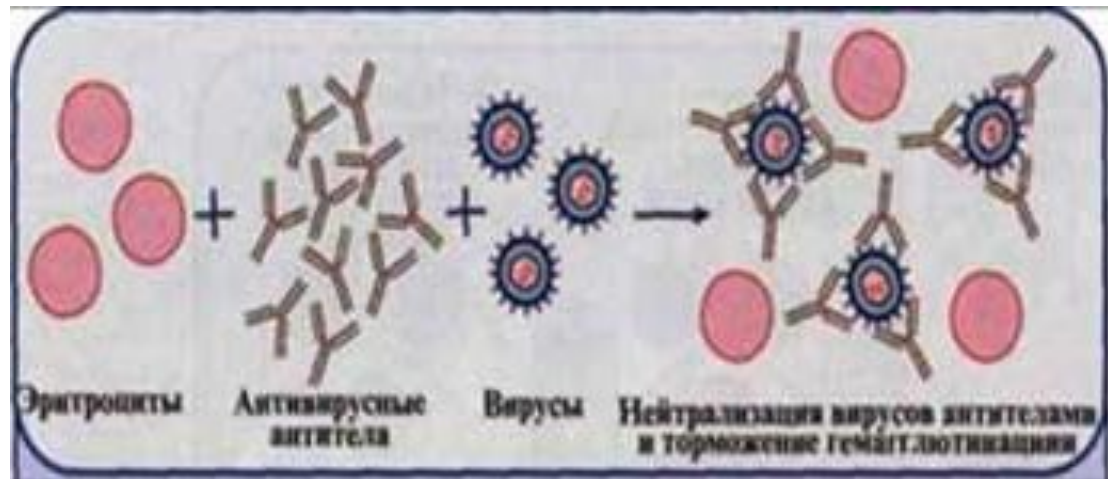
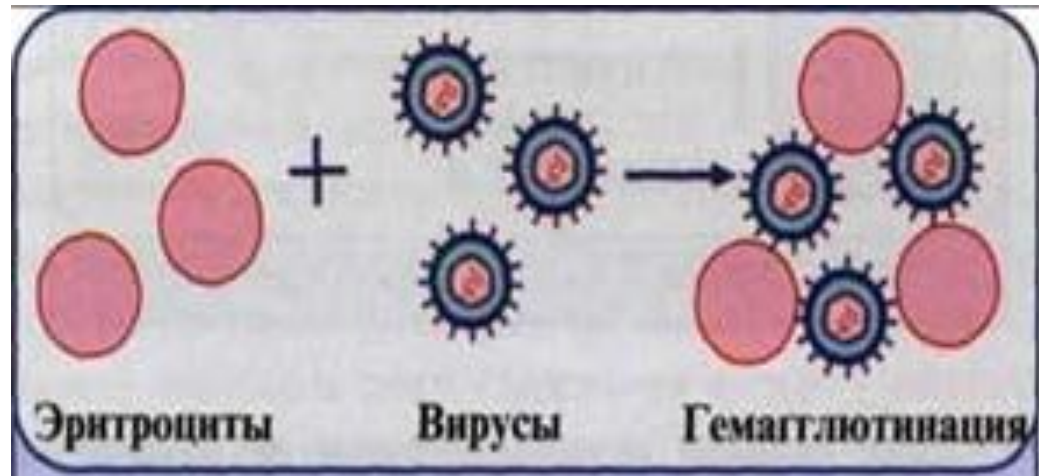


ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ-
ингибирование гем-агглютинации
эритроцитов антителами к вирусу

ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ- вирус
вызывает гем-агглютинацию
эритроцитов



Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) (схема)



Результаты РТГА при типировании вируса гриппа

Типификация по антигенности сыворотки	Разведение сыворотки					Контроль		
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	Сыворотки	Вируса	Эритроцитов
H1N1								
H1N1								
H3N2								

Результаты реакции учитывают по отсутствию гемагглютинации.

Условные обозначения:

: торможение гемагглютинации (пуговка);

: гемагглютинация (зонтик).

Исследуемый материал содержит вирус гриппа тип А с антигеном H3N2

Идентификация выделенного вируса в РТГА

Диагностическая сыворотка	Разведения сыворотки						Контроли		
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	Кс	Вир	Эрит.
H1N1									
H2N2									
H3N2									
B									

Результаты РТГА при типировании вируса гриппа

Типификация противогриппозной сыворотки	Разведение сыворотки					Контроль		
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	Сыворотки	Вируса	Эритроцитов
H1N1								
H1N1								
H3N2								

Результаты реакции учитывают по отсутствию гемагглютинации.

Условные обозначения:

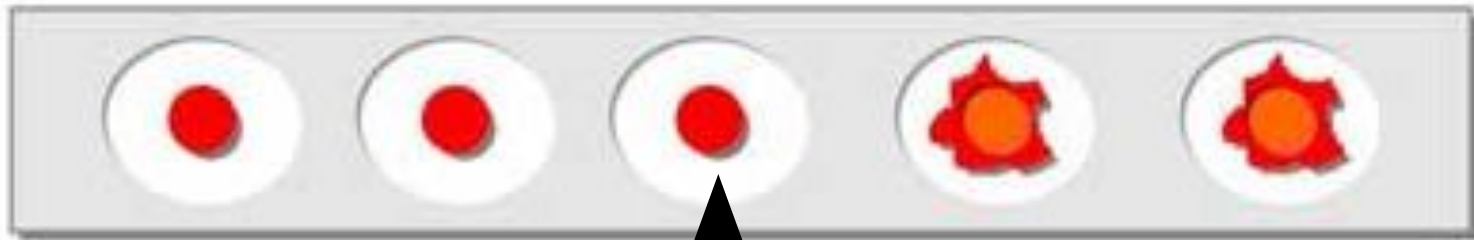
-  торможение гемагглютинации (пуговка) ;
-  гемагглютинация (зонтик).

Исследуемый материал содержит вирус гриппа тип А с антигеном H3N2

Определение титра антител крови больного по РТГА

Титр антител определяют по последней лунке с положительной РТГА.

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



титр антител равен 1:40.

Спасибо!!