

ЗАНЯТТЯ 12

ТЕМА №16: «Ретровіруси. Вірус імунодефіциту людини. Лабораторна діагностика ВІЛ-інфекції»

I. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ

Боротьба зі СНІД (синдромом набутого імунодефіциту) є всесвітньою та надзвичайно складною проблемою охорони здоров'я, що вимагає глибоких знань у медичних працівників, санітарно-гігієнічних знань у населення й урядових програм з боротьби з "чумою 20-го століття", як охрестили це захворювання.

За даними медичної статистики на підставі розрахункових даних (екстраполяція результатів вибіркового дослідження на всю популяцію України) ВІЛ-інфікованих у країні близько 1%, тобто кожен сотий житель. Число і питома вага таких осіб у популяції постійно зростають.

Прогнози розвитку епідемії/пандемії ВІЛ-інфекції у світі й в Україні надзвичайно песимістичні. З огляду на розрахункову поширеність інфекції в нашій країні, відсутність протягом тривалого часу клінічних проявів захворювання (на стадії ВІЛ-інфікованості) із хворими з даною патологією найближчим часом будуть зіштовхуватися медики всіх спеціальностей. ВІЛ-інфіковані в багатьох випадках не знають про свій стан і можуть звертатися за медичною допомогою в рядові установи охорони здоров'я. Медики всіх спеціальностей повинні бути чітко інформовані про біологічні властивості, резистентність, особливості патогенезу ВІЛ-інфекції, запобіжних заходах, тактиці ведення хворих як у стадії ВІЛ-інфікування, так і в стадії СНІД (останнім допомога повинна надаватись в спеціалізованих медичних установах).

2. МЕТА НАВЧАННЯ

Загальна мета. Вміти правильно призначати обстеження, інтерпретувати результати лабораторної діагностики для постановки діагнозу і вибору препаратів для лікування ВІЛ-інфекції/СНІД.

Конкретні цілі:

Уміти

1. Вибрати матеріал для дослідження і метод лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції/СНІД, в залежності від стадії захворювання.

2. Інтерпретувати результати лабораторної діагностики.

3. Вибрати засоби профілактики ВІЛ-інфекції/СНІД.

4. Вибрати препарати для лікування ВІЛ-інфекції/СНІД з врахуванням особливостей патогенезу інфекції на рівні клітини.

3. ОСНОВНІ ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ, РОЗГЛЯНУТІ ПРИ ВИВЧЕННІ ДАНОЇ ТЕМИ.

До конкретної мети 1. (Вибрати матеріал для дослідження і метод лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції/СНІД, в залежності від стадії захворювання).

1. Загальна характеристика ретровірусів: особливості будови, резистентність.

2. Патогенез захворювання на рівні організму, стадії захворювання, ВІЛ-інфекція і СНІД.

До конкретної мети 2. (Інтерпретувати результати лабораторної діагностики).

3. Методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції. Імуноферментний (ІФА), імуноблотінг, гібридизація нуклеїнових кислот, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

До конкретної мети 3. (Вибрати способи профілактики ВІЛ-інфекції/СНІД).

4. Перспективи специфічної профілактики ВІЛ-інфекції.

5. Неспецифічна профілактика ВІЛ-інфекції. Проблема ВІЛ/СНІД для різних медичних спеціальностей.

До конкретної мети 4. (Вибрати препарати для лікування ВІЛ-інфекції/СНІД, з врахуванням особливостей патогенезу інфекції на рівні клітини).

6. Патогенез на рівні клітини, роль зворотної транскриптази, вірусспецифічної протеази.

4. ЗМІСТ НАВЧАННЯ

Джерела інформації

Література, що рекомендується:

1. Гайдаш І.С., Флегонтова В.В. Медична Вірологія.- Луганськ, 2002.-С.195-211.

2. Пяткін К.Д., Кривошеїн Ю.С. Мікробіологія з вірусологією та імунологією.- Київ: Вища школа, 1992.-С. 385-391.

3. Букринская А.Г.. Вирусология. - М.: Медицина, 1986. - С. 309-313.

4.Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология.-Санкт-Петербург: Специальная литература, 1998.-С.319-326.

5.Лекція.

6.Стенд у навчальному музеї кафедри.

Додаткова література

1.Фролов А.Ф., Шевченко Л.Ф., Ширококов В.П. Практическая вирусология. - Киев: Здоровья, 1989. - С. 226 - 236.

2.Посібник з медичної вірусології/ за редакцією В.М.Гиріна.- Київ: Здоров'я,1995.-С.301-331.

При роботі з підручниками користуйтеся графом логічної структури до даної теми. Якщо в процесі самопідготовки у Вас виникнуть питання, запишіть їх і з'ясуйте на початку заняття з викладачем.

ОРІЄНТОВАНА ОСНОВА ДІЇ

Протокол практичного заняття за темою: «Ретровіруси. Вірус імунодефіциту людини. Лабораторна діагностика ВІЛ-інфекції»

1.Розібрали методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції: імуноферментний (ІФА), імуноблотінг, гібридизацію нуклеїнових кислот, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

2.Самостійно вирішували ситуаційні задачі

3.Вивчили неспецифічну профілактику ВІЛ-інфекції. Ознайомилися з проблемою ВІЛ/СНІД для різних медичних спеціальностей.

4.Вивчили патогенез ВІЛ-інфекції на рівні клітини, роль зворотної транскриптази, вірусспецифічної протеази, принципи й перспективи хіміотерапії ВІЛ/СНІД (за стендом учбового музею).

Для реалізації поставленої мети й засвоєння навчального матеріалу вирішіть задачі № 216 - 218 із збірника «Завдання для самостійної роботи студентів за курсом загальної й спеціальної мікробіології» і задачі №№. 157 -159 з посібника „Завдання для самостійної роботи студентів вищих медичних закладів освіти III –IV рівня акредитації”.

ІНСТРУКЦІЯ З ПРОВЕДЕННЯ ОБЛІКУ РЕЗУЛЬТАТІВ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ

Прочитайте інструкцію, як необхідно провести облік реакції прямого і конкурентного ІФА, реакцію імуноблотінгу.

Вказівки до виконання самостійної роботи на практичному занятті:

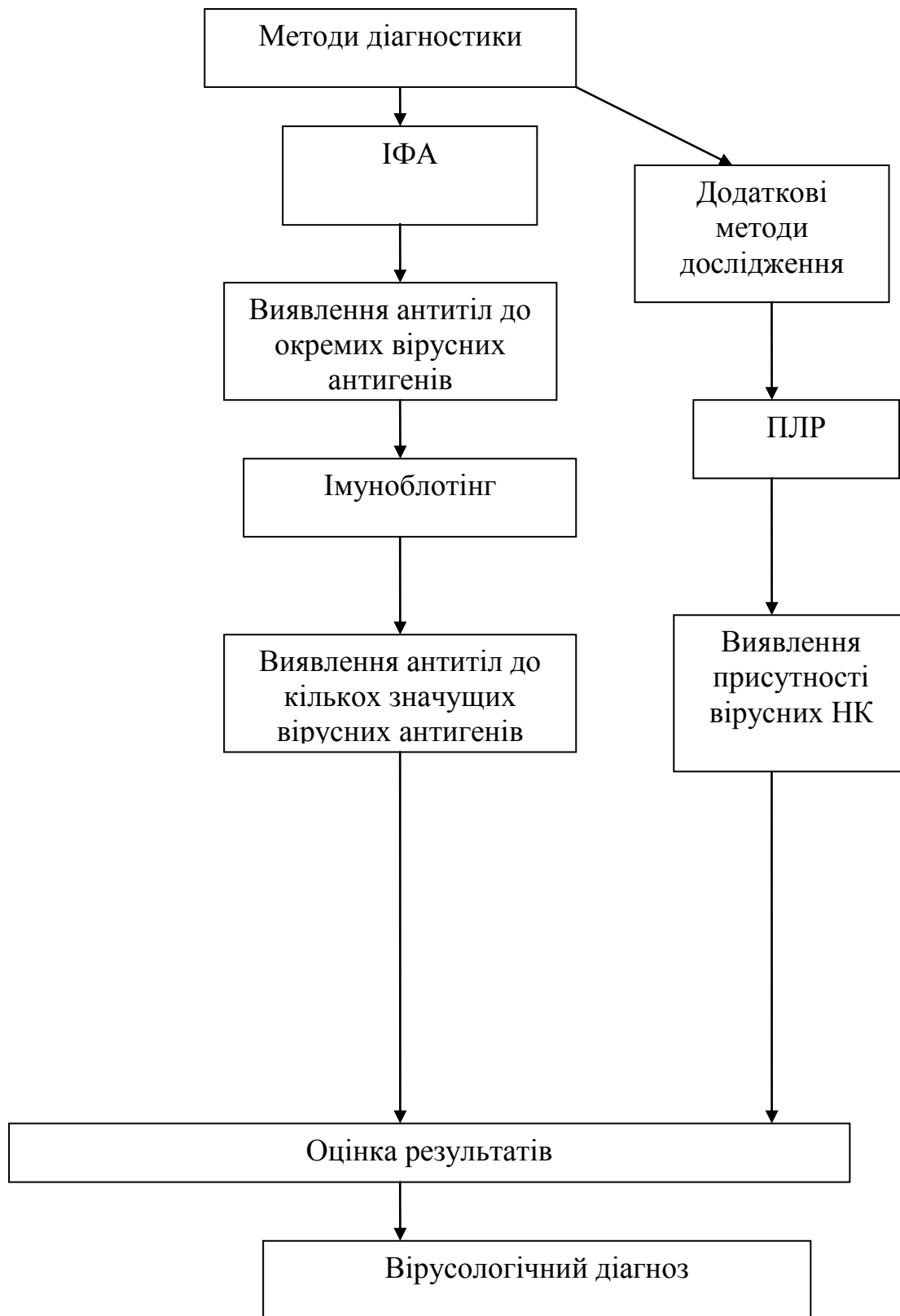
1.Візьміть карту, на якій зображені полістиролові планшети з результатами дослідження методом прямого ІФА сироваток крові у 4 осіб, підозрілих на СНІД, і вкажіть, у яких з обстежених осіб, реакція позитивна, що свідчить про наявність антитіл до ВІЛ. Замалюйте в альбомі для протоколів і позначте стрілками, у яких з обстежених реакція ІФА позитивна й в яких - негативна.

2.Проведіть аналіз результатів дослідження сироваток крові осіб, у яких двічі методом ІФА виявлялися антитіла до ВІЛ, у зв'язку з чим проведене їх обстеження методом імуноблотінгу. Порівняйте забарвлені білкові треки позитивного контролю, звертаючи увагу на білки ВІЛ 120, 41 і 24, з результатами, отриманими у осіб, які обстежувались.

Порівняйте дані осіб, які обстежувались, з даними негативного контролю (сироваткою здорової людини).

Результати дослідження 6 сироваток методом імуноблотінгу замалюйте в протокол. Позначте стрілками, хто з обстежених осіб має антитіла до ВІЛ, а отже, є носіями ВІЛ чи страждає на СНІД з відповідними клінічними проявами

ГРАФ ЛОГІЧНОЇ СТРУКТУРИ ДО ТЕМИ: «Ретровіруси. Вірус імунодефіциту людини. Лабораторна діагностика ВІЛ-інфекції»



Завдання для перевірки досягнення конкретних цілей навчання

До питання 1. Загальна характеристика ретровірусів: особливості будови, резистентність.

Тест 1

Структура ВІЛ утворена зовнішньою оболонкою – суперкапсидом, який складається з двошарової мембрани, що походить з цитоплазматичної мембрани клітини, в якій відбувається репродукція вірусу. Таку двошарову мембрану пронизують вірусні глікопротеїди. Які поверхневі трансмембранні глікопротеїди має даний вірус?

- A. gp120
- B. gp41
- C. gp17
- D. gp10
- E. gp110

До питання 2. Патогенез захворювання на рівні організму, стадії захворювання, ВІЛ-інфекція і СНІД.

Тест 2

Хворий К., тривалий час лікувався з приводу пневмонії неясної етіології, резистентної до стандартної антибіотикотерапії. З анамнезу встановлено, що пацієнт тривалий час знаходився в службовому відрядженні за кордоном, у південно-східній Африці. Знаходячись у відрядженні, одержав травму, лікувався в госпіталі. При зборі анамнезу життя вказав ряд сексуальних контактів під час перебування у а відрядженні в Африці. Оцінюючи дані анамнезу, клінічну картину захворювання лікар запідозрив у хворого-інфекцію/СНІД. Який міг бути механізм інфікування ВІЛ-вірусом даного хворого?

- A. Фекально-оральний.
- B. Повітряно-краплинний.
- C. Трансмисивний.
- D. Стетевий.
- E. Парентеральний ятрогенний

Тест 3

Хворий А., тривалий час лікувався з приводу пневмонії невиясненої етіології, стійкої до стандартної терапії. Їх анамнезу встановлено, що він тривалий час знаходився в службовому відрядженні за рубежом. Знаходячись у відрядженні отримав травму, лікувався в госпіталі. Після одужання повернувся на батьківщину. Оцінюючи анамнез, клінічну картину захворювання лікар запідозрив у хворого СНІД. Які клінічні симптоми характерні для СНІДу?

- A. Блювота, болі в животі, виражена інтоксикація
- B. Біль при сечовипусканні
- C. Діарея, тривала температура (37-38°C) без встановленої причини, втрата ваги
- D. Біль у області крижів
- E. Затемнена свідомість, афонія

До питання 3. Методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції. Імуноферментний (ІФА), імуноблотінг, гібридизація нуклеїнових кислот, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Тест 4

Хворий К., тривалий час лікувався з приводу пневмонії неясної етіології, резистентної до стандартної антибіотикотерапії. З анамнезу встановлено, що пацієнт тривалий час знаходився в службовому відрядженні за кордоном, у південно-східній Африці. Знаходячись у відрядженні, одержав травму, лікувався в госпіталі. При зборі анамнезу життя вказав ряд сексуальних контактів під час перебування у а відрядженні в Африці. Оцінюючи дані анамнезу, клінічну картину захворювання лікар запідозрив у хворого-інфекцію/СНІД. Якими дослідженнями можна підтвердити чи спростувати діагноз, поставлений лікарем даному хворому?

- A. Визначити наростання титру антитіл до ВІЛ у реакції Відаля.
- B. Виявити в ІФА наявність ІgM-антитіл.

- C. Виявити в ІФА наявність антитіл до ВІЛ.
- D. Виявити в реакції імуноблотінгу наявність антитіл до ВІЛ.
- E. Виявити наявність антитіл до ВІЛ у РЗК.

Тест №2.

У пацієнта, який тривалий час скаржиться на виснаження, діарею, субфебрилітет при лабораторному обстеженні виявили ВІЛ-інфекцію. Який результат лабораторного обстеження міг дозволити з високим ступенем вірогідності діагностувати ВІЛ-інфекцію у даного хворого?

- A. Виявлення антитіл до білка p24 у ІФА.
- B. Негативний результат імуноблотінгу.
- C. Виявлення антитіл до білка p24, gp 120, gp 41, p10 у імуноблотінгу.
- D. Виявлення антитіл до білка gp 120 у РІФ.
- E. Виявлення антитіл до білка p24 у імуноблотінгу.

Тест 5

Молодий чоловік 25 років вперше звернувся в кабінет довіри з проханням виключити в нього ВІЛ-інфекцію. Яка реакція може бути використана для діагностики ВІЛ-інфекції у даного хворого?

- A. Реакція імунофлюоресценції (РІФ).
- B. Імуноферментний аналіз (ІФА).
- C. Реакція імуноблотінгу.
- D. Радіоімунний аналіз (РІА).
- E. Імуноелектронна мікроскопія (ІЕМ).

До питання 4. Перспективи специфічної профілактики ВІЛ-інфекції.

Тест 6

ВІЛ-інфікованому хворому з розвинутою опортуністичною інфекцією – кандидозною пневмонією було призначене лікування. Який варіант лікування необхідний даному хворому, з врахуванням особливостей патогенезу основного захворювання?

- A. Протигрибкова хіміотерапія.
- B. Трикомпонентна антиретровірусна терапія.
- C. Комбінація імуномодуляторів й протигрибкових антибіотиків.
- D. Комбінація імуномодуляторів й трикомпонентної антиретровірусної терапії.
- E. Комбінація трикомпонентної антиретровірусної терапії й протигрибкових антибіотиків.

До питання 5. Неспецифічна профілактика ВІЛ-інфекції. Проблема ВІЛ/СНІД для різних медичних спеціальностей.

Тест 7

У групи дітей від різних батьків, що знаходилися на лікуванні в педіатричному стаціонарі міста Н. через два з половиною роки, після перебування в стаціонарі, виявлена ВІЛ-інфекція, у деяких у стадії СНІД. Комісія, що розслідувала даний спалах порахувала її ятрогенною. Які можливі механізми інфікування у даних дітей?

- A. Вертикальний (з молоком матері).
- B. Вертикальний (трансплацентарний).
- C. Парентеральний (гемотрансфузія).
- D. Парентеральний (ін'єкція).
- E. Парентеральний (інвазивні маніпуляції інструментами багаторазового користування).

Тест 8

У зв'язку з випадками виявлення ВІЛ-інфекції у пацієнтів стоматологічних поліклінік і кабінетів, було проведено мед раду, на якій з рекомендаціями виступили лікарі-епідеміологи центру профілактики СНІД. Які запобіжні заходи могли рекомендувати лікарям-стоматологам для запобігання можливості професійного інфікування?

- A. Мити руки після відвідування кожного пацієнта.

- В. Працювати в засобах індивідуального захисту (рукавички, окуляри).
- С. Для кожного пацієнта використовувати новий стерильний набір інструментів.
- Д. Вимагати від кожного пацієнта пред'явлення медичного сертифікату.
- Е. Кварцювати (озоніювати) приміщення

До питання 6. Патогенез на рівні клітини, роль зворотної транскриптази, вірусспецифічної протеази.

Тест 9

Глікопротеїди взаємодіють з рецепторами CD4 . З'єднання цих двох молекул викликає злиття оболонки вірусу з клітинною мембраною. Які клітки містять ці рецептори?

- А. Т-супресори
- В. Т-хелпери, макрофаги, моноцити
- С. Нейтрофіли, базофіли.
- Д. Еозинофіли, тромбоцити
- Е. Плазматичні клітки

Тест 10

У ВІЛ вірусу існує особливий фермент, який синтезує на віріонній РНК мінус ланцюг ДНК. Який це фермент?

- А. Зворотня транскриптаза
- В. ДНК-полімераза
- С. Вірусная інтеграза
- Д. РНК-полімераза
- Е. Протеаза

Тест 11

В присутній час детально вивчено механізм взаємодії ВІЛ з чутливими клітинами. У ВІЛ ідентифіковано не менше 9 структурних білків, один з них виконує роль прикріплювального білка, взаємодіючи з рецептором чутливої клітини. Який це білок?

- А. Білок р 34
- В. Білок gp 41
- С. Білок gp160
- Д. Білок gp120
- Е. Білок р 51/66

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ

Заняття проводиться в навчальній лабораторії і навчальному музеї. На початку заняття викладач проводить перевірку і корекцію рівня підготовки студентів до заняття. За запропонованою схемою записується протокол. У навчальному музеї з залученням навчальних стендів, студенти знайомляться з загальною характеристикою ретровірусів, розбирають особливості будови, патогенезу на клітинному рівні і на рівні цілого організму, розбирають методи лабораторної діагностики і перспективи лікування і специфічної профілактики. У навчальній лабораторії студенти виконують самостійну роботу – заповнюють схему лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції, знайомляться з препаратами, призначеними для лабораторної діагностики захворювання, розбирають інструкцію з проведення ІФА. У ході заняття студенти вирішують завдання для самостійної роботи з даного посібника і ситуаційні задачі №№ 157 - 159 з посібника „Завдання для самостійної роботи студентів вищих медичних закладів освіти III –IV рівня акредитації” і №№ 216 - 218 із збірника «Завдання для самостійної роботи студентів за курсом загальної й спеціальної мікробіології». Закінчується заняття підсумковим тестовим контролем.

Додаток

ДЕЯКИ ОСОБЛИВОСТІ ПАТОГЕНЕЗУ ВІЛ

ВІЛ-інфекцію/СНІД викликає ретровірус, що одержав назву вірус імунодефіциту людини (ВІЛ).

Ретровіруси – родина вірусів, у яких є унікальний вірусний фермент – ревертаза (зворотна транскриптаза, РНК-залежна ДНК-полімераза). Подібного ферменту немає ні в рослинному, ні у тваринному світі, немає й у представників інших сімейств вірусів (за винятком гепадновірусів). Ревертаза - фермент, що дозволяє на матриці РНК сформувати копію ДНК. Наявність ревертази дозволяє РНК-геномним ретровірусам, точніше ДНК – копіям їх геномів інтегруватися у геном клітин, вражених цими ретровірусами.

Головною мішенню ВІЛ є клітини-хелпери CD 4+- субпопуляції лімфоцитів (CD – кластери диференціації). CD 4+ –лімфоцити виконують в імунній системі організму регуляторну роль, так званих, лімфоцитів-помічників, що регулюють запуск імунної відповіді.

Крім лімфоцитів-помічників (хелперів) ВІЛ уражують, проте в меншій мірі – моноцити, макрофаги, клітки нейроглії. Всі вони мають на своїй поверхні CD4+білки-рецептори. Вірус імунодефіциту людини проникає в клітини, що мають на своїй мембрані CD 4+рецептори, до яких приєднується gp 120-прикріпний білок ВІЛ.

Після проникнення вірусу ВІЛ у клітину (лімфоцити-хелпери, моноцити, макрофаги та ін.), відбувається утворення за допомогою ферменту ревертази ДНК-копії геному вірусу й інтеграція цієї копії геному в геном клітини. Настає стан, що на рівні цілого організму одержав назву ВІЛ-інфікування. Такий стан може продовжуватися досить довго (місяці і роки), поки не відбувається функціональна активація ураженого лімфоцита. Активація клітини призводить до активації ДНК-копії «сплячого» геному ретровірусу. Ці процеси ведуть до порушення функції, а частіше до загибелі ураженої вірусом клітини. Все це призводить до порушення регуляції в імунній системі – захисній системі організму.

Настає стадія СНІД. Організм ВІЛ-інфікованого на стадії СНІД стає вразливий для цілого ряду агентів, до яких не чутливий організм з нормально функціонуючою імунною системою. Через певні проміжки часу (близько 7 років, іноді більше, але нерідко – менше) стан ВІЛ-інфікованості, що не виявляється клінічно, переходить у клінічно виражений синдром набутого імунодефіциту (СНІД).

У хворих у стадії СНІД виникає велика кількість різноманітних, так званих опортуністичних інфекцій (агентами, що їх викликають є такі, що звичайно не патогенні для осіб з нормально функціонуючою імунною системою) і злоякісних новоутворень (саркома Капоші, лімфоми). Спостерігається також ураження центральної нервової системи в зв'язку з тим, що вражаються клітини нейроглії.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ

Схема підготовки, проведення й обліку результатів **прямого імуноферментного аналізу (ІФА)** у осіб з підозрою на ВІЛ-інфекцію.

Етапи дослідження, що передують проведенню аналізу.

У плоскодонні лунки («плашки») полістиролового планшету підприємством-виготовлювачем внесені окремі білки вірусу ВІЛ, отримані за допомогою біотехнології. Тест-системи для ІФА, що використовуються в даний час, для діагностики ВІЛ безпечні (!). Після адсорбції на внутрішній поверхні полістиролових «плашок», останні ретельно промиваються забуференим фізіологічним розчином. Полістиролова поверхня має високу сорбцію до білків, тому додатково обробляється нейтральним білком (альбуміном), щоб екранувати ділянки полістиролової поверхні, які не зв'язалися з білками-антигенами ВІЛ. У такому вигляді тест-система готов до роботи.

ПРИНЦИП МЕТОДУ ІФА: якщо в сироватці обстежуваного містяться антитіла до білків-антигенів ВІЛ, вони специфічно й міцно зв'язуються з антигеном: **[ВІЛ Ag - Ab обстежуваного]**.

Додавання кон'югату «антитіла до глобулінів людина-пероксидаза» призводить до специфічного зв'язування противидових антитіл кон'югату з антитілами (людськими глобулінами) обстежуваного, якщо такі були в сироватці, яка досліджувалась, і зв'язалися з ВІЛ-антигеном:

[ВІЛ Ag - Ab обстежуваного] – [антивидові Ab – пероксидаза].

Внесення субстрату – суміші перекису водню й ортофенілендіаміну дозволяє виявити в «плашці» присутність ферменту пероксидази. При наявності пероксидази відбувається прискорене розкладання перекису водню, що на світлі викликає зміну нейтрально-безбарвного ортофенілендіаміну

Зміна кольору ортофенілендіаміну вловлюється за допомогою фотоелектрокалориметру, зв'язаного з комп'ютером, що співпоставляє екстинції, отримані при дослідженні сироваток пацієнтів з позитивними і негативними контролями. Потік світла перед тим, як потрапити у «віконце» фотоелектрокалориметру, проходить через «плашку» з досліджуваним матеріалом. Щоб уникнути оптичних перекручувань дно «плашки» плоске.

Постановка реакції прямого ІФА.

У «плашки» вносять сироватки обстежуваних з підозрою на ВІЛ/СНІД. Після годинного контакту в умовах термостатування, роблять перше промивання забуференим фізіологічним розчином з додаванням Твіну-80 (поверхнево-активна речовина). Задача промивання - вимити всі білки, що специфічно не зв'язалися із сорбованими на поверхні полістиролу білками-антигенами ВІЛ. Після видалення білків сироватки обстежуваного, що не зв'язалися, в плашки вводиться антивидова сироватка, що містить антитіла до глобулінів людини, кон'юговані з пероксидазою т.зв. «кон'югат». Контакт протягом однієї години в умовах термостатування. Друге ретельне промивання «плашок» забуференим фізіологічним розчином з Твіном-80. Після видалення промиваючого розчину, з яким вимивається весь «кон'югат», який не зв'язався, вносять безбарвний субстрат для пероксидази. Субстрат складається з ортофенілендіаміну й перекису водню. Жовто-жовтогаряче забарвлення, яке з'являється в позитивному випадку, свідчить, що в сироватці досліджуваного пацієнта містяться антитіла до ВІЛ.

Схема підготовки, проведення й обліку результатів методом імуноблотінгу у осіб з підозрою на ВІЛ-інфекцію.

ПРИНЦИП МЕТОДУ ІМУНОБЛОТІНГУ

Проводиться фракціонування білків ВІЛ за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) в присутності додецилсульфату натрію (ДСН) з наступною імуноіндикацією білкових фракцій методом ІФА. Виявлення в сироватці особи, яка обстежується, антитіл до білків ВІЛ на смужці нітроцелюлозної мембрани (МН) здійснюється імуноферментним методом.

Підготовка тест-системи.

Суміш вірусних білків під дією постійного електричного струму в гелі (ПААГ) в зв'язку з різною молекулярною масою проходить різний за довжиною шлях – формуються т.зв. «треки білків». Місце розташування окремих білків за відношенням один до одного відомо. За допомогою електрофорезу «треки білків» переносять (передрукуюють) з пластини ПААГ на нітроцелюлозну мембрану. Білки ВІЛ, розташовані у визначеній послідовності на нітроцелюлозній мембрані – тест система для постановки реакції імуноблотінгу.

Схема постановки реакції.

Для виявлення антитіл до білків ВІЛ у сироватці особи, яка обстежується, смужку нітроцелюлозної мембрани з «треками білків» занурюють у розчин сироватки обстежуваного. Якщо в сироватці є антитіла до білків-антигенів ВІЛ, безпосередньо на нітроцелюлозній мембрані, в місцях локалізації відповідних вірусних білків, утвориться комплекс антиген-антитіло: **[ВІЛ Ag - Ab особи, яка обстежується].**

Смужку нітроцелюлозної мембрани ретельно промивають і видаляють усі білки, що не зв'язалися.

Комплекси антиген-антитіло виявляють, занурюючи смужку нітроцелюлозної мембрани з «треками білків», до яких прикріпилися сироваткові антитіла, у розчин «кон'югату» - антивидової сироватки, антитіла якої з'єднані з пероксидазою:

[ВІЛ Ag - Ab особи, яку обстежують] – [антивидові Ab – пероксидаза].

Після контакту з розчином «кон'югату», смужку нітроцелюлозної мембрани ретельно промивають і видаляють частину «кон'югату», що не зв'язалася.

Після другого промивання смужку нітроцелюлозної мембрани з вірусними білками занурюють у суміш перекису водню й ортофенілендіаміну. В місцях приєднання до білок ВІЛ антитіл із сироватки особи, яку обстежують, і, до яких у свою чергу приєдналися «кон'югат» антивидові антитіла до глобулінів дюдина-пероксидаза, після контакту з перекисом водню й ортофенілендіаміном на світлі проступають забарвлені плями («блот»). Інтенсивність їх забарвлення залежить від кількості противірусних антитіл в сироватці обстежуваної особи.

Облік проводиться при порівнянні забарвлення смуг, оброблених сироваткою хворого та позитивного (сироватка хворого на ВІЛ) й негативного (сироватка здорового) контролях.

У зв'язку з тим, що локалізація на смужці нітроцелюлозної мембрани білків ВІЛ відома, при постановці реакції імуноблотінгу виявляють не лише факт наявності антитіл до вірусних білків, але і специфічність антитіл – до яких антигенів яких наявні ці антитіла.

Особлива увагу звертають на забарвлення смуг, в яких знаходилися білки віріонів ВІЛ - gp120, gp 41, p24.

При виконанні цього завдання студенти повинні порівняти результати дослідження методом імуноблотінгу сироваток крові ряду осіб, підозрілих на носійство ВІЛ чи СНІД, з відповідними даними, які отримані в сироватках осіб, із встановленим СНІД (позитивний контроль), і аналогічних досліджень, проведених із сироваткою здорової людини (негативний контроль).