Диагностика инфекционных заболеваний ч.3

Преподаватель: Марченко Владимир Александрович

Методы диагностики

1. Бактериологический метод
2. Бактериоскопический метод
3. Серологические/Иммунологические реакции
4. Биологическая проба
5. Аллергическая проба
6. Молекулярно-генетические методы

Недостаток серологических реакций

- Серологические реакции различаются по способности выявлять о тдельные классы антител

1. Так, например, реакция агглютинации, хорошо выявляет IgM-антитела, но менее чувствительна для определения IgG-антител (РА: ↑IgM ↓IgG).
2. Реакции связывания комплемента, требует участия комплемен та, и не выявляют
   антитела, не присоединяющие комплемент (IgA-антитела и IgE-антитела)

   (РСК: ↑IgM;IgG, ↓IgA; IgE)
3. В реакции нейтрализации вирусов участвуют лишь антитела, направленные против антигенов, расположенных на поверхности вириона (к поверхностным гликопротеинам)

   (РН: ↑гликопротеины; ↓липопротеины; нуклеопротеины)

Иммунологические реакции с использованием метки

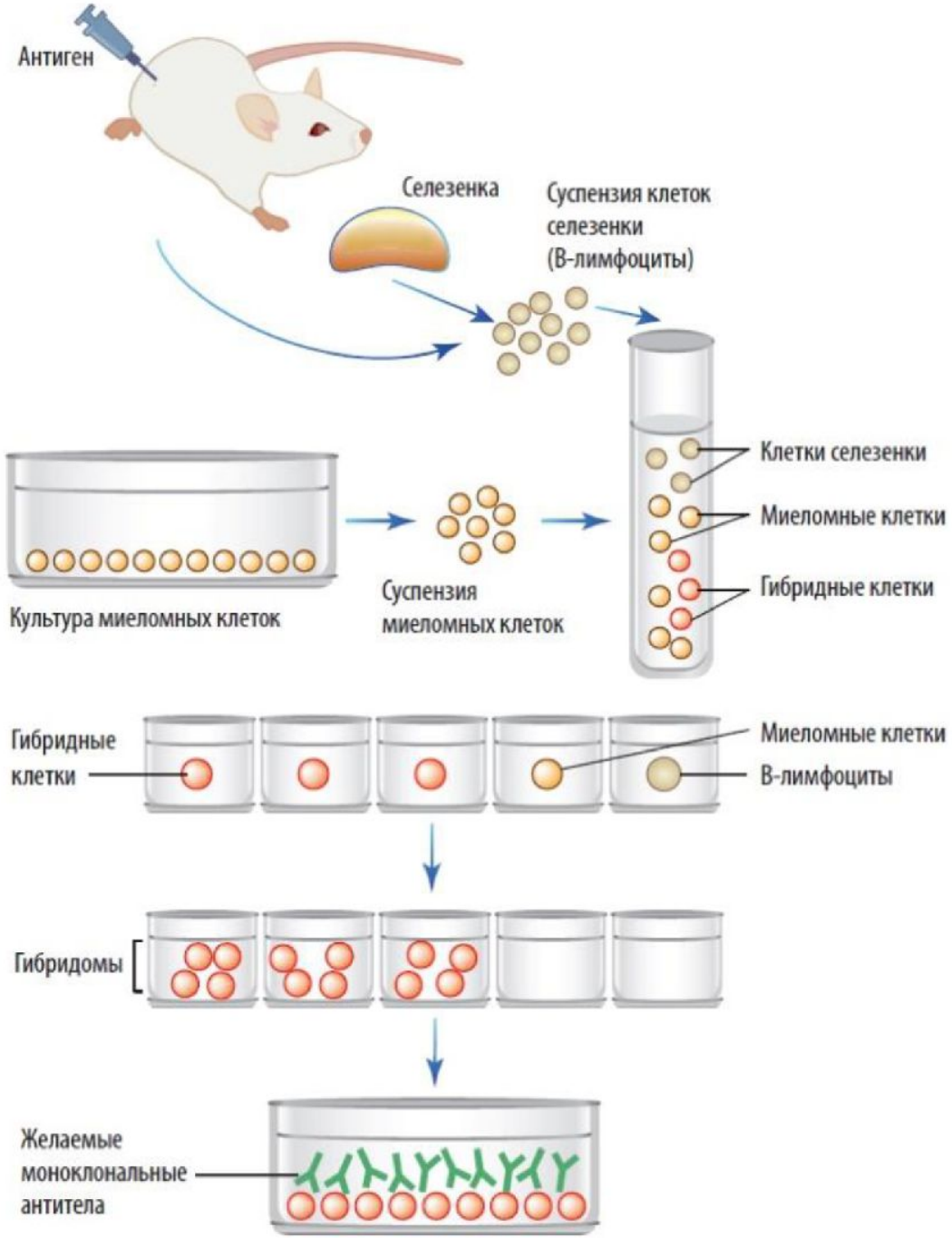
- Реакции с использованием меченых АТ или Аг составляют основу методов экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, так как выявляют минимальное содержание Аг или АТ в исследуемых образцах.
- В качестве меток могут быть использованы различные:

1. ферменты
2. красители-флюорохромы
3. изотопы

Иммунологические реакции

- Выделяют следующие иммунологические реакции:

1. Иммуноферментный анализ, или метод (ИФА/ИФМ)
2. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)
3. Радиоиммунный анализ (РИА)
4. Иммунохроматографический анализ (ИХА)



Основные этапы получения моноклональный антител:

1. Иммунизация лабораторных животных. Для иммунизации необходимо иметь инбредные линии мышей (обычно BALB/c) или крыс (Lou).
2. Удаление и гомогенизация селезенки мышей для получения суспензии антителопродуцирующих клеток.
3. Процесс гибридизации – клетки селезенки смешивают с клетками плазмоцитомы для получения гибридных клеток.
4. Смесь клеток помещают в селективную среду, которая позволяет расти только гибридным клеткам.
5. Клонирование и отбор нужных клонов.

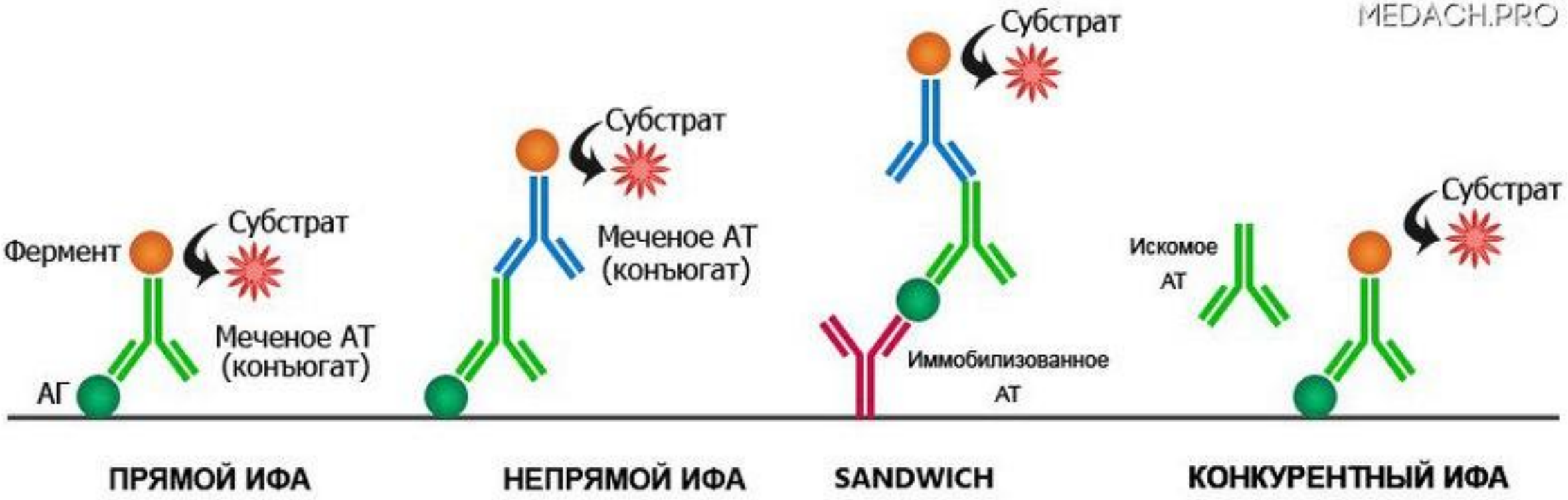
Иммуноферментный анализ

- Иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело.
- ИФА включает использование коммерческих реагентов — АТ, маркированных ферментами (например, пероксидазой или щелочной фосфатазой) (в редких случаях используются Аг с «меткой»).
- После образования иммунного комплекса(Аг+АТ) в систему вносят субстрат, расщепляемый ферментом, что приводит к окрашиванию среды в жёлто-коричневый (при использовании пероксидазы) или жёлто-зелёный цвет (при использовании

Суть метода

- Суть: один из компонентов реакции Аг-АТ имеет особую ферментную метку (как правило, мечены АТ).
- Взаимодействие гомологичных Аг и АТ приводит к образованию иммунного комплекса Аг-АТ+ферментная метка.
- Если в реакцию вносят определенный субстрат, то фермент, сцепленный с АТ способен расщеплять этот субстрат, что приводит к изменению цвета смеси с реагентами (изначально она бесцветная).
- В зависимости от интенсивности окрашивания смеси, судят о количестве искомого компонента (Аг возбудителя или АТ в сыворотке пациента).

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ



Применение ИФА

- ИФА применяют для диагностики:

1. Вирусных заболеваний (клещевой энцефалит, вирусные гепатиты, ОРВИ и др.)
2. Бактериальных заболеваний (для диагностики сальмонеллеза, микоплазмозов, боррелиоза, хламидиоза и др.)
3. Паразитарных болезней (лямблиоз, трихомониаз и др.)

- Метод также используется для определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях - 10^{10} - 10^{12} г/л.

Преимущество метода

- По сравнению с классическими методами выявления Аг, иммуноферментный анализ позволяет непосредственно регистрировать взаимодействие Аг с АТ в специфической фазе, а не анализировать вторичные проявления взаимодействия — агглютинацию, преципитацию или гемолиз.
- Метод отличает высокая чувствительность — обычно достаточно присутствия Аг в концентрации 1 нг/мл.
- К настоящему времени созданы многочисленные модификации базовой методики.

Прямой ИФА

- Прямой ИФА (определяют Аг):

1. В лунки микропланшетов помещают клинический материал от пациента, который содержит определенный Аг возбудителя
2. Инкубируют в течение 15-30 мин, для закрепления возбудителя (Аг) на дне лунок
3. Добавляют АТ меченные ферментом
4. Ставят на контакт для связывания гомологичных Аг и АТ (от 30 мин до 4-5 часов)
5. Промывка физраствором (в лунках остаются лишь те АТ, которые связались с Аг)
6. Внесение субстрата в смесь, где есть ферментная метка связанная с АТ; в результате фермент расщепляет субстрат, что проявляется в виде окрашивания смеси

Твердофазный ИФА (1)

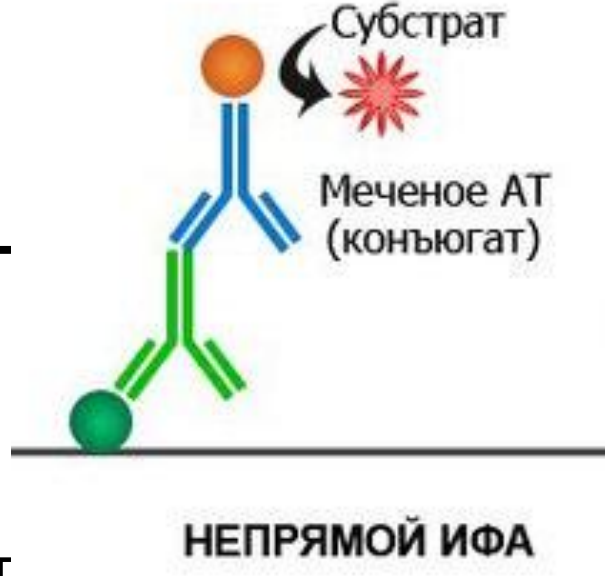
- Твердофазный ИФА - наиболее распространенный вариант теста, когда один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе, напр., на дне лунок планшетов из полистирола.
- Компоненты выявляют добавлением меченых антител или антигенов (в зависимости от сорбированного компонента).
- При положительном результате изменяется цвет хромогена.
- Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют не связавшиеся реагенты путем промывания.

Твердофазный ИФА (2)

- I. При определении антигена (сэндвич ИФА, прямой ИФА) в лунки с сорбированными антителами вносят антиген (напр., клинический материал с искомым антигеном), добавляют диагностическую сыворотку против него и вторичные антитела (против диагностической сыворотки), меченные ферментом, а затем субстрат/хромоген для фермента.

- II. При определении антител (непрямой ИФА) в лунки планшетов с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больного, антиглобулиновую сыворотку, меченную ферментом и субстрат/хромоген для фермента.

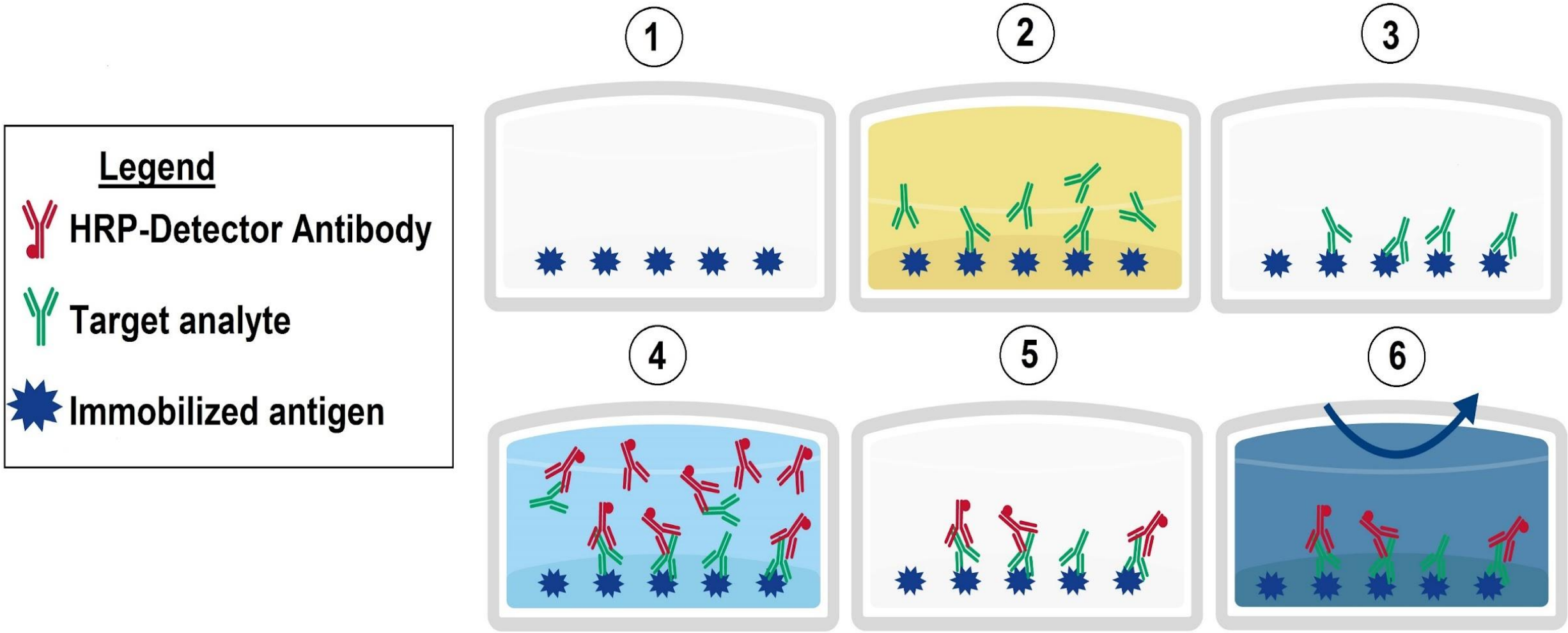
Непрямой твердофазный ИФА (1



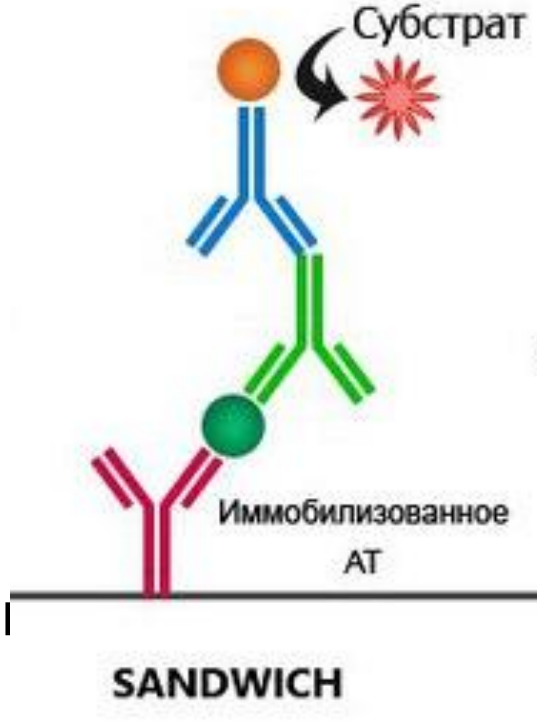
- Непрямой твердофазный ИФА (определяют АТ):

1. На дне лунок адсорбированы определенные Аг возбудит
2. Добавляют сыворотку пациента (потенциально содержит АТ к возбудителю)
3. Инкубируют в течение 30-60 мин для образования комплекса Аг-АТ
4. Промывка физраствором (в лунках остаются лишь те АТ, которые связались с Аг)
5. Добавляют антиглобулиновые АТ, меченные ферментом (АТ кролика против человеческих АТ)
6. Ставят на контакт для связывания АТ с АТ
7. Промывка физраствором (в лунках остаются лишь те АТ, которые связались с АТ)
8. Внесение субстрата в смесь, где есть ферментная метка связанная с АТ; в результате фермент расщепляет субстрат, что проявляется в виде окрашивания смеси

Непрямой твердофазный ИФА (2)



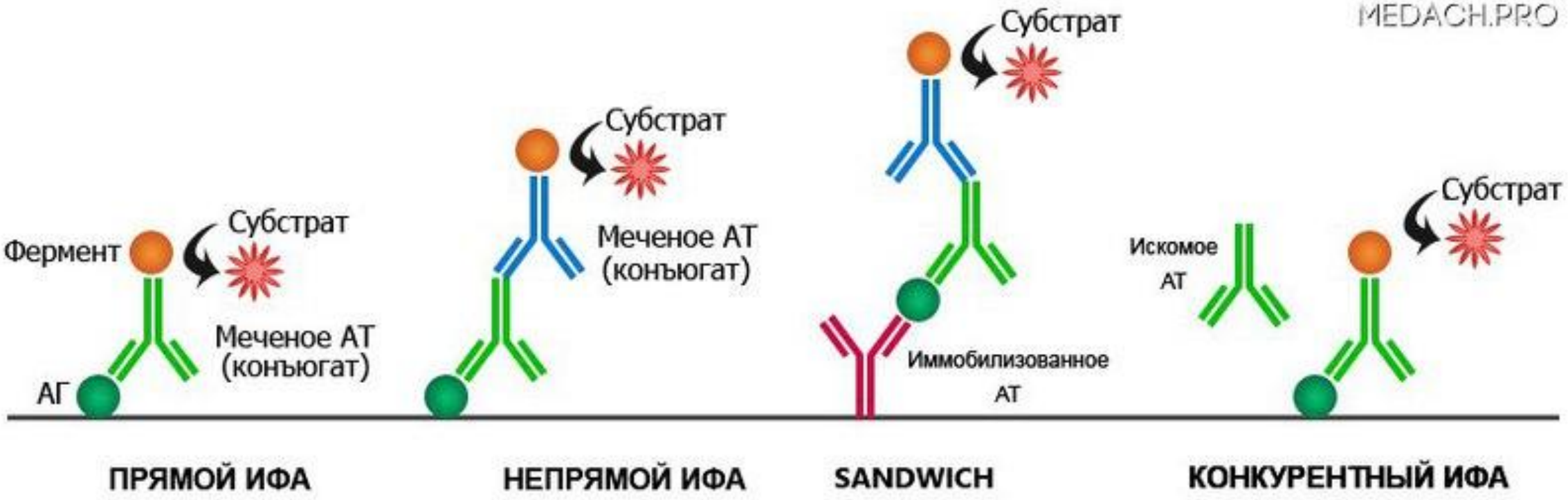
Сэндвич ИФА

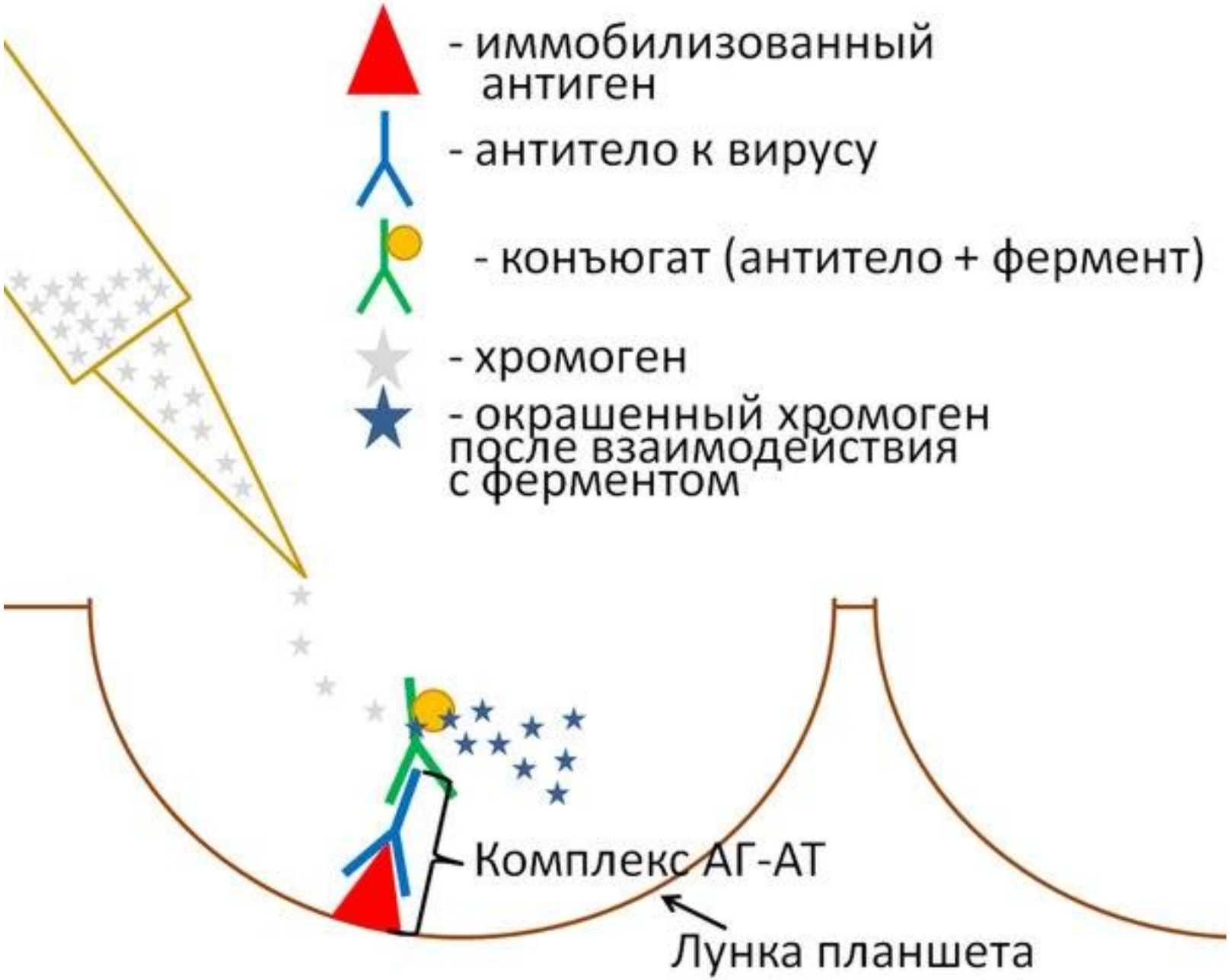


- Сэндвич ИФА (определяют Аг):

1. На дне лунок адсорбированы определенные АТ против возбудителя
2. Добавляют клинический материал от пациента (потенциал содержит Аг возбудителя)
3. Инкубируют для образования комплекса Аг-АТ
4. Промывка физраствором (в лунках остаются лишь те Аг, которые связались с АТ)
5. Добавляют первичные АТ, а затем и вторичные, связанные с ферментой меткой
6. Промывка физраствором (в лунках остаются лишь те АТ, которые связались с АТ)
7. Внесение субстрата в смесь, где есть ферментная метка связанная с АТ; в результате фермент расщепляет субстрат, что проявляется в виде окрашивания смеси

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ




- иммобилизованный антиген
- антитело к вирусу
- конъюгат (антитело + фермент)
- хромоген
- окрашенный хромоген после взаимодействия с ферментом
Комплекс АГ-АТ
Лунка планшета

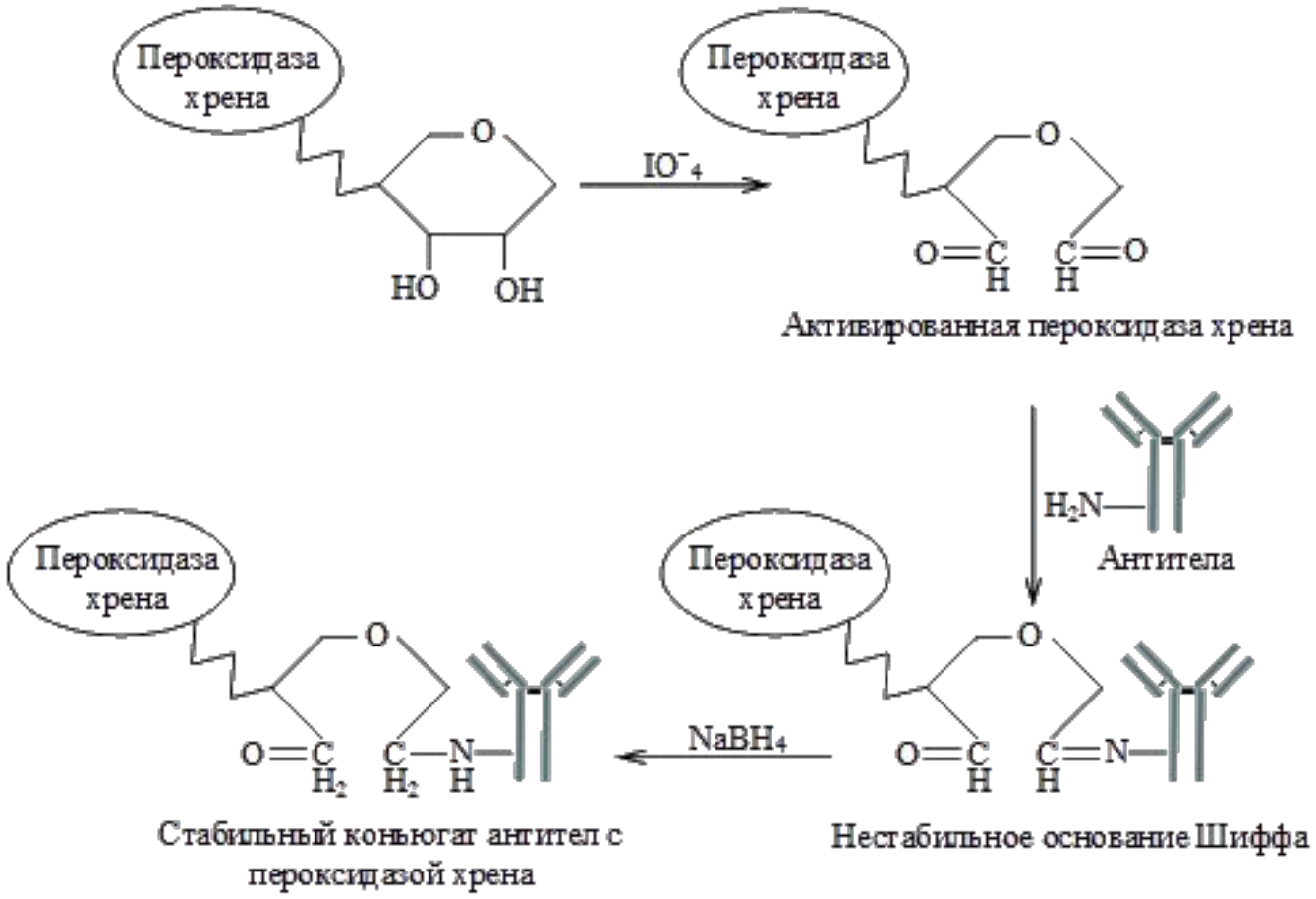
Ферментная метка в ИФА (1)

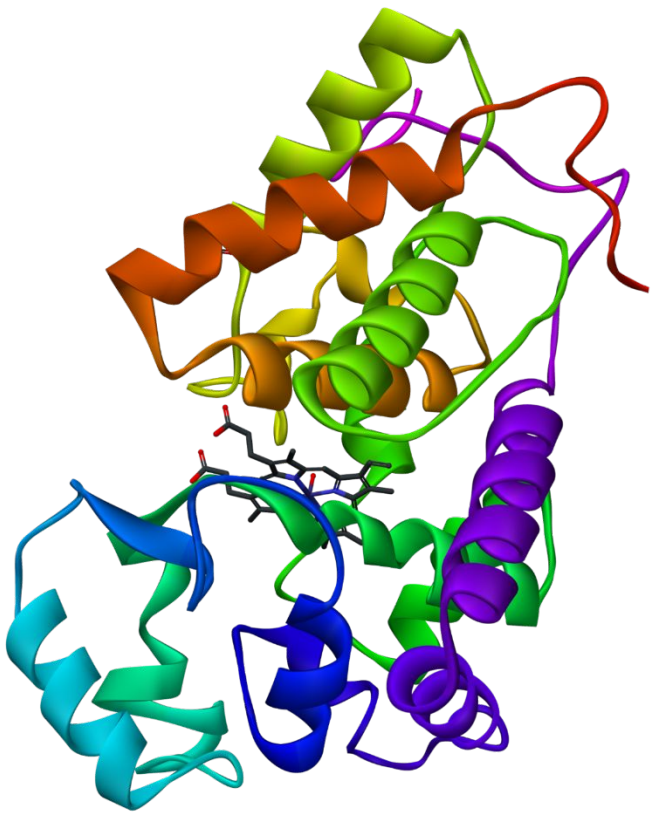
- Наибольшее распространение в ИФА (где используются реагенты, иммобилизированные на поверхности твёрдых носителей) получили следующие ферменты

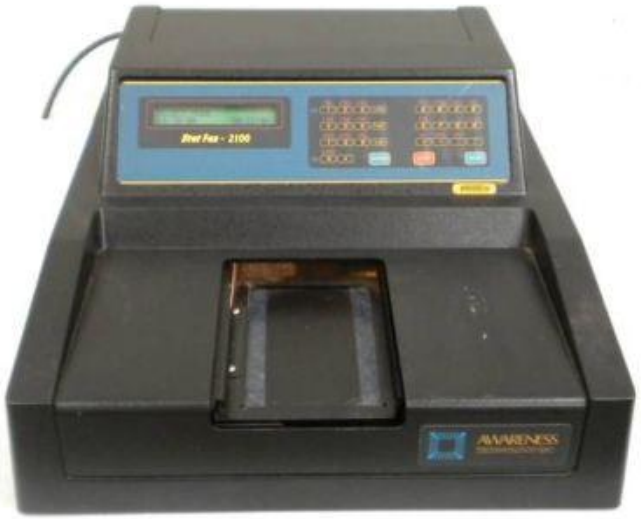
1. пероксидаза хрена
2. щелочная фосфатаза
3. β-*D*-галактозидаза

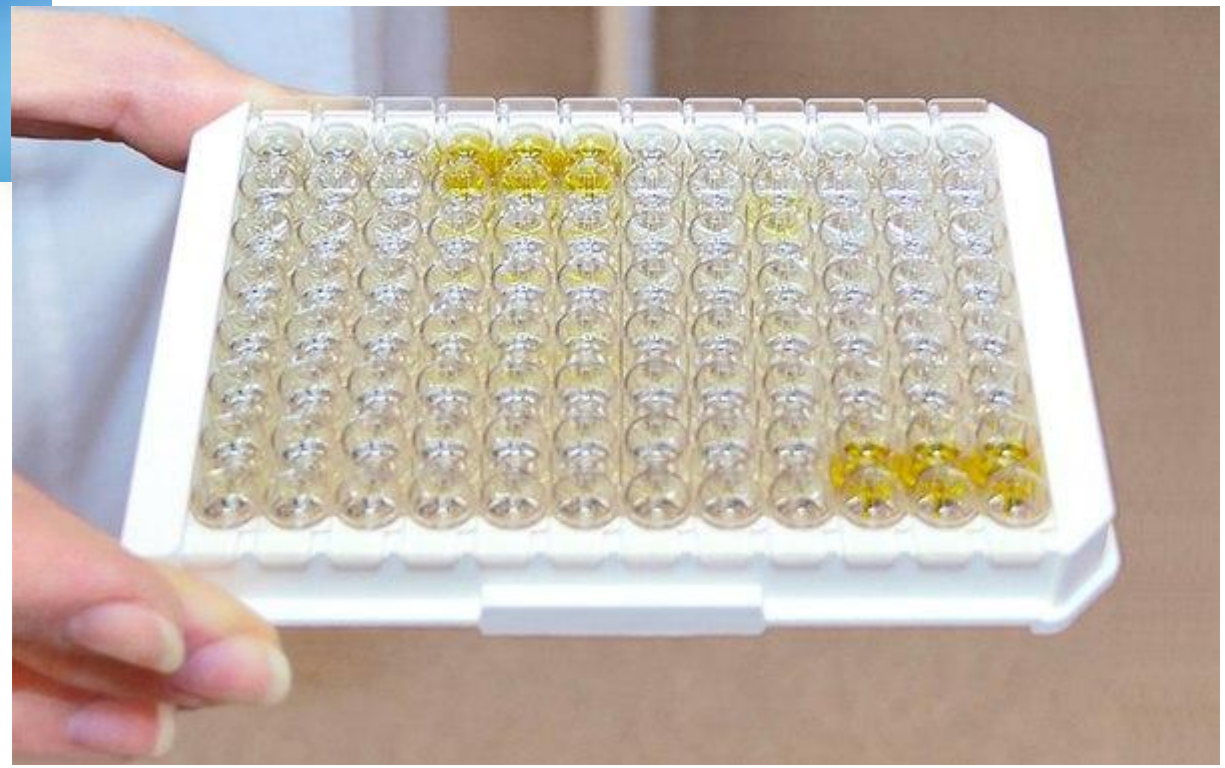
- Наиболее доступной является пероксидаза хрена. Она содержит легко окисляемые углеводные остатки, через которые может осуществляться связывание фермента с антителами или антигенами.
- В состав субстратной системы для измерения активности пероксидазы фотометрическим способом входят хромогены,

Ферментная метка в ИФА (2)






AVAREKESS



Определение АТ и интерпретация результатов

Показатель	Расшифровка
IgM–, IgG–	Отсутствие иммунитета к вирусу. Существует опасность первичного инфицирования
IgM–, IgG+	Иммунитет. Нет риска первичного заражения, риск вторичного обострения зависит от состояния иммунной системы, поддается профилактике
IgM+, IgG–	Первичное инфицирование. Необходимо лечение. Во время планирования беременности требует отсрочки зачатия до формирования иммунитета
IgM+, IgG+	Вторичное обострение. Необходимо лечение

Определение наличия IgM и IgG к вирусу простого герпеса I и II типа (ВПГ-1/-2) при планировании или во время беременности.
ВПГ-1/-2 входят в группу TORCH-инфекций, способных на ранних сроках беременности приводить к выкидышу за счет тератогенного действия, а на более поздних сроках вызывать серьезные пороки развития (катаракта, глаукома, глухота, пороки сердца и др.)

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

- Реакция иммунофлюоресценции – РИФ (МФА — метод флуоресцирующих антител, иммунофлюоресценция, метод Кунса) - является методом экспресс-диагностики для выявления антигенов микробов или определения антител.
- Различают три разновидности метода прямой, непрямой, с комплементом.
- В качестве флюорохрома в РИФ используют:

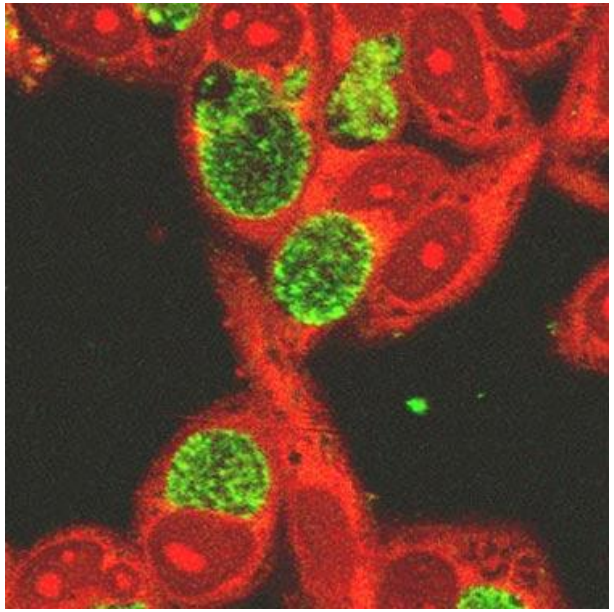
1. ФИТЦ (флуоресцеин изотиационат)
2. Родамин
3. Акридиновый оранжевый

Прямая РИФ

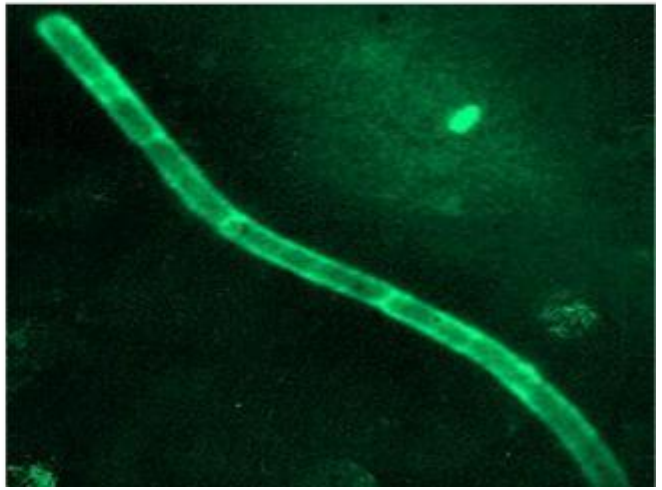
- Суть: прямой метод РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, меченными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа.
- Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.

Техника прямой РИФ

- Мазок - отпечаток обрабатывают сывороткой, где находятся АТ против возбудителя, которые связаны с флюорофором.
- Если в мазке содержится антиген, гомологичный антителам сыворотки, то образуется комплекс антиген + антитело.
- Препараты отмывают, сушат и исследуют под люминесцентным микроскопом, который устроен так, что на препарат падает пучок сине-фиолетовых лучей/УФ-лучей, а в глаз наблюдателя попадают только желто-зеленые лучи, которые испускает комплекс антиген + антитело.
- По этому свечению и судят о наличии в материале антигенов, гомологичных антителам меченой сыворотки.



Возбудитель урогенитального хламидиоза – *C. trachomatis*, в КК, обработанной люминесцирующей сывороткой



Возбудитель сибирской язвы – *B. anthracis*, обработанный люминесцирующей сывороткой, светится по периферии клетки в виде каймы

Непрямая РИФ (1)

- Суть: выявлении комплекса Аг+АТ с помощью антиглобулиновой сыворотки (АТ, меченные флуюорохромом против АТ)
- Техника:

1. Мазки из взвеси микробов (Аг) обрабатывают кроличьей сывороткой (первичные АТ);
2. Проводят отмывку, в ходе которой все не связавшиеся АТ вымываются
3. Добавляют антиглобулиновую сыворотку (АТ против АТ)
4. В результате образуются комплексы Аг+АТ+меченные флюорохромом АТ, которые наблюдают в люминесцентном микроскопе

бактерия
Флюорохром

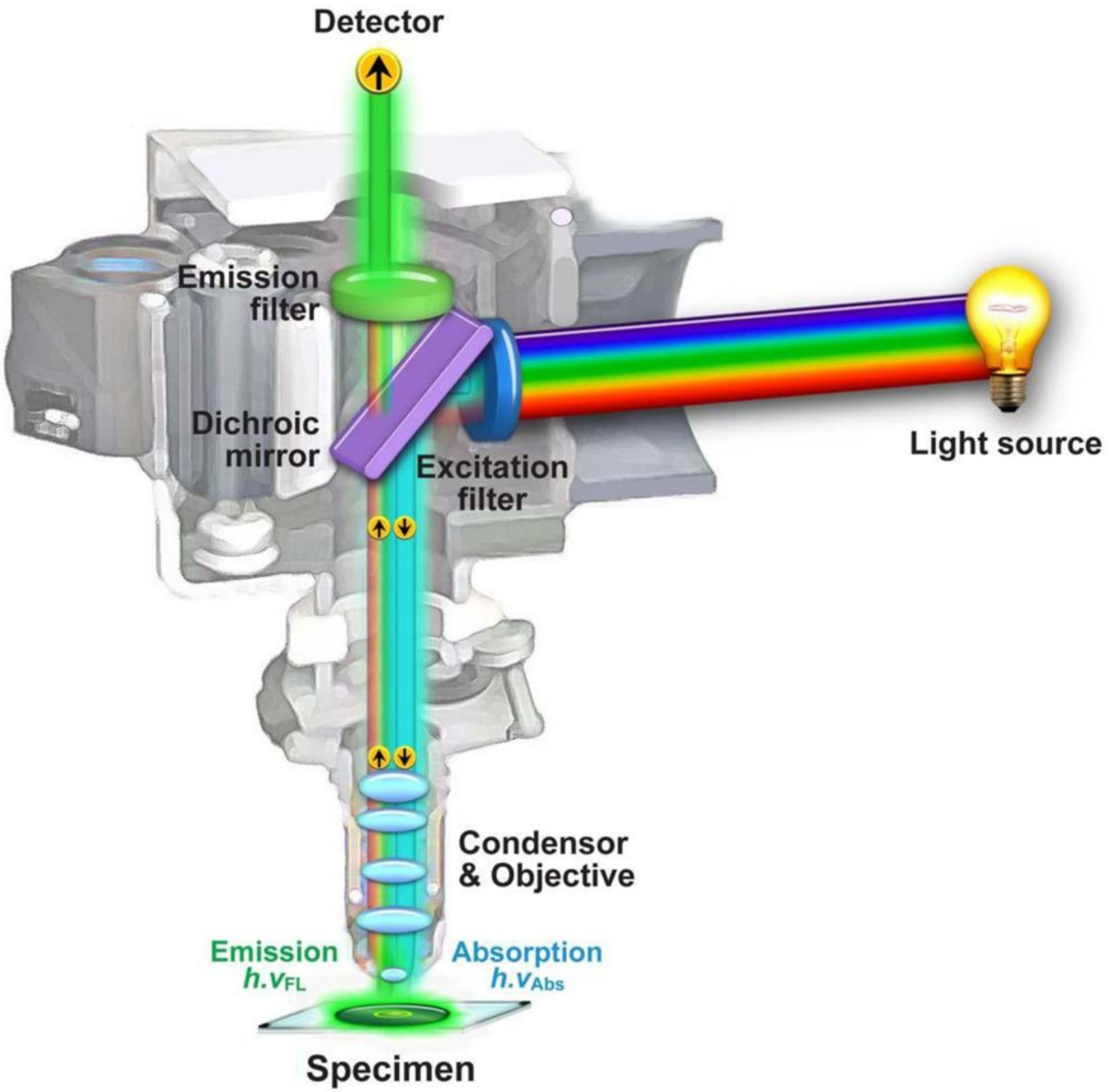
ФА
Специфические антитела
Аг
Непрямой метод

Люминесцентный микроскоп

- Для учета РИФ необходимо использование люминесцентного микроскопа.

Принцип работы люминесцентного микроскопа:

- Образец (клетки, бактерии, вирусы и т.д.) освещается пучком света определенного длины волны за счет набора специальных светофильтров (ультрафиолетовый или сине-фиолетовый свет).
- Свет достигнув образца абсорбируется флюорохромами, которыми предварительно обработали образец. При взаимодействии света и флюорохромов, последние испускают свет большей длины волны.


Detector
Emission filter
Dichroic mirror
Excitation filter
Light source
Condensor & Objective
Emission
$h.v_{FL}$
Absorption
$h.v_{Abs}$
Specimen

Преимущества и недостатки РИФ

- Плюсы:

1. Экономичность.
2. Наличие широкого спектра диагностических наборов.
3. Быстрота получения ответа.

- Минусы:

1. Субъективность.
2. Неспособность идентификации мелких бактерий (микоплазмы, ЭТ хламидий).

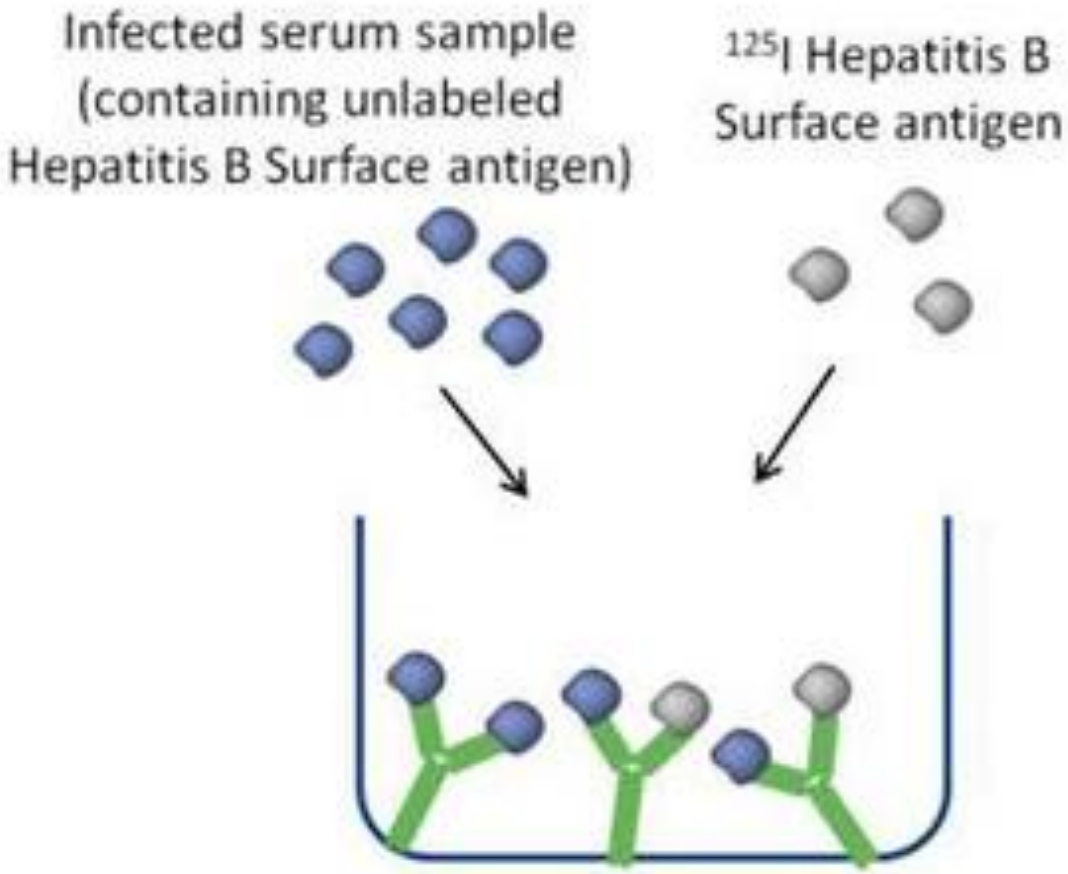
Радиоиммунный анализ

- Радиоиммунный анализ или изотопный иммунологический анализ - высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген - антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом (^{125}I, ^{14}C, ^{3}H, ^{51}Cr и др.).
- Наиболее часто используют конкурентный РИА
- РИА основан на конкурентном связывании искомых стабильных и аналогичных им меченных радионуклидом веществ со специфическими связывающими системами, с последующей детекцией на специальных счётчиках — радиоспектрометрах (определение бета- или гамма-излучения).

Конкурентный РИА

- Техника:

1. Известное количество антител смешивают с известным количеством меченого антигена и исследуемой пробой (содержащей неизвестное количество антигена).
2. Антиген, содержащийся в пробе, и стандартные меченые антигены связываются с антителами;
3. Чем выше содержание немеченого антигена, тем меньше меченого антигена свяжется с антителами.
4. Концентрацию антигена в исследуемой пробе оценивают по уровню радиоактивности иммунных комплексов.


Infected serum sample
(containing unlabeled
Hepatitis B Surface antigen)
^{125}I Hepatitis B
Surface antigen

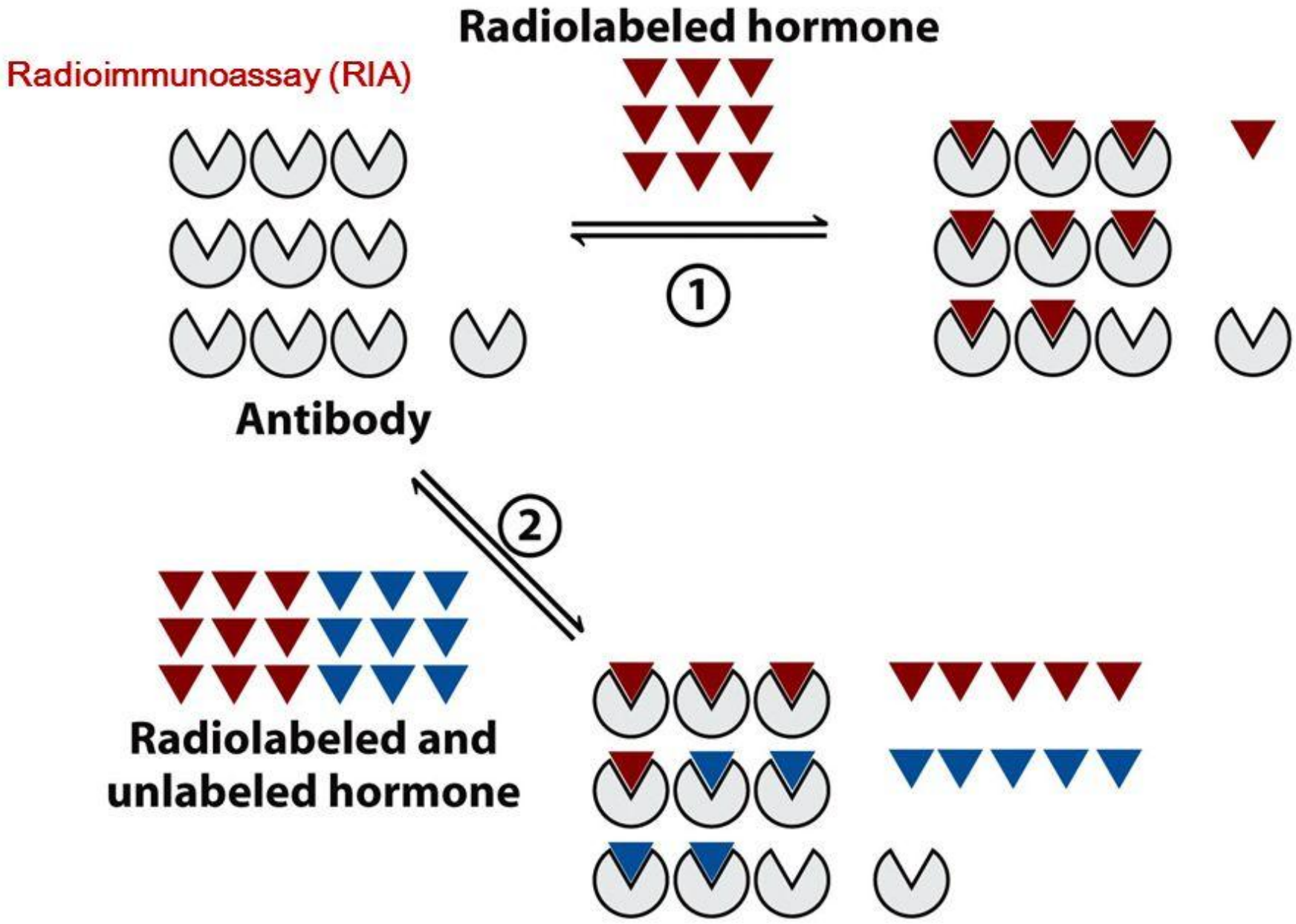


Figure 23-3a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Преимущества и недостатки РИА

Преимущества:

1. Радиоиммунный анализ (РИА) является чрезвычайно чувствительным методом, который может быть использован для количественного определения любого антигена.
2. Чувствительность метода позволяет выявлять незначительные количества антигена.

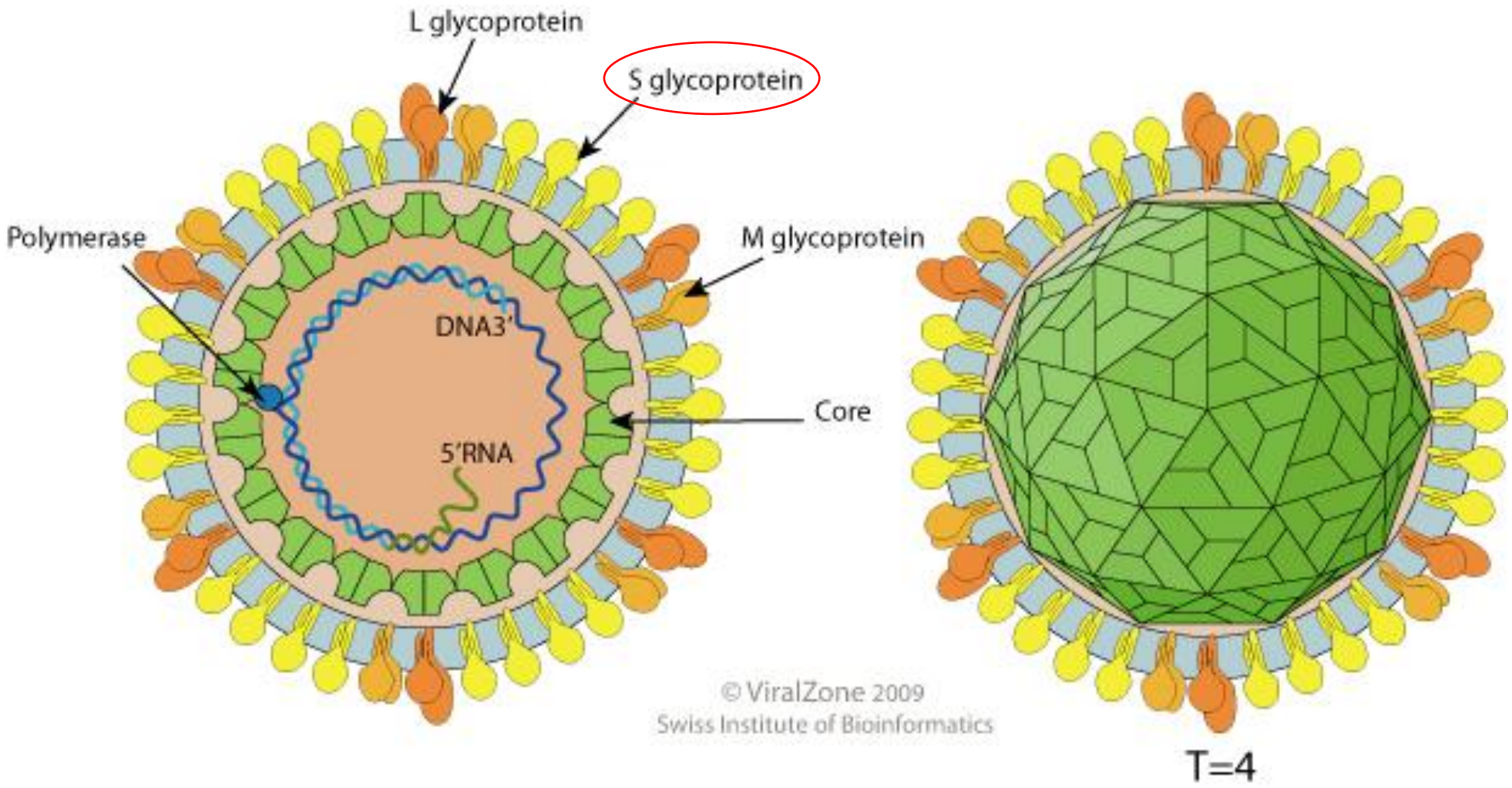
Недостатки:

1. Основные недостатки метода - необходимость дорогостоящего оборудования и реактивов, а также условий работы с радиоактивными изотопами.

Применение РИА

- РИА широко применяют для количественного определения различных веществ:

1. гормонов (инсулина, гормона роста, адренокортикотропного гормона, трийодтиронина, тироксина, эстрогена),
2. белков сыворотки крови (IgE, а-фетопротеина и др.),
3. метаболитов (фолиевой кислоты, циклических нуклеотидов и др.),
4. лекарственных препаратов (дигоксина, дигитоксина, мор фина),
5. микробных антигенов (HBsAg).


L glycoprotein
S glycoprotein
Polymerase
M glycoprotein
DNA3'
Core
5'RNA
© ViralZone 2009
Swiss Institute of Bioinformatics
T=4

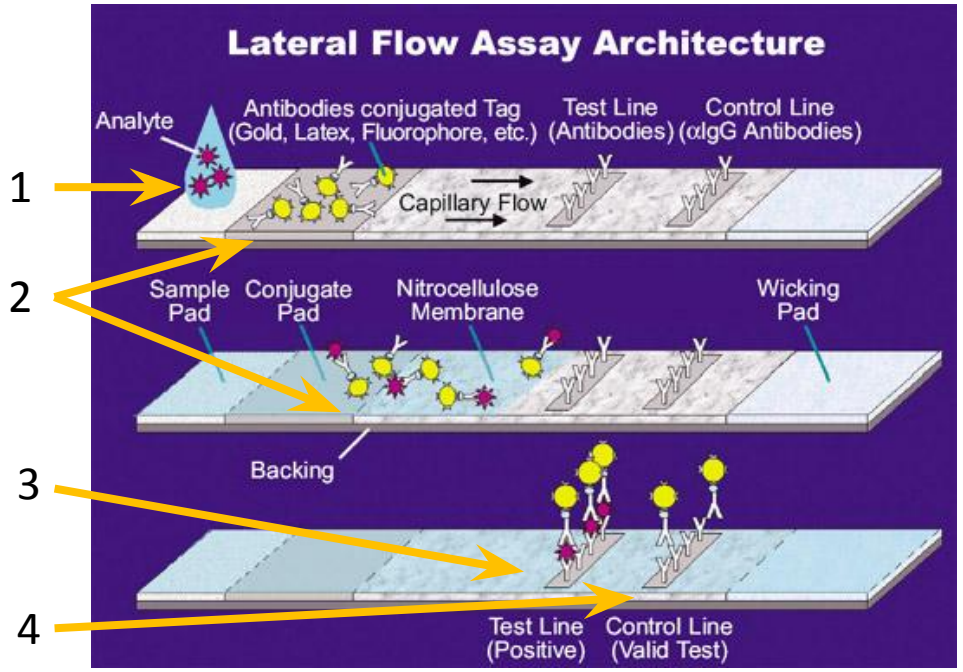
Учет результатов

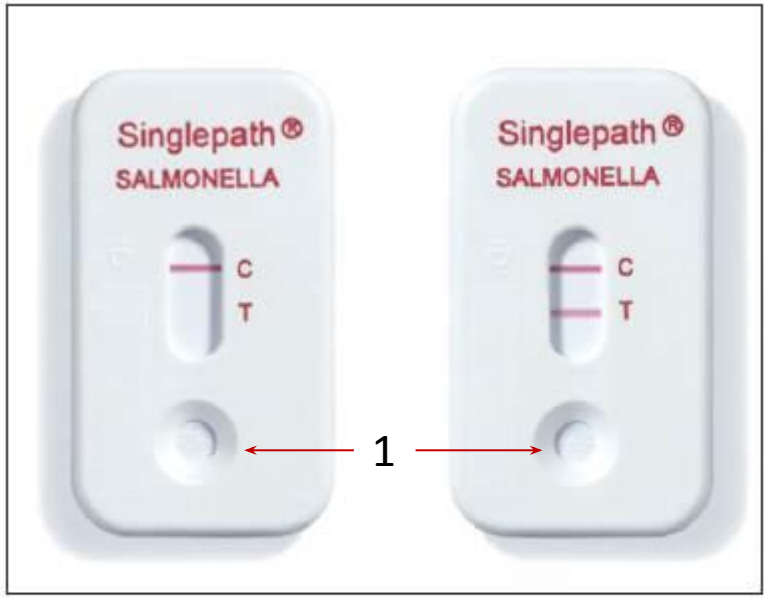
РИГ-12 "Прогресс-РИА" 12-канальный гамма-радиометр для радиоиммунного анализа *in vitro*

Иммунохроматографический анализ (ИХА)

- ИХА - иммунохимический метод анализа, основанный на принципе тонкослойной хроматографии и включающий реакцию между антигеном и соответствующем ему антителом в биологических материалах. Проводится с помощью специальных тест-полосок, панелей или тест-кассет.
- Существует 2 метода ИХА:

1. Прямой (сэндвич) ИХА – наиболее используемый вариант для диагностики инфекционных заболеваний.
2. Конкурентный ИХА (определение низкомолекулярных веществ).





1. Исследуемый клинический материал (аналит) с Аг возбудителя капают в специальное «окошко»
   - Аналит движется к другому краю тест-полоски под действием по принципу тонкослойной хроматографии (капиллярный поток)
2. Дальше аналит проходит зону с меченными АТ, против Аг возбудителя и связывается с ними
3. Затем комплекс Аг-АТ проходит тестовую зону, на которую нанесены Ат против возбудителя, которые фиксируют иммунный комплекс (сэндвич: АТ-Аг-АТ)
4. Оставшиеся несвязанные меченные АТ проходят следующую зону (контрольная зона) и связываются с антивидовыми АТ (АТ, которые вырабатываются у лабораторных животных на введение человеческих АТ)
5. Учет результатов: 2 полоски (положительный результат) – подтверждает наличие Аг в материале; 1 полоска (отрицательный результат) – в материале возбудителя не обнаружено

Рис. 1. Иммунохроматографический тест Singlepath® *Salmonella* для экспрессного определения сальмонелл. Слева – отрицательный ответ; справа – положительный ответ

Российский производитель диагностических тестов
ООО «ФАКТОР-МЕД»
НАБОР ПОЛОСОК ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ
ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ МОРФИНА,
МАРИХУАНЫ, КОКАИНА И МЕТАМФЕТАМИНА
в моче
ИХА-4-МУЛЬТИ-ФАКТОР
РЕЗУЛЬТАТ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
(-)
РЕЗУЛЬТАТ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
(+)
МАРИХ М
АМФ АМФ
ОИФ
БЕНЗО.
АМФ.

OraQuick
ADVANCE
HIV-1/2
C
T
OraQuick
ADVANCE
HIV-1/2
C
T

Преимущества и недостатки ИХА

1. Быстрота
2. Легкость в применении
3. Учет результата без каких-либо дополнительных прибор (2 полоски – положительный результат, 1 полоска - отрицательный), что позволяет использовать ИХА даже в полевых условиях

Недостатки:

1. Разработано малое количество тест-систем для диагностики инфекционных заболеваний
2. В аналите должно находится большое количество Аг