

МИНОБРНАУКИ РОССИИ


Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Тульский государственный университет»

Медицинский институт

Кафедра санитарно-гигиенических и профилактических дисциплин

Утверждено на заседании кафедры  
«СГиПД»  
«16» января 2023 г., протокол № 6

Заведующий кафедрой

 Т.В. Честнова

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**  
**по проведению практических (семинарских) занятий**  
**по дисциплине (модулю)**  
***«Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – анализ в лабораторной***  
***практике»***

**основной профессиональной образовательной программы**  
**высшего образования – программа подготовки кадров высшей**  
**квалификации – ординатура**

по направлению подготовки (специальности)  
**31.08.05 – Клиническая лабораторная диагностика**

Идентификационный номер образовательной программы: 310805-01-23

Тула 2023 год

## Разработчик(и) методических указаний

Честнова Т.В., зав. кафедрой, д.б.н., доцент  
(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



---

(подпись)

Игнаткова А.С., доцент, к.м.н.  
(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



---

(подпись)

**Тема № 1. Общая классификация методов ИФА: анализ типа 1 и анализ типа 2; конкурентные и неконкурентные, гетерогенные и гомогенные, твердофазные и гомогенно-гетерогенные методы анализа.**

**Цель занятия:** познакомить ординаторов с различными методами иммуноферментного анализа и интерпретацией результатов.

**Программа занятия.**

1. Во введении преподаватель рассказывает о классификации методов ИФА: конкурентные и неконкурентные, гетерогенные и гомогенные, твердофазные и гомогенно-гетерогенные методы анализа. Гетерогенные методы ИФА антигенов и антител: методы, основанные на определении специфических иммунных комплексов; конкурентные и неконкурентные методы, основанные на определении оставшихся свободными центров специфического связывания. Методе гетерогенного ИФА, основанного на нековалентном способе введения ферментной метки. Твердофазный ИФА в проточных системах. Новые подходы в гетерогенном ИФА. Гомогенные методы ИФА: методы анализа антигенов, основанные на использовании меченных ферментом антигенов; методы ИФА антигенов, основанные на использовании неферментных меток. Люминесцентный иммуноанализ.

2. Преподаватель знакомит ординаторов с методами, оборудованием, реактивами, которые используют при проведении исследований методом ИФА.

3. Ординаторам предлагается решить тесты. Данная работа является итоговым контролем усвоения темы.

Сущность и классификация ИФА.

ИФА появился в середине 60-х годов и первоначально был разработан как метод для индикации антигена в гистологическом препарате, а также для визуализации линий преципитации в тесте иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза, а затем стал использоваться для количественного определения антигенов и антител в биологических жидкостях. В разработке метода принимали участие Е.Энгвалл и Р.Пэлман, а также независимо от них В. Ван Вееман и Р.Шурс.

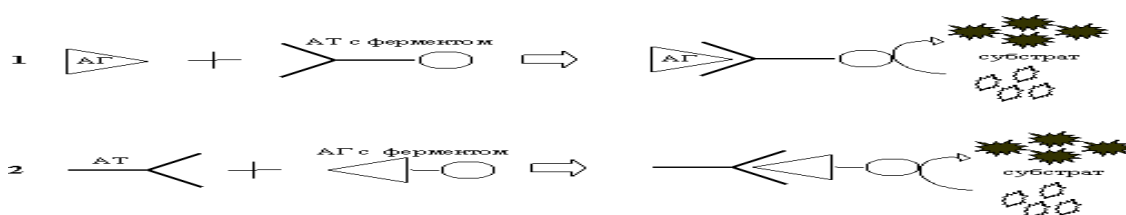


Рис. 1 Основной принцип ИФА:

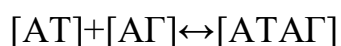
1. для выявления антигенов; 2) для выявления антител

Метод основан на специфическом связывании антитела с антигеном, при этом один из компонентов конъюгирован с ферментом, в результате реакции с соответствующим хромогенным субстратом образовывается окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически (рис. 6).

Открытие возможности иммобилизации антигена и антитела на различных носителях с сохранением их связывающей активности позволило расширить использование ИФА в различных областях биологии и медицины.

Появление моноклональных антител послужило дальнейшему развитию ИФА, что позволило повысить его чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов.

Теоретически ИФА основывается на данных современной иммунохимии и химической энзимологии, знании физико-химических закономерностей реакции антиген-антитело, а также на главных принципах аналитической химии. Чувствительность ИФА и время его проведения определяется несколькими основными факторами: кинетическими, термодинамическими характеристиками реакции антиген-антитело, соотношением реагентов, активностью фермента и разрешающей способностью методов его детекции. В общем виде реакция антиген-антитело может быть описана простой схемой:



Разнообразие объектов исследования от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, а также необычайно широкий круг задач, связанных с многообразием условий применения ИФА, обуславливают разработку чрезвычайно большого количества вариантов этого метода.

Любой вариант ИФА содержит 3 обязательные стадии:

1. стадия узнавания тестируемого соединения специфическим к нему антителом, что ведет к образованию иммунного комплекса;

2. стадия формирования связи конъюгата с иммунным комплексом или со свободными местами связывания;

3. стадия превращения ферментной метки в регистрируемый сигнал. В основу классификации методов ИФА положено несколько подходов:

1. По типу реагентов, присутствующих на первой стадии ИФА, различают конкурентный и неконкурентный методы.

А) В конкурентном ИФА на первой стадии в системе присутствуют одновременно анализируемое соединение и его аналог, меченный ферментом и конкурирующий за центры специфического связывания с ним.

Б) Для неконкурентных методов характерно присутствие в системе на первой стадии только анализируемого соединения и специфичных к нему центров связывания.

## 2. Все методы ИФА делятся на гомогенные и гетерогенные.

Если все три стадии ИФА проходят в растворе и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов, метод относится к группе гомогенных.

В основе гомогенного ИФА, применяемого, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций, лежит ингибирования активности фермента при его соединении с антигеном или антителом. Активность фермента восстанавливается в результате реакции антиген-антитело.

При связывании антитела с антигеном, содержащим ферментную метку, происходит ингибирование активности фермента на 95% по отношению к высокомолекулярному субстрату, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена связывается все больше антител и сохраняется все больше свободных конъюгатов антиген-фермент, способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат. Анализ проводят очень быстро, для одного определения требуется 1 минута. Чувствительность метода достаточно высока. С его помощью можно определить вещество на уровне пикомолей.

Для гетерогенных методом характерно проведение анализа в двухфазной системе с участием твердой фазы – носителя, и обязательная стадия разделения иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов (отмывка), которые находятся в разных фазах (образовавшиеся иммунные комплексы находятся на твердой фазе, а непрореагировавшие комплексы – в растворе). Гетерогенные методы, в которых формирование иммунных комплексов на первой стадии протекает на твердой фазе, называют твердофазными методами.

Методы относятся к гомогенно- гетерогенным, если 1 стадия – образование специфических комплексов происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу с иммобилизованным реагентом.

## 3. По принципу определения тестируемого вещества:

А) Прямое определение концентрации вещества (антигена или антитела) по числу провзаимодействующих с ним центров связывания. В этом случае ферментная метка будет находиться в образовавшемся специфическом комплексе АГ-АТ. Концентрация определяемого вещества будет прямо пропорциональна регистрируемому сигналу.

Б) Определение концентрации вещества по разности общего числа мест связывания и оставшихся свободными центров связывания. Концентрация

определяемого вещества при этом будет возрастать, а регистрируемый сигнал снижаться, следовательно, в данном случае прослеживается обратная зависимость от величины регистрируемого сигнала.

### Характеристика компонентов, используемых в ИФА.

#### Ферменты.

Ферментные метки обладают чрезвычайно мощным каталитическим действием, одна молекула фермента может реагировать с большим количеством молекул субстрата. Таким образом, фермент, присутствующий в ничтожных количествах, можно выявить и количественно определить по образованию продуктов, катализируемой им реакции. Другое преимущество применения ферментов в качестве меток обусловлено наличием в молекуле многочисленных функциональных групп (сульфгидрильных, карбоксильных, остатков тирамина и др.), через которые можно ковалентно присоединить молекулы лиганда.

Ферментные маркеры, используемые в ИФА, должны обладать следующими свойствами:

- высокая активность и стабильность фермента в условиях анализа, при модификации и в конъюгате с антителами или другими белками;
- наличие чувствительных субстратов и простота метода определения продуктов или субстратов ферментативной реакции;
- возможность адаптации субстратных систем к дальнейшему усилению;
- отсутствие фермента и его ингибиторов в исследуемой биологической жидкости.

В ИФА может использоваться не менее 15 различных ферментов. Наибольшее применение, в соответствии с вышеназванными требованиями, нашли пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза (ЩФ) и  $\beta$ -D-галактозидаза. Все три стабильны и катализируют высокочувствительные реакции. Кроме того, продукты, получаемые в результате реакций, катализируемых этими ферментами, в зависимости от используемого субстрата, могут выявляться не только колориметрическими методами, но также флуоресцентными методами. Другие ферменты используются значительно реже. Это объясняется их более низкой в сравнении с ПХ и ЩФ удельной активностью.

#### Субстраты.

Выбор субстрата в первую очередь определяется используемым в качестве метки ферментом, так как реакция фермент-субстрат высоко специфична.

Основные требования к субстрату:

- обеспечение высокой чувствительности метода при выявлении фермента в конъюгате;

– образование хорошо учитываемых (например, окрашенных) продуктов реакции фермент-субстрат;

– субстрат должен быть безопасным, дешевым, доступным и удобным для применения.

Чаще используют хромогенные субстраты, которые, разрушаясь, образуют окрашенное вещество. Перспективным является использование высокоэнергетических субстратов – флуоресцентных, хемилюминесцентных. Применение таких субстратов позволяет теоретически повысить чувствительность ИФА на два порядка.

#### Образование конъюгата.

Конъюгат – это антиген или антитело, меченные ферментной меткой. Образование конъюгата – один из важных этапов проведения ИФА.

При формировании конъюгата подбирают такой оптимальный метод введения ферментной метки, чтобы оба компонента конъюгата сохраняли свою биологическую активность: фермент - способность взаимодействовать с субстратом, а антиген или антитело - антигенность и антигенсвязывающую активность, соответственно. Наличие меченого, высокоочищенного антигена позволяет использовать конкурентные методы. В этом случае на конечном этапе можно измерять активность конъюгата, не связанного с иммобилизованными антителами, что позволяет избежать процедуры отмывки и делает анализ более удобным. Однако антигены разнообразны по своим физико-химическим свойствам и строению, а значит невозможно разработать универсальные методики для получения конъюгата с антигеном. В этом случае получение конъюгата антигена с ферментом представляет собой отдельную сложную задачу. Приготовление меченых антител для ИФА методически более доступно.

Конъюгирование фермента с иммунохимически активными белками производится различными методами: химическая сшивка, ковалентное связывание молекулы фермента с АГ или АТ и образование соединений через нековалентные связи, например, когда связь между ферментом и АГ или АТ осуществляется иммунологически, через взаимодействие антиген-антитело. Наиболее широкое распространение получили ковалентные способы приготовления конъюгатов. Выбор реакции связывания определяется типом доступных функциональных групп в данных белковых молекулах. В качестве реагентов, используемых для введения фермента в молекулы антигенов и антител, используют глутаровый альдегид, периодат натрия и др.

Существует одноэтапный и двухэтапный методы получения конъюгатов с помощью глутарового альдегида. Могут образовываться конъюгаты различных размеров с редуцированной ферментативной активностью (15 - 60 % от свободного фермента). Образовавшийся конъюгат больших размеров может

стерически затруднять определение тестируемого вещества. Конъюгаты с относительно низкой молекулярной массой состоят из Fab-фрагмента и одной молекулы фермента.

В результате двухэтапного синтеза, который заключается в поэтапном получении сначала модифицированного с помощью сшивающего агента фермента, его выделения, а затем последующем взаимодействии его с антигеном (антителом), образуются молекулы однородного состава, содержащие 1-2 молекулы фермента на молекулу иммуноглобулина и сохраняющие высокую ферментативную и иммунологическую активность. Однако количество таких образовавшихся конъюгатов невелико (для пероксидазы хрена составляет 5 - 10 %).

Наибольшее практическое применение нашел метод получения иммунопероксидазных конъюгатов, основанный на окислении углеводного компонента фермента периодатом натрия (связывание пероксидазы в конъюгат достигает 70-90 % от начального количества фермента).

Надежный конъюгат должен обладать следующими свойствами:

- высоким антительным титром и высокой афинностью к антигену, чтобы его можно было использовать в большом разведении, и, таким образом, уменьшить неспецифическое связывание;
- достаточной специфичностью в рабочем разведении;
- преобладанием мономерных форм над полимерными, т.к. полимерные формы имеют тенденцию к неспецифической адгезии на пластике, что приводит к высокому фоновому уровню реакции;
- оптимальным молярным соотношением между ферментом и антителами (оптимальное соотношение составляет около 1:1);
- достаточной ферментативной активностью конъюгата. Это свойство определяется главным образом условиями конъюгации и соотношением молекул фермента и антител в конъюгате.

#### Гетерогенные методы ИФА.

Гетерогенные ИФА (или твердофазные ИФА) включают методы, в которых анализируемое соединение находится в двух фазах. Для разделения компонентов иммунохимической реакции используют твердую фазу (нерастворимый носитель, как правило, пластик) с иммобилизованными на ней антителами или антигеном, которую отмывают на каждой стадии с целью удаления промежуточных продуктов непрореагировавших компонентов.

Иммобилизацию можно проводить путем ковалентного связывания антител (антигенов) с активированным носителем, используя химические подходы, а также путем физической адсорбции антител (антигенов) на поверхности твердых полимеров (например, полистирольных пластин). В зарубежной литературе это



направление получило название ELISA-тест или энзимсвязанный иммуносорбентный метод (от англ. enzyme-linked immunosorbent assay).

Неконкурентный ИФА определения антигенов на примере использования меченых ферментом специфических антител и иммобилизованных антител.

К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации образуется специфический комплекс антиген-антитело. Затем носитель отмывают от несвязавшихся антигенов и добавляют меченые антитела – конъюгат. При этом количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству антигена в исследуемом образце. После вторичной инкубации и удаления избытка конъюгата добавляют хромогенный субстрат для используемого фермента, который изменяет цвет под действием фермента, т. е. происходит ферментативная реакция с окрашиванием раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству меченых ферментом специфических антител, фермента и, соответственно, исследуемого антигена. Измерения оптической плотности раствора в лунках при определенной волне (в зависимости от используемого субстрата) проводят с помощью специальных спектрофотометров, адаптированных для микропланшетов – ридеров. Количественную оценку концентрации антигена в пробе определяют, сравнивая результаты с калибровочной кривой зависимости оптической плотности раствора от концентрации стандартного раствора антигена.

Иммобилизованные  
моноклональные  
антитела

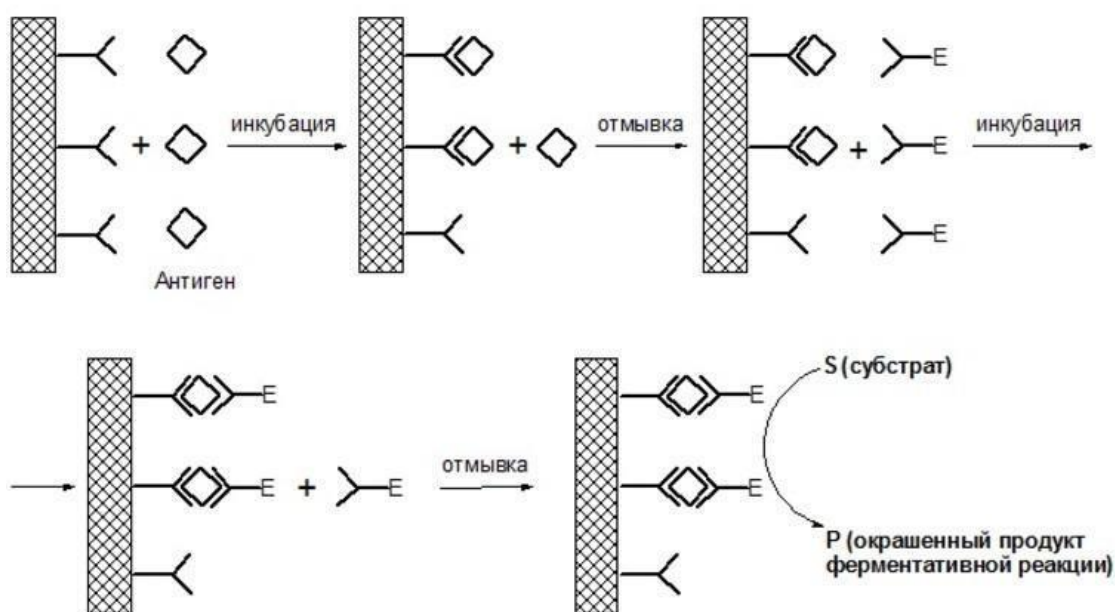


Рисунок 2.

Поскольку на стадии выявления специфического иммунокомплекса антиген оказывается связанным с молекулами иммобилизованных и меченых антител, в

литературе этот метод часто называют «сэндвич» - метод (от англ. sandwich) или двухцентровый метод ИФА (от англ. two-site assay).

Этот метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых имеется, по крайней мере, две антигенные детерминанты. Для анализа большого количества моновалентных антигенов (лекарственных соединений, пестицидов и др.) он неприемлем.

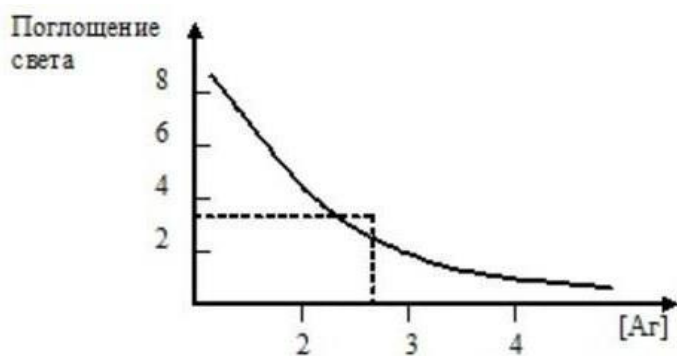
Основное достоинство данного метода – высокая чувствительность. Предел обнаружения соединений данным методом в настоящее время достигает величины порядка  $10^{-21}$  моль, что соответствует обнаружению в образце всего 600 молекул анализируемого вещества. Максимальная чувствительность достигается при проведении каждой иммунологической реакции в равновесном режиме, что сказывается на длительности проведения анализа, которая в среднем составляет 4 – 6 часов. Неконкурентный ИФА определения антител на примере использования меченых ферментом вторичных антител и иммобилизованных антигенов.

К иммобилизованному антигену добавляют исследуемую сыворотку. После инкубации и отмывания от несвязавшихся антител добавляют меченые вторичные антитела, которые специфичны к анализируемым антителам. После вторичной инкубации и удаления избытка меченых вторичных антител содержание ферментной метки на носителе пропорционально концентрации специфических антител в сыворотке.

Данная схема является одной из наиболее распространенных ИФА определения антител, поскольку позволяет выявлять антитела к разным антигенам.

Гетерогенный конкурентный ИФА определения антигена на примере использования меченого антигена и иммобилизованных антител.

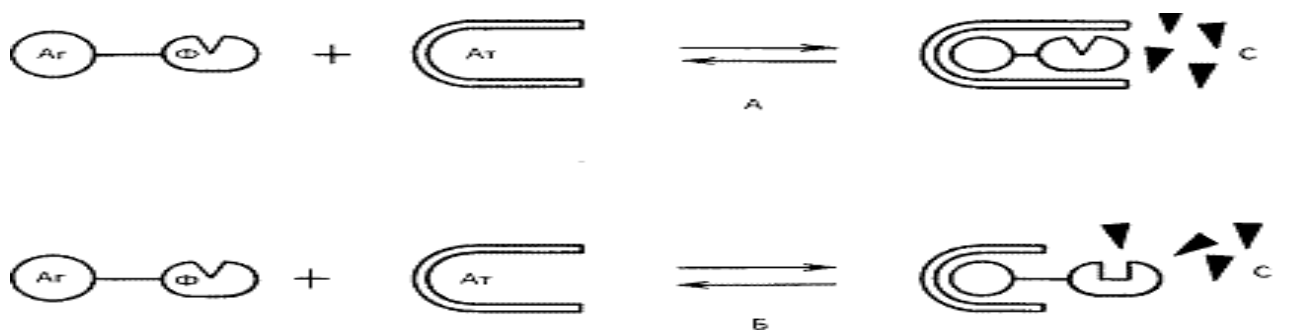
К иммобилизованным на носителе антителам добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген и фиксированную концентрацию конъюгата антигена с ферментом. После проведения инкубации носитель отмывают от несвязавшихся свободного и меченого антигена и регистрируют ферментативную активность на носителе, которая обратно пропорциональна концентрации определяемого антигена.



### Гомогенный метод ИФА.

Гомогенный иммуноферментный анализ (ГИФА) - наиболее простой в методическом отношении вид ИФА. При его постановке один из участников иммунной реакции (обычно это низкомолекулярный антиген) метится ферментом и за ходом формирования комплекса антиген-антитело следят, регистрируя изменение активности фермента.

Такое нарушение ферментативной активности может возникать либо за счет пространственного разобщения фермента и субстрата, либо за счет конформационных изменений в молекуле фермента, сопровождающих формирование иммунного комплекса. ГИФА имеет ряд существенных преимуществ перед другими иммунохимическими методами. Во-первых, высокая экспрессия (весь анализ с помощью ГИФА, занимает минуты и даже доли минут).



**Рис.3** Варианты гомогенного иммуноферментного анализа (А- эффект разобщения фермента (Ф) и субстрата (С) за счет стерических препятствий при взаимодействии антигена (Аг) и антитела (Ат); Б- эффект изменения конформации фермента при формировании комплекса антиген- антитело).

Во-вторых, метод имеет одну стадию и не требует трудоемких и требующих времени этапов промывки. И наконец, в-третьих, метод требует минимальных объемов (8-50 мкл) и количеств биологического или клинического образца. Однако у метода ГИФА имеется один крайне существенный недостаток - на его основе можно создавать диагностические тест-системы только для низкомолекулярных антигенов. Только, в этом случае антитело, взаимодействуя с антигеном, может эффективно экранировать или модифицировать связанную с

этим антигеном молекулу фермента. Именно в связи с этим, ( несмотря на кажущуюся простоту и очевидные преимущества перед другими методами, на основе ГИФА были созданы диагностикумы для выявления только гормонов, пептидов, лекарственных и наркотических веществ и некоторых низкомолекулярных белков.

«Сэндвич» - вариант ИФА для выявления антигенов.

Антигены, определяемые с помощью данного варианта ИФА, должны иметь несколько эпитопов, способных связывать антитела, или обладать повторяющимися, пространственно разделенными эпитопами одинаковой специфичности.

При проведении этого варианта ИФА высокоспецифичные поли- или моноклональные антитела, адсорбированные на твердой фазе, инкубируют с исследуемым образцом. После процедуры отмывания в лунки вносят меченные ферментом антитела (конъюгат) к тому же антигену и далее проводят все остальные этапы реакции. Эффективность образования специфического комплекса на каждой стадии анализа зависит от константы связывания реакции антиген-антитело.

**Тесты усвоения.**

Уровень	Вопрос	Эталон ответа
Исходный	<p><b>1. В лабораторию доставили три сыворотки крови: больного хроническим гепатитом В, переболевшего гепатитом В и больного с бессимптомным течением гепатита В. Какой антиген будет выявлен во всех сыворотках?</b></p> <p>A. HBsAg.  B. HBeAg.  C. HBcAg.  D. HBcAg и HBeAg.  E. HBcAg и HBsAg.</p>	A)
	<p><b>2. При обследовании донора, который длительное время не сдавал кровь, при помощи ИФА врач выявил антиHBs-антитела. О чем свидетельствует положительный результат ИФА?</b></p> <p>A. Человек переболел гепатитом В.</p>	A)

	<p><i>B. Об остром гепатите В.</i>  <i>C. Об остром гепатите С.</i>  <i>D. О хроническом гепатите В.</i>  <i>E. О хроническом гепатите С.</i></p> <p><b>3. В больницу доставили больного, пострадавшего в дорожно-транспортном происшествии. Пациенту срочно необходимо сделать переливание крови. При помощи какой реакции врач проверит донорскую кровь на наличие антигенов вируса гепатита В?</b></p> <p><i>A. Иммуноферментного анализа.</i>  <i>B. Реакции торможения гемагглютинации.</i>  <i>C. Реакции торможения гемадсорбции.</i>  <i>D. Реакции связывания комплемента.</i>  <i>E. Реакция иммобилизации.</i></p>	<i>A)</i>
<b>Итоговый</b>	<p><b>1. В сыворотке крови пациента при помощи иммуноферментного анализа врач выявил HBs-антиген. При каком заболевании выявляют этот антиген?</b></p> <p><i>A. Вирусном гепатите В.</i>  <i>B. Вирусном гепатите А.</i>  <i>C. СПИДе.</i>  <i>D. Туберкулезе.</i>  <i>E. Сифилисе.</i></p> <p><b>2. У больного желтушность, лихорадка, отсутствие аппетита, печень увеличена на 3см. Какую реакцию, в первую очередь, необходимо поставить для уточнения диагноза?</b></p> <p><i>A. ИФА для выявления HBs-антигена.</i>  <i>B. Реакцию Видаля.</i>  <i>C. Реакцию Вейгля.</i>  <i>D. Реакцию Вассермана.</i>  <i>E. РНГА с хламидийным диагностикумом.</i></p> <p><b>3. У 3-летнего ребенка врач отметил повышение температуры тела в</b></p>	<p><i>A)</i></p> <p><i>A)</i></p> <p><i>A)</i></p>

	<p><i>течение длительного периода, увеличение лимфатических узлов, в крови – значительное повышение количества лимфоцитов. При помощи ИФА вирусолог выявил вирус Эпштейна-Барр. Какой диагноз Вы поставите больному?</i></p> <p><i>А. Инфекционный мононуклеоз.</i></p> <p><i>В. Лимфома Бёркитта.</i></p> <p><i>С. Герпетическая аденопатия.</i></p> <p><i>Д. Генерализованная инфекция, вызванная herpes-zoster.</i></p> <p><i>Е. Цитомегаловирусная инфекция.</i></p> <p><b>4. При лабораторном исследовании сыворотки крови пациента при помощи ИФА вирусолог выявил антитела к ВИЧ. Какое дополнительное исследование вирусологу необходимо применить для подтверждения диагноза “ВИЧ-инфекция”?</b></p> <p><i>А. Исследование сыворотки крови при помощи иммуноблоттинга.</i></p> <p><i>В. Реакцию иммунофлуоресценции.</i></p> <p><i>С. Углубленное иммунологическое обследование.</i></p> <p><i>Д. Исследование сыворотки крови в реакции иммунодиффузии.</i></p> <p><i>Е. Электронно-микроскопическое исследование клеток крови.</i></p>	<p><i>А)</i></p>
--	---	------------------

#### **Наглядные пособия к занятию.**

1. Тест-системы
2. Оборудование для ИФА: пипеточные дозаторы, вошер, спектрофотометр

#### **Рекомендуемая литература.**

1. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики: для врачей и фельдшеров, оказыв. первичную мед.-санитарную помощь / А.А.Кишкун .— М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007 .— 800с. — ISBN 5-9704-0316-4 /в пер.
2. Меньшиков В.В. Руководство по клинической лабораторной диагностике / под ред.В.В.Меньшикова.— М.: Медицина, 1982 .— 576с.: ил. — Библиогр.в конце кн. — ISBN /в пер.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. Т.1 .— Минск: Беларусь, 2000 .— 495с. : ил. — /в пер.

4. Карпищенко А.И. Медицинская лабораторная диагностика:/Программы и алгоритмы: справочник / А.М.Чайка, А.И.Карпищенко, А.А.Бутко и др.; Под ред.А.И.Карпищенко .— СПб. : Интермедика, 1997 .— 304 с. : ил.

### **Дополнительная литература.**

1. Цынка Т.Ф. Диагностика заболеваний по анализам крови и мочи / Авт.-сост.Цынка Т.Ф. — 2-е изд. — Ростов-н/Д : Феникс, 2002 .— 128с. — (Медицина для вас).— Библиогр.в конце кн. — ISBN 5-222-02753-8
2. Вахрушев Я.М. Лабораторные методы диагностики : учеб. пособие / авт-сост. Я. М. Вахрушев, Е. Ю. Шкатова .— 2-е изд.— Ростов-н/Д: Феникс, 2007 .— 96 с.: ил.— (Медицина).— Библиогр.: с. 94 .— ISBN 978-5-222-12685-1.
3. Криницкий А.Ф. Врачебные клинко-биохимические исследования / А.Ф.Криницкий.- Киев: ГОСМЕДИЗДАТ УССР, 1960.— 137с.: ил. — Библиогр. в конце кн. — ISBN /в пер./: 45.00.

## **Тема № 2. Анализ результатов определения антигена. Особенности анализа экспериментальных данных определения антител. Источники ошибок при проведении ИФА. Параметры, характеризующие ИФА.**

**Цель занятия:** познакомить ординаторов с основными методами представления и обработки экспериментальных данных.

Продолжительность занятия – 3 часа.

### **Программа занятия.**

1. Во введении преподаватель объясняет результаты анализов определения антигена. Особенности анализа экспериментальных данных определения антител. Источники ошибок при проведении ИФА. Параметры, характеризующие ИФА: предел обнаружения, длительность, точность и специфичность. ИФА в диагностике гормональных заболеваний. ИФА в диагностике аллергических заболеваний.

2. Работа подразумевает предварительную подготовку ординаторов дома к занятию по соответствующим разделам учебников. На занятиях проводится проверка исходного уровня знаний ординаторов с использованием тестов.

3. Преподаватель знакомит ординаторов с методами, оборудованием, реактивами, которые используют при проведении исследований методом ИФА.

4. Ординаторам предлагается решить с тесты. Данная работа является итоговым контролем усвоения темы.

### **Тесты усвоения.**

Уровень	Вопрос	Эталон ответа
---------	--------	---------------

Исходный	<p><b>1. У больного с подозрением на ВИЧ-инфекцию при помощи иммуноблоттинга вирусолог выявил антитела к одному из белков ВИЧ – gp41. Полученный результат был оценен как сомнительный. Какое исследование вирусологу необходимо провести для подтверждения диагноза?</b></p> <p>A. ИФА.  B. Изучить иммунограмму.  C. РСК.  D. Реакцию радиоиммунопреципитации.  E. РНГА.</p> <p><b>2. Новорожденному врач поставил предварительный диагноз “врожденный токсоплазмоз”. У матери диагностирован токсоплазмоз. Выявление антител к токсоплазмам какого класса иммуноглобулинов может подтвердить диагноз у новорожденного?</b></p> <p>A. IgM.  B. IgA.  C. IgG.  D. IgD.  E. IgE.</p> <p><b>3. В лабораторию доставлены мазки-отпечатки из носовой полости больного с подозрением на грипп. Какое исследование должен провести вирусолог для идентификации вируса?</b></p> <p>A. Иммуноферментный анализ.  B. Реакцию агглютинации.  C. Реакцию преципитации.  D. Реакцию непрямой гемагглютинации.  E. Реакцию связывания комплемента.</p>	<p>B)</p> <p>A)</p> <p>A)</p>
Итоговый	<p><b>1. При обследовании молодого человека в Центре борьбы со СПИДом пациент получил положительный результат ИФА с антигенами ВИЧ. Жалобы на состояние</b></p>	<p>A)</p>



	<p><b>здоровья у больного отсутствуют. О чем свидетельствует положительный результат ИФА?</b></p> <p>А. Об инфицировании ВИЧ.  В. О заболевании СПИДом.  С. Об инфицировании возбудителем гепатита В.  D. О перенесенном заболевании СПИД.</p> <p>Е. О персистенции возбудителя гепатита В.</p> <p><b>2. В кабинет анонимного обследования на СПИД обратился пациент с просьбой обследовать его и установить, не инфицирован ли он ВИЧ-инфекцией. Какую реакцию вирусологу необходимо использовать для серодиагностики ВИЧ-инфекции?</b></p> <p>А. Иммуноферментный анализ.  В. Радиоиммунный анализ.  С. Полимеразно-цепную реакцию.  D. Иммунный электрофорез.  Е. Реакцию торможения гемагглютинации.</p> <p><b>3. Больной длительное время лечился от пневмонии неустановленной этиологии, резистентной к стандартной терапии. Из анамнеза врачу стало известно, что пациент длительное время был в служебной командировке в США. Будучи в командировке, получил травму, лечился в госпитале. После выздоровления вернулся на родину. Анализируя анамнез и клиническую картину заболевания, врач больному поставил предварительный диагноз "СПИД". Результаты какого исследования позволят подтвердить у пациента предварительный диагноз?</b></p> <p>А. Иммуноферментного анализа.  В. Реакции Видаля.  С. Реакции связывания комплемента.  D. Электронной микроскопии.  Е. РТГА (реакции торможения гемагглютинации).</p>	<p>А)</p> <p>А)</p>
--	---	---------------------

**Наглядные пособия к занятию.**

1. Тест-системы

## 2. Таблицы

### Рекомендуемая литература.

1. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики: для врачей и фельдшеров, оказыв. первичную мед.-санитарную помощь / А.А.Кишкун .— М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007 .— 800с. — ISBN 5-9704-0316-4 /в пер.
2. Меньшиков В.В. Руководство по клинической лабораторной диагностике / под ред.В.В.Меньшикова.— М.: Медицина, 1982 .— 576с.: ил. — Библиогр.в конце кн. — ISBN /в пер.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. Т.1 .— Минск: Беларусь, 2000 .— 495с. : ил. — /в пер.
4. Карпищенко А.И. Медицинская лабораторная диагностика:/Программы и алгоритмы: справочник / А.М.Чайка, А.И.Карпищенко, А.А.Бутко и др.; Под ред. А.И.Карпищенко .— СПб. : Интермедика, 1997 .— 304 с. : ил.

### Дополнительная литература.

1. Цылко Т.Ф. Диагностика заболеваний по анализам крови и мочи / Авт.-сост.Цылко Т.Ф. — 2-е изд. — Ростов-н/Д : Феникс, 2002 .— 128с. — (Медицина для вас).— Библиогр.в конце кн. — ISBN 5-222-02753-8
2. Вахрушев Я.М. Лабораторные методы диагностики : учеб. пособие / авт.-сост. Я. М. Вахрушев, Е. Ю. Шкатова .— 2-е изд.— Ростов-н/Д: Феникс, 2007 .— 96 с.: ил.— (Медицина).— Библиогр.: с. 94 .— ISBN 978-5-222-12685-1.
3. Криницкий А.Ф. Врачебные клинико-биохимические исследования / А.Ф.Криницкий.— Киев: ГОСМЕДИЗДАТ УССР, 1960 .— 137с.: ил. — Библиогр.в конце кн. — ISBN /В пер./: 45.00.

## Тема 3. Плавление ДНК. Отжиг олигонуклеотидных праймеров. Стадия элонгации. Роль GC состава ДНК-матрицы для поведения ПЦР.

**Цель занятия:** познакомить ординаторов с основными стадиями постановки ПЦР.

### Программа занятия.

1. Во введении преподаватель рассказывает о стадиях постановки ПЦР: плавление ДНК, отжиг олигонуклеотидных праймеров, стадии элонгации. Роль GC состава ДНК-матрицы для поведения ПЦР.
2. Работа подразумевает предварительную подготовку ординаторов дома к занятию по соответствующим разделам учебников. На занятиях проводится проверка исходного уровня знаний ординаторов с использованием тестов.
3. Ординаторам предлагается решить ситуационные задачи. Данная работа является итоговым контролем усвоения темы.

### Тесты усвоения.

Уровень	Вопрос	Эталон ответа
Исходный	<p><b>1. В организм экспериментального животного ученый ввел онкогенные РНК-вирусы. При помощи какого фермента будет осуществлена репликация их генома?</b></p> <p>А. РНК-зависимой ДНК-полимеразы.          В. ДНК-лигазы.          С. ДНК-полимеразы.          D. Транслоказы.</p>	А)
	<p><b>2. Какой белок-фермент ВИЧ обеспечивает обратную транскрипцию?</b></p> <p>А. Ревертаза.          В. РНК-полимераза.          С. Протеаза.          D. Интеграза.          E. Эндонуклеаза.</p>	А)
	<p><b>3. У пациента врач выявил инфицирование Т-лимфоцитов вирусом ВИЧ. Какой вирусный синтез катализирует фермент обратная транскриптаза (РНК-зависимая ДНК-полимераза)?</b></p> <p>А. ДНК на матрице вирусной РНК.          В. Вирусной ДНК на матрице ДНК.          С. ДНК на вирусной рРНК.          D. иРНК на матрице вирусного белка.          E. Вирусной иРНК на матрице ДНК.</p>	Д)
	<p><b>4. В лабораторию доставлены мазки-отпечатки из носовой полости больного с подозрением на грипп. Какое исследование должен провести вирусолог для идентификации вируса?</b></p> <p>А. Иммуноферментный анализ.          В. Реакцию агглютинации.          С. Реакцию преципитации.</p>	А)

	<p><i>D. Реакцию непрямой гемагглютинации.</i></p> <p><i>E. Реакцию связывания комплемента.</i></p>	
<b>Итоговый</b>	<p><b><i>1. В инфекционную больницу поступил больной с признаками пневмонии. Признаки заболевания проявились на 6-й день заболевания гриппом. Какое исследование с наибольшей достоверностью подтвердит гриппозную этиологию пневмонии?</i></b></p> <p><i>A. Выявление антигенов вируса гриппа в мокроте методом ИФА.</i></p> <p><i>B. Исследование парных сывороток.</i></p> <p><i>C. Заражение куриных эмбрионов.</i></p> <p><i>D. Иммунолюминесцентное исследование мазков-отпечатков из носовых ходов.</i></p> <p><i>E. Выявление антител против гемагглютининов вируса гриппа.</i></p> <p><b><i>2. После осмотра ребенка на вторые сутки от начала заболевания врач поставил больному предварительный диагноз “респираторно-синцитиальная инфекция”. Какое лабораторное исследование может подтвердить диагноз у данного ребенка в первые дни пребывания его в стационаре?</i></b></p> <p><i>A. Выявление антигенов вируса РС-инфекции в отделяемом из носоглотки.</i></p> <p><i>B. Серологическое обследование (четырёхкратное нарастание титра антител).</i></p> <p><i>C. Выявление IgA – антител в отделяемом из носоглотки.</i></p> <p><i>D. Выявление IgM – антител в отделяемом из носоглотки.</i></p> <p><i>E. Высокие титры антител в сыворотке пациента к антигенам вируса РС-инфекции.</i></p> <p><b><i>3. В материале от больного вирусолог</i></b></p>	<p><i>B)</i></p> <p><i>A), C)</i></p> <p><i>B)</i></p>

	<p><b>выявил РНК-вирусы кори. Какой фермент необходим для увеличения количества молекул вирусной РНК?</b></p> <p>А. РНК-зависимая РНК-полимераза.  В. Обратная транскриптаза.  С. ДНК-зависимая РНК-полимераза.  D. Транслоказа.  E. ДНК-лигаза.</p> <p><b>4. В родильном доме эпидемиолог зарегистрировал вспышку кори. Можно предположить, что дети, матери которых ранее переболели корью, не заболеют. Антитела какого класса обеспечат защиту новорожденных от заболевания?</b></p> <p>А. IgA.  В. IgG.  С. IgD.  D. IgM.  E. IgE.</p>	В)
--	---	----

#### **Наглядные пособия к занятию.**

1. Тест-системы
2. Таблицы

#### **Рекомендуемая литература.**

1. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики: для врачей и фельдшеров, оказыв. первичную мед.-санитарную помощь / А.А.Кишкун .— М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007 .— 800с. — ISBN 5-9704-0316-4 /в пер.
2. Меньшиков В.В. Руководство по клинической лабораторной диагностике / под ред.В.В.Меньшикова.— М.: Медицина, 1982 .— 576с.: ил. — Библиогр.в конце кн. — ISBN /в пер.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. Т.1 .— Минск: Беларусь, 2000 .— 495с.: ил. — /в пер.
4. Карпищенко А.И. Медицинская лабораторная диагностика:/Программы и алгоритмы: справочник / А.М.Чайка, А.И.Карпищенко, А.А.Бутко и др.; Под ред.А.И.Карпищенк .— СПб. : Интермедика, 1997 .— 304 с. : ил.

#### **Дополнительная литература.**



	<p><b>способным репродуцироваться без наличия HBsAg?</b></p> <p><i>A. Гепатит D.</i>  <i>B. Гепатит A.</i>  <i>C. Гепатит B.</i>  <i>D. Гепатит C.</i>  <i>E. Гепатит E.</i></p> <p><b>3. В инфекционную больницу госпитализирован больной с жалобами на общее недомогание, повышение температуры тела до 38°C, желтушность. Учитывая то, что несколько месяцев тому назад больному было сделано переливание крови, врач поставил пациенту предварительный диагноз “вирусный гепатит B”. Назовите основные методы лабораторной диагностики этого заболевания.</b></p> <p><i>A. Серологический и молекулярно-генетический.</i>  <i>B. Вирусологический: накопление вируса в культуре клеток и индикация возбудителя по ЦПД.</i>  <i>C. Выявление в крови вирионов при электронной микроскопии.</i>  <i>D. Вирусологический: идентификация вируса на лабораторных животных при помощи реакции нейтрализации.</i>  <i>E. Вирусологический: накопление вируса в курином эмбрионе.</i></p> <p><b>4. В лабораторию доставили три сыворотки крови: больного хроническим гепатитом B, переболевшего гепатитом B и больного с бессимптомным течением гепатита B. Какой антиген будет выявлен во всех сыворотках?</b></p> <p><i>A. HBsAg.</i></p>	<p><i>A)</i></p> <p><i>A)</i></p>
--	---	-----------------------------------

	<p><i>B. HBeAg.</i>  <i>C. HBcAg.</i>  <i>D. HBcAg и HBeAg.</i>  <i>E. HBcAg и HBsAg.</i></p> <p><b>5. В инфекционную больницу доставлен пациент с вирусным гепатитом А. Антитела какого класса будут синтезироваться первыми в ответ на действие возбудителя?</b></p> <p><i>A. IgM.</i>  <i>B. IgG.</i>  <i>C. IgA.</i>  <i>D. IgD.</i>  <i>E. IgE.</i></p>	A), C)
<b>Итоговый</b>	<p><b>1. Для диагностики у пациента генерализованной герпесвирусной инфекции вирусолог исследовал сыворотку крови для выявления специфических антител определенного класса. Антитела какого класса указывают на острую стадию вирусной инфекции?</b></p> <p><i>A. IgM.</i>  <i>B. IgA.</i>  <i>C. IgE.</i>  <i>D. IgG.</i>  <i>E. IgD.</i></p> <p><b>2. В связи с подозрением на цитомегаловирусную инфекцию вирусолог исследовал сыворотку крови новорожденного, в которой выявил специфические иммуноглобулины класса G. Антитела этого же класса вирусолог выявил и у матери. Антитела других классов ни у матери, ни у ребенка вирусолог не выявил. Как объяснить полученные результаты?</b></p> <p><i>A. Трансплацентарная передача антител.</i>  <i>B. Трансплацентарное инфицирование плода.</i>  <i>C. Иммунный ответ инфицированного плода.</i>  <i>D. Инфицирование новорожденного во</i></p>	<p>A)</p> <p>A)</p>



	<p>время родов.  Е. Дефект В-системы иммунитета новорожденного.</p> <p><b>3. У пациентки, которая получала иммунодепрессантную терапию в связи с системным заболеванием, появились признаки активации цитомегаловирусной инфекции. Какой тест необходимо использовать вирусологу для подтверждения диагноза?</b></p> <p>А. Выявление специфических IgM, используя ИФА.  В. Заражение белых мышей.  С. Исследование парных сывороток.  D. Исследование состояния клеточного иммунитета.  Е. Выявление уровня антител при помощи РН.</p> <p><b>4. У студента, госпитализированного в инфекционную больницу на вторые сутки заболевания, врач заподозрил инфекционный мононуклеоз. Результат какого лабораторного исследования подтвердит у пациента диагноз в день его госпитализации?</b></p> <p>А. Выявление IgM – антител против вируса Эпштейна-Барр.  В. Выявление антител против цитомегаловируса.  С. Выделение вируса герпеса.  D. Выявление четырехкратного увеличения титра антител против вируса Эпштейна-Барр.  Е. Выявление IgM – антител против вируса простого герпеса.</p> <p><b>5. При вирусологическом исследовании материала от 15-летнего больного, у которого врач заподозрил инфекционный мононуклеоз, вирусолог выявил вирус Эпштейна-Барр. Какая последовательность репродукции ДНК-содержащих вирусов в клетке является верной?</b></p> <p>А. Депротеинизация, транскрипция,</p>	<p>A)</p> <p>A)</p> <p>A)</p>
--	---	-------------------------------

	<p>синтез белка, синтез вирусной ДНК.  <i>В.</i> Депротеинизация, синтез белка, транскрипция, синтез вирусной ДНК.  <i>С.</i> Транскрипция, синтез белка, депротеинизация, синтез вирусной ДНК.  <i>Д.</i> Синтез белка, депротеинизация, транскрипция, синтез вирусной ДНК.  <i>Е.</i> Ни одна из указанных.</p> <p><b>6. Какое из заболеваний вызывает ДНК-геномный вирус?</b>  <i>А.</i> Аденовирусную инфекцию.  <i>В.</i> СПИД.  <i>С.</i> Респираторно-синцитиальную инфекцию.  <i>Д.</i> Грипп.  <i>Е.</i> Парагрипп.</p>	<i>А)</i>
--	--	-----------

### Наглядные пособия к занятию.

1. Тест-системы
2. Таблицы

### Рекомендуемая литература.

1. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики : для врачей и фельдшеров, оказыв. первичную мед.-санитарную помощь / А.А.Кишкун .— М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007 .— 800с. — ISBN 5-9704-0316-4 /в пер.
2. Меньшиков В.В. Руководство по клинической лабораторной диагностике / под ред. В.В.Меньшикова.— М.: Медицина, 1982 .— 576с.: ил. — Библиогр. в конце кн. — ISBN /в пер.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. Т.1 .— Минск: Беларусь, 2000 .— 495с.: ил. — /в пер.
4. Карпищенко А.И. Медицинская лабораторная диагностика: Программы и алгоритмы : справочник / А.М.Чайка, А.И.Карпищенко, А.А.Бутко и др.; Под ред. А.И.Карпищенко.— СПб. : Интермедика, 1997 .— 304 с. : ил.

### Дополнительная литература.

1. Цынка Т.Ф. Диагностика заболеваний по анализам крови и мочи / Авт.-сост.Цынка Т.Ф. — 2-е изд. — Ростов-н/Д: Феникс, 2002 .— 128с. — (Медицина для вас).— Библиогр.в конце кн. — ISBN 5-222-02753-8
2. Вахрушев Я.М. Лабораторные методы диагностики : учеб. пособие / авт.-сост. Я. М. Вахрушев, Е. Ю. Шкатова .— 2-е изд.— Ростов-н/Д: Феникс, 2007.— 96 с.: ил.— (Медицина).— Библиогр.: с. 94 .— ISBN 978-5-222-12685-1.

3. Криницкий А.Ф. Врачебные клинко-биохимические исследования / А.Ф.Криницкий.— Киев: ГОСМЕДИЗДАТ УССР, 1960 .— 137с.: ил. — Библиогр.в конце кн. — ISBN /в пер./: 45.00.