**День 1**

Общие **правила техники безопасности в лаборатории.**

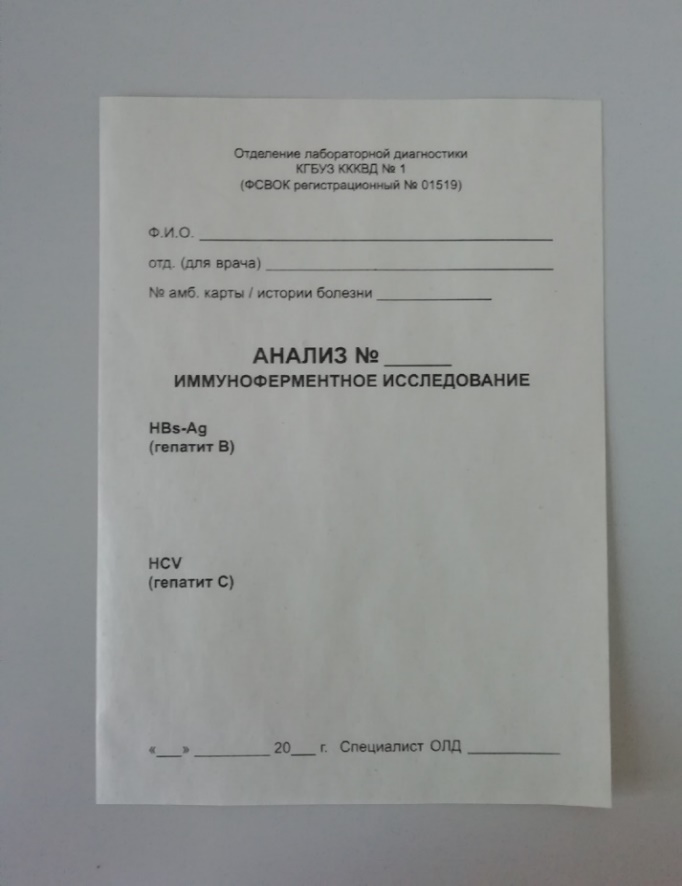
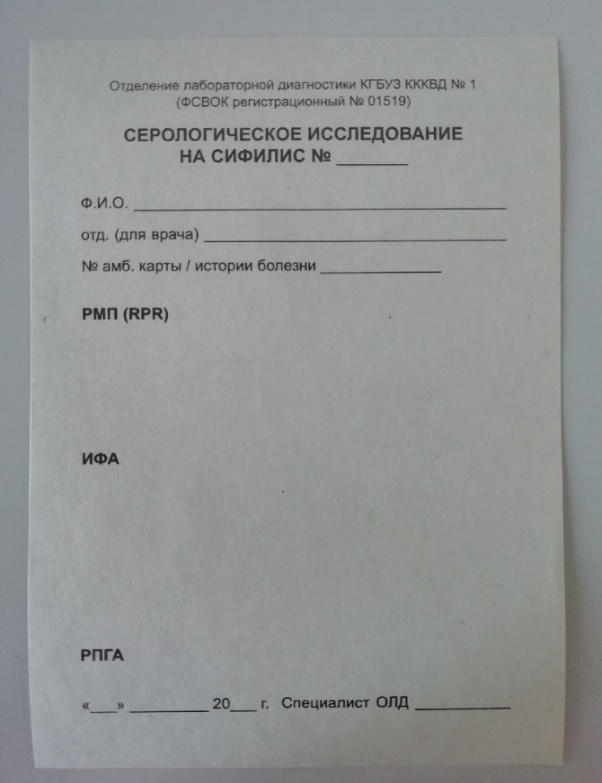
1. Работать в лаборатории необходимо в халате, защищая одежду и кожу от попадания и разъедания реактивами и обсемененности микроорганизмами.
2. Каждый должен работать на закрепленном за ним рабочем месте. Переход на другое место без разрешения преподавателя не допускается.
3. Рабочее место следует поддерживать в чистоте, не загромождать его посудой и побочными вещами.
4. Студентам запрещается работать в лаборатории без присутствия преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время без разрешения преподавателя.
5. До выполнения каждой лабораторной работы можно приступить только после получения инструктажа по технике безопасности и разрешения преподавателя.
6. Приступая к работе, необходимо: осознать методику работы, правила ее безопасного выполнения; проверить соответствие взятых веществ тем веществам, которые указаны в методике работы.
7. Опыт необходимо проводить в точном соответствии с его описанием в методических указаниях, особенно придерживаться очередности добавления реактивов.
8. Для выполнения опыта пользоваться только чистой, сухой лабораторной посудой; для отмеривания каждого реактива нужно иметь мерную посуду (пипетки, бюретки, мензурку, мерный цилиндр или мерный стакан); не следует выливать избыток налитого в пробирку реактива обратно в емкость, чтобы не испортить реактив.
9. Если в ходе опыта требуется нагревание реакционной смеси, надо следовать предусмотренным методическим указаниям способа нагрева: на водяной бане, на электроплитке или на газовой горелке и др. Сильно летучие горючие вещества опасно нагревать на открытом огне.
10. Пролитые на пол и стол химические вещества обезвреживают и убирают под руководством лаборанта (преподавателя) в соответствии с правилами.
11. При работе в лаборатории следует соблюдать следующие требования: выполнять работу нужно аккуратно, добросовестно, внимательно, экономно, быть наблюдательным, рационально и правильно использовать время, отведенное для работы.

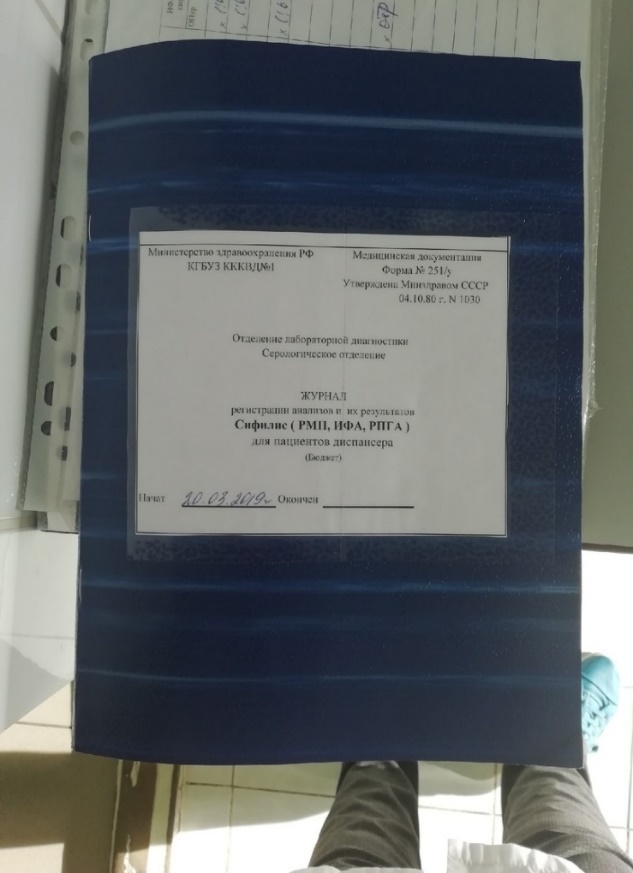
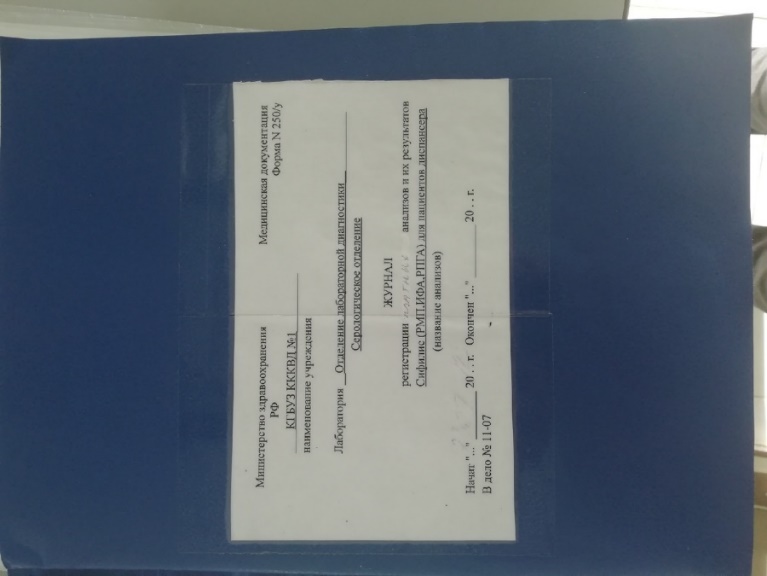
**День 2 (**1.04.19)

Состав помещений КДЛ

|  |  |
| --- | --- |
| Вид помещения (зоны)  Чистая зона | Назначение   1. Кабинет заведующего 2. Кабинет старшего лаборанта 3. Кабинет для хранения реактивов для исследования 4. Моечная 5. Комната для приема пищи 6. Помещение для хранения уборочного инвентаря |
| Грязная зона | 1. Кабинет ИФА исследований 2. Кабинет ПЦР, РПГА исследований 3. Кабинет проточной цитометрии 4. Кабинет для регистрации поступившего материала 5. Санузел 6. Душевая |

Прием и регистрация биоматериала.

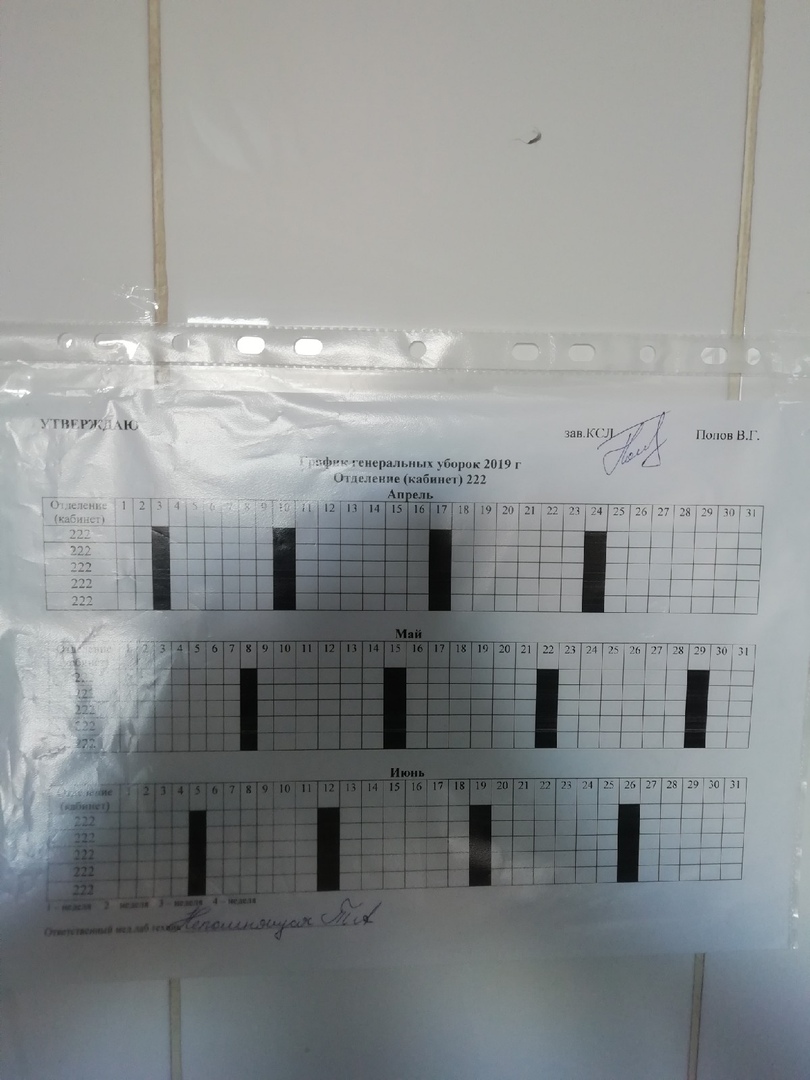
 

Для утилизации материала и лабораторной посуды стоят контейнеры:



График генеральных уборок 2019 г.



**День 3** (2.04.19)

Серодиагностика сифилиса РПГА-тест

Назначение:

Набор Сифилис-РПГА-тест предназначен для качественного и полуколичественного определения антител к Treponema pallidum в сыворотке (плазме) крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) человека с помощью реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) при "ручной" постановке реакции и визуальном учете результатов и при использовании аппаратно-программных комплексов "Критерий-2", "Эксперт-Лаб", ридеров типа Anthos LP400, MRX, MR7000, Dynateh MRXII и автоматических анализаторов типа Olimpus РК 3000.

Характеристика набора:

1. Набор выпускается в двух вариантах комплектации. Комплект №1 – для качественного исследования. Комплект №2 – для качественного и полуколичественного исследования.

2. Антигены – лизатные (инактивированные Treponema pallidum (штамм Nicols)

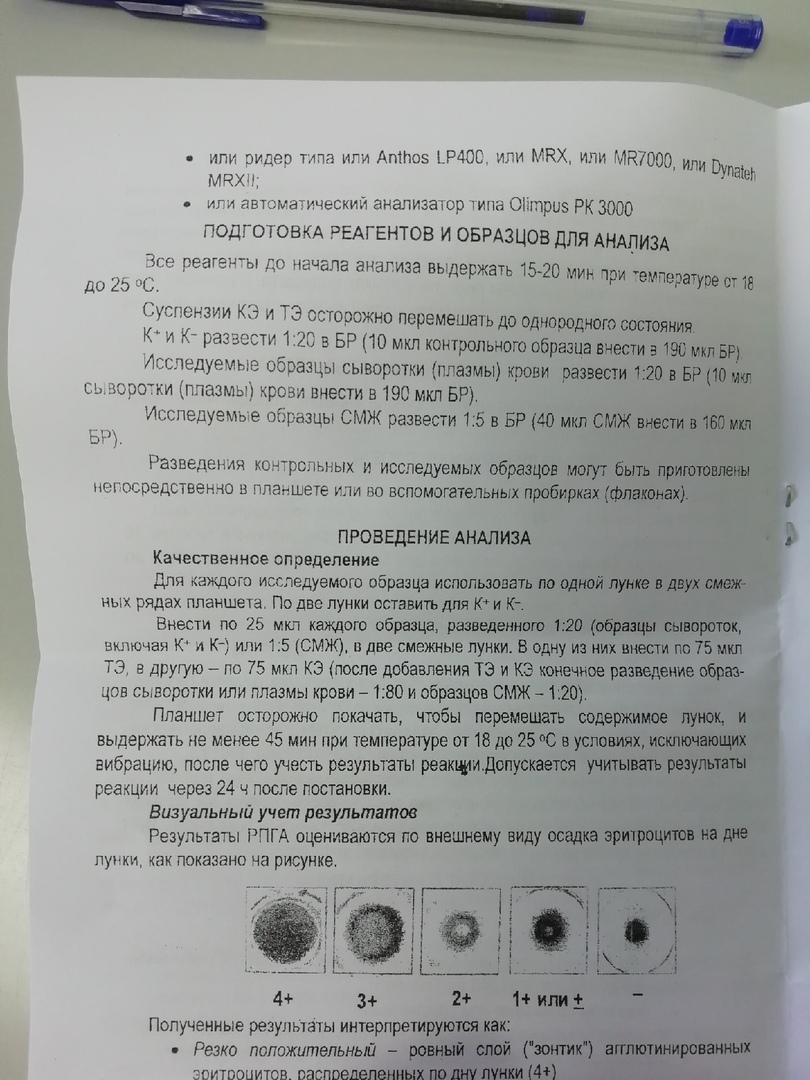
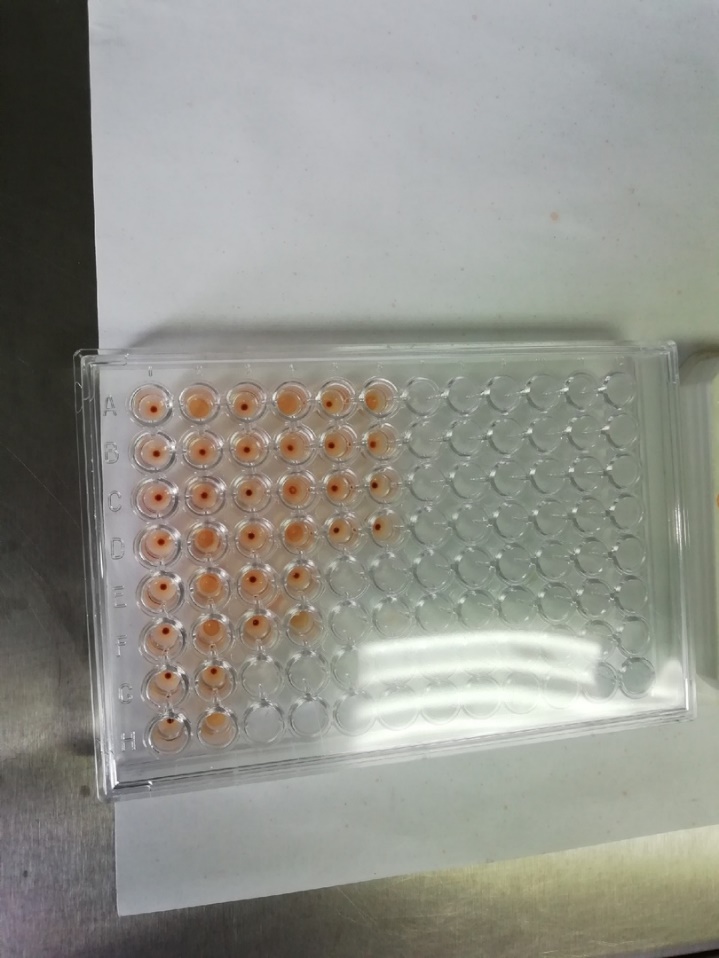
3. Время постановки – 40-45 мин.

4. Срок годности 18 мес.

5. Аналитическая чувствительность 0,05 МЕ/мл

6. В набор вкладываются карточки по интерпретации результатов.

7. Учет результатов – как визуальный, так и с помощью аппаратно-программных комплексов



**День 4** (03.04.19)

Работа на анализаторе «Лазурит»

Автоматический иммуноферментный анализатор Dynex Лазурит:

Назначение: Анализаторы иммуноферментные автоматические «Lazurite» предназначены для измерения оптической плотности жидких проб в 96-луночном планшете при проведении иммуноферментных исследований.

* Количество образцов: 100
* Возможна дозагрузка: реагенты, калибраторы, микропланшеты, наконечники.
* Пробирки для образцов: высота 40–100 мм, диаметр 10 –16 мм
* Пробирки для реагентов: 8 по 25 мл, 10 по 15 мл
* Разведение: 12 8-луночных глубоких стрипов
* Загрузка наконечников: 216 для образцов, 20 для реагентов
* Количество методик на 1 планшет: 12, при совпадении протоколов
* Автоматическая проверка перед запуском системы
* Габариты: 540 680 660 мм
* Вес: 48 кг

Описание:

Принцип действия анализаторов основан на измерении отношения интенсивности потока излучения, прошедшего через измеряемый образец, и потока, падающего на образец. Модуль предварительной подготовки образцов состоит из пипетирующего манипулятора и транспортирующей каретки, модуля идентификации и рабочего стола. Пипетирующий манипулятор используется для раскапывания жидкостей различного объема в микропланшеты. Транспортирующая каретка служит для переноса микропланшет на различные позиции на рабочем столе.

Иммуноферментный блок обеспечивает горизонтальное перемещение планшета и предназначен для измерения оптической плотности жидких проб. Источником излучения служит галогеновая лампа, приемником излучения служит линейка кремниевых фотодиодов, перекрывающая спектральный диапазон от 405 до 690 нм. Управление и обработка результатов измерения анализатора производится с внешнего ПК

Заполнение документации иммунологической лаборатории:

1. Журнал регистрации поступивших анализов и их  
   результатов.
2. Заполнение бланков анализов.

Серодиагностика сифилиса (для выявления антител к кардиолипиновому антигену в реакции флоккуляции) RPR-тест.

Качественное определение.

Ход работы:

Микропипеткой нанести по 50 мкл К+, К- и исследуемых образцов на ячейки одноразовой карточки (одна ячейка на образец). Распределить жидкость по всей поверхности ячейки наконечником микропипетки. Для каждого образца использовать отдельный наконечник.

При работе с карточками нельзя прикасаться пальцами к ячейкам!

Нанести на все ячейки по одной капле (около 16 мкл) RPR антигена. Карточки поместить на платформу орбитального шейкера и вращать в горизонтальной плоскости 8 мин со скоростью 180 об/мин. Сразу же после этого произвести учет результатов.

Исследование К+ и К- необходимо проводить с каждой серией исследуемых образцов.

Учет результатов.

Положительная реакция – в пробе видны большие, средние или мелкие агрегаты.

Отрицательная реакция- видимые агрегаты в пробе отсутствуют.



**День 5** (4.04.19)

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)

Сущность явления люминесценции заключается в том, что при поглощении различных видов энергии (световой, электрической и др.) молекулами некоторых веществ их атомы переходят в возбужденное состояние, а затем, возвращаясь в исходное состояние, выделяют поглощенную энергию в виде светового излучения.

В РИФ люминесценция проявляется в виде флуоресценции — это свечение, возникающее в момент облучения возбуждающим светом и прекращающееся сразу после его окончания.

Метод РИФ заключается в том, что антитела, соединенные с флуорохромом, сохраняют способность вступать в специфическую связь с гомологичным антигеном.

Методика приготовления и окрашивания препаратов заключается в следующем:

-готовят на предметных стеклах мазки, отпечатки из органов или на покровных стеклах — инфицированную культуру клеток; можно использовать и гистосрезы;

-препараты подсушивают на воздухе и фиксируют в охлажденном ацетоне при комнатной температуре или при минус 15 °С (от 15 мин до 4—16 ч);

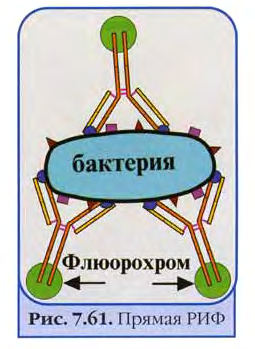
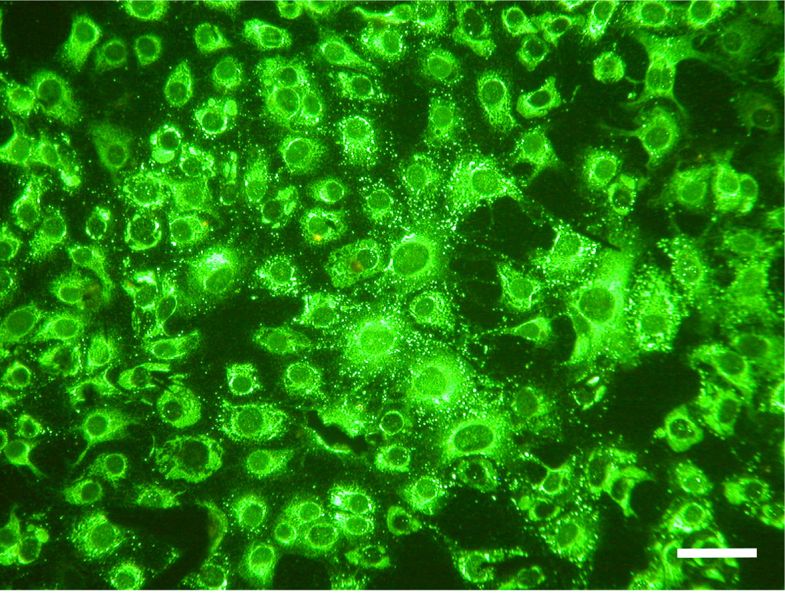
-окрашивают по прямому или непрямому методу; ведут учет под люминесцентным микроскопом по интенсивности свечения, оцениваемому в крестах.

Параллельно готовят и окрашивают препараты от здорового животного — контроль.

Различают два основных метода применения флуоресцирующих антител: прямой и непрямой.

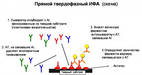
Прямой метод (одноступенчатый). На фиксированный препарат наносят конъюгат (флуоресцирующую сыворотку к предполагаемому вирусу), выдерживают 30 мин при температуре 37 °С во влажной камере. Затем препарат отмывают от несвязанного конъюгата физиологическим раствором (pH 7,2 — 7,5), подсушивают на воздухе, наносят нефлуоресцирующее масло и исследуют под микроскопом. Прямой метод позволяет обнаружить и идентифицировать антиген. Для этого нужно иметь на каждый вирус флуоресцирующую сыворотку.

Непрямой метод (двухступенчатый). На фиксированный препарат наносят немеченую сыворотку, содержащую антитела к предполагаемому вирусу, выдерживают 30 мин при 37 °С, отмывают несвязанные антитела. На препарат наносят флуоресцирующую антивидовую сыворотку, соответствующую виду животного — продуцента гомологичных противовирусных антител, выдерживают 30 мин при 37 °С. Затем препарат отмывают от несвязанных меченых антител, подсушивают на воздухе, наносят не флуоресцирующее масло и исследуют под люминесцентным микроскопом.

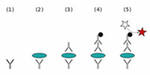


**День 6** (5.04.19)

**Прямой иммуноферментный анализ – этапы проведения**

****В прямом иммуноферментном анализе используют антитела к выявляемому антигену, соединенные со специфической меткой. Эта специфическая метка и есть субстрат ферментативной реакции.  
**Прикрепление антигенов к поверхности лунки и соединение антигена с антителом**  
  
Как проходит прямой иммуноферментный анализ? Берется биологический материал (кровь, соскобы со слизистых, мазки) и помещается в специальные лунки. Биологический материал оставляют в лунках на 15-30 минут, чтобы антигены могли приклеиться к поверхности лунок. Далее в эти лунки добавляют антитела к выявляемому антигену. Это значит, что выявляя антигены, например, сифилиса, добавляются антитела против антигенов сифилиса. Эти антитела получают промышленным способом, а лаборатории покупают уже готовые наборы. Данную смесь исследуемого материала и антител оставляют на некоторое время (от 30 минут до 4-5 часов), чтобы антитела смогли найти и связаться со «своим» антигеном. Чем больше в биологической пробе антигенов, тем больше антител свяжется с ними.  
  
**Удаление «лишних» антител**  
  
Как было указано, антитела к тому же связаны со специфической меткой. Поскольку антитела добавляются в избытке, то не все они свяжутся с антигенами, а если антигена вообще нет в пробе, то, соответственно, ни одно антитело не свяжется с искомым антигеном. Для того чтобы убрать «лишние» антитела, содержимое из лунок просто выливают. В результате этого все «лишние» антитела убираются, а остаются те, которые связались с антигенами, поскольку антигены «приклеены» к поверхности лунок. Лунки несколько раз ополаскивают специальным раствором, который позволяет вымыть все «лишние» антитела.

**Ферментативная реакция – образование окрашенного соединения**  
  
Далее начинается второй этап – ферментативная реакция. В промытые лунки добавляют раствор с ферментом и оставляют на 30-60 минут. Данный фермент имеет сродство к веществу (специфической метке), с которым связаны антитела. Фермент проводит реакцию, в результате которой эта специфическая метка (субстрат) превращается в окрашенное вещество (продукт). Затем методом колориметрии находят концентрацию этого окрашенного вещества. Поскольку данная специфическая метка связана с антителами, значит, концентрация окрашенного продукта реакции равна концентрации антител. А концентрация антител равна концентрации антигенов. Таким образом, в результате проведенного анализа мы получаем ответ, какова концентрация выявляемого микроба или гормона.  
  
Именно так проходит прямой иммуноферментный анализ. Однако сегодня чаще используют непрямой иммуноферментный анализ, поскольку чувствительность и точность непрямого выше, чем прямого. Итак, перейдем к непрямому иммуноферментному анализу.

**Непрямой иммуноферментный анализ – этапы проведения**

В непрямом иммуноферментном анализе два этапа. При проведении первого этапа используют немеченые антитела к выявляемым антигенам, а во втором этапе применяют меченые антитела к первым немеченым антителам. То есть получается не прямое связывание антитела с антигеном, а двойной контроль: связывание антител с антигеном, после чего связывание вторых антител с комплексом антитело + антиген. Как правило, антитела для первого этапа – мышиные, а для второго – козьи.  
  
**Фиксация антигенов на поверхности лунки и связывание антигена с немеченым антителом**  
Так же как и для прямого иммуноферментного анализа производится забор биологического материала – кровь, соскобы, мазки. Исследуемый биологический материал вносят в лунки и оставляют на 15-30 минут для приклеивания антигенов к поверхности лунок. Затем в лунки вносят немеченые антитела к антигенам и оставляют на промежуток времени (1-5 часов), чтобы антитела связались со «своими» антигенами и образовали иммунный комплекс (**первый этап**). После чего удаляют «лишние», не связавшиеся антитела, путем выливания содержимого лунок. Производят промывку специальным раствором для полного удаления всех не связавшихся антител.

**Связывание меченого антитела с комплексом антиген + немеченое антитело**  
После чего берут вторые антитела – меченые, добавляют в лунки и опять оставляют на некоторое время – 15-30 минут (**второй этап**). За это время меченые антитела связываются с первыми – не мечеными и образуют комплекс – антитело + антитело + антиген. Однако и меченые, и не меченые антитела вносятся в лунки в избытке. Поэтому нужно опять удалить «лишние», уже меченые антитела, которые не связались с немечеными антителами. Для этого повторяют процедуру выливания содержимого лунок и промывки специальным раствором.  
  
**Ферментативная реакция – образование окрашенного соединения**  
После чего вносят фермент, осуществляющий реакцию превращения «метки» в окрашенное вещество. Окраска развивается в течение 5-30 минут. Затем проводят колориметрию и вычисляют концентрацию окрашенного вещества. Поскольку концентрация окрашенного вещества равна концентрации меченых антител, а концентрация меченых равна концентрации немеченых антител, которая, в свою очередь равна концентрации антигена. Таким образом, получаем концентрацию выявляемого антигена.  
Такой двойной контроль в виде использования двух видов антител позволил повысить чувствительность и специфичность метода иммуноферментного анализа. Несмотря на удлинение времени проведения анализа и включение дополнительных этапов, эти потери компенсируются точностью результата. Именно поэтому в настоящее время подавляющее большинство методик иммуноферментного анализа – это непрямой иммуноферментный анализ.

**Методом иммуноферментной диагностики выявляют заболевания**

Перейдем к рассмотрению того, какие заболевания и какие биологически активные вещества выявляются методом иммуноферментного анализа. Вещества, выявляемые методом иммуноферментного анализа:

1. [Краснуха](https://www.polismed.com/subject-krasnukha.html) (IgG, IgM)
2. [Цитомегаловирус](https://www.polismed.com/subject-citomegalovirus1.html) (IgG, IgM)
3. [Герпес](https://www.polismed.com/subject-gerpes.html) (IgG, IgM)
4. [Туберкулез](https://www.polismed.com/subject-tuberkulez.html) (IgG, IgM)
5. [Корь](https://www.polismed.com/subject-kor.html) (IgG, IgM)
6. [Гепатит](https://www.polismed.com/subject-gepatit.html) Д, Е, А (ВГД, ВГЕ, ВГА)
7. [Гепатит](https://www.polismed.com/articles-gepatit.html) С (ат ВГС, ВГСсore)
8. Гепатит В (НВs, НВе НВсore)
9. [Уреаплазма](https://www.polismed.com/subject-ureaplazmoz.html) (IgG, IgM)
10. [Микоплазма](https://www.polismed.com/subject-mikoplazmoz.html) (IgG, IgM)
11. [Хламидия](https://www.polismed.com/subject-khlamidioz.html) (IgG, IgM)
12. Микоплазма (IgG)
13. [Сифилис](https://www.polismed.com/subject-sifilis.html) (IgG)
14. Аспергиллёз (IgG)
15. [Лямблии](https://www.polismed.com/subject-ljamblioz-ljamblii.html) (IgG)
16. Helicobacter Pylori (IgG)
17. Псевдотуберкулез (IgG, IgM)
18. [Кандида](https://www.polismed.com/subject-kandida.html) (IgG)
19. Герпес (IgG, IgM)
20. Эпштейн-Барр (IgG, IgM)
21. Цитомегаловирус (IgG, IgM)
22. IgE – общий
23. С-реактивный белок (СРБ)
24. Глиадин (IgG, IgA)
25. IgG4
26. Общий IgG
27. IgG2
28. Общий IgA
29. Секреторный IgA
30. Общий IgD
31. Общий IgМ
32. Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК)