

# 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

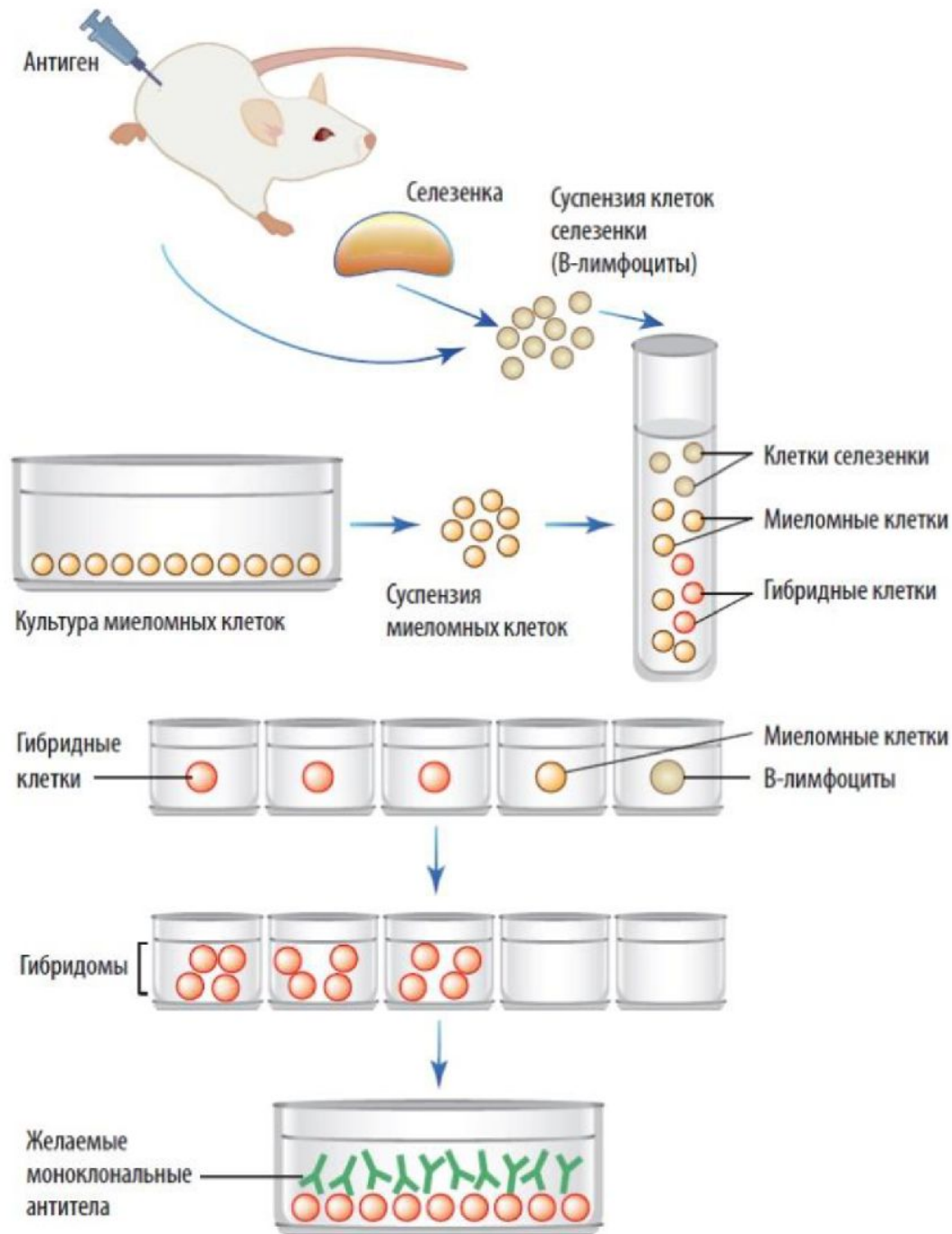
- Серологические реакции **различаются по способности выявлять отдельные классы антител**
  1. Так, например, **реакция агглютинации, хорошо выявляет IgM-антитела, но менее чувствительна для определения IgG-антител (РА: ↑IgM ↓IgG).**
  2. Реакции связывания комплемента, требует участия комплемента, и 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 плазмцитомы 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-розовый (при использовании щелочной фосфатазы).

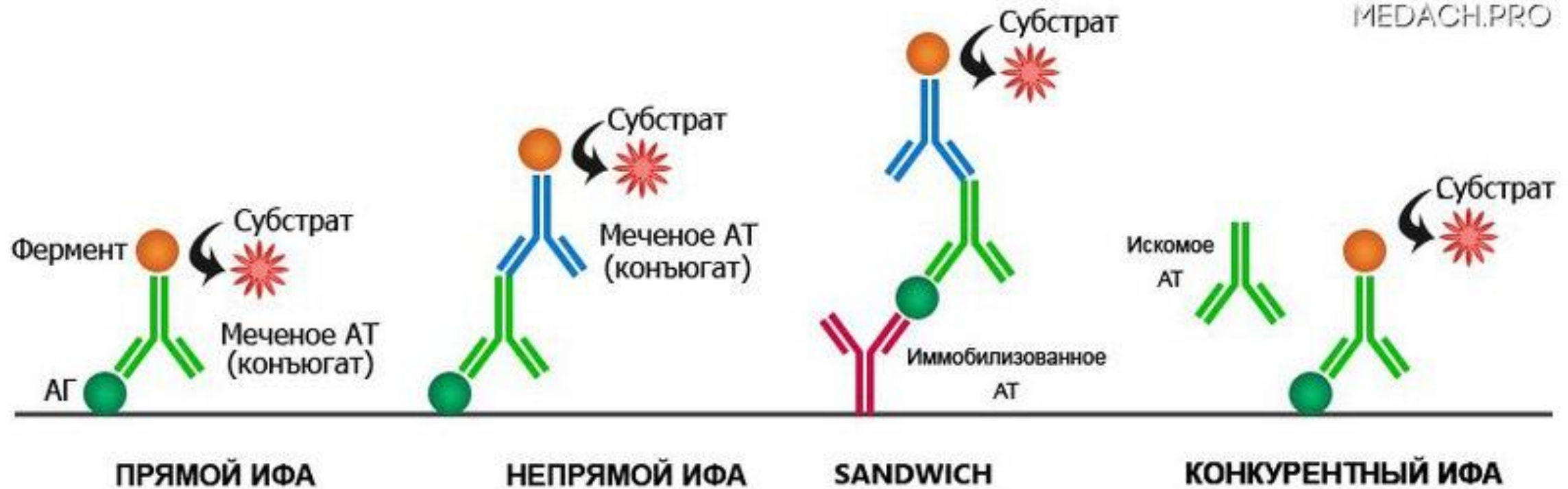
# Суть метода

- 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

MEDACH.PRO



# 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 отличается **высокая чувствительность** — обычно достаточно присутствия Аг в концентрации **1 нг/мл**.
- К настоящему времени созданы многочисленные **модификации базовой методики**.

# Прямой ИФА



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

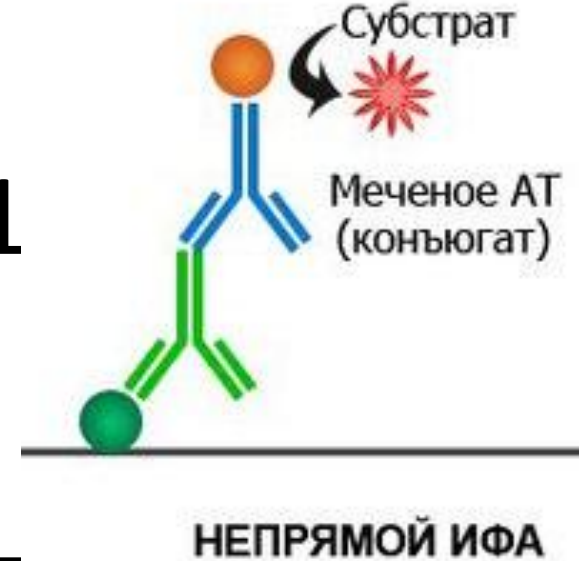
# Твердофазный ИФА (1)

- 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






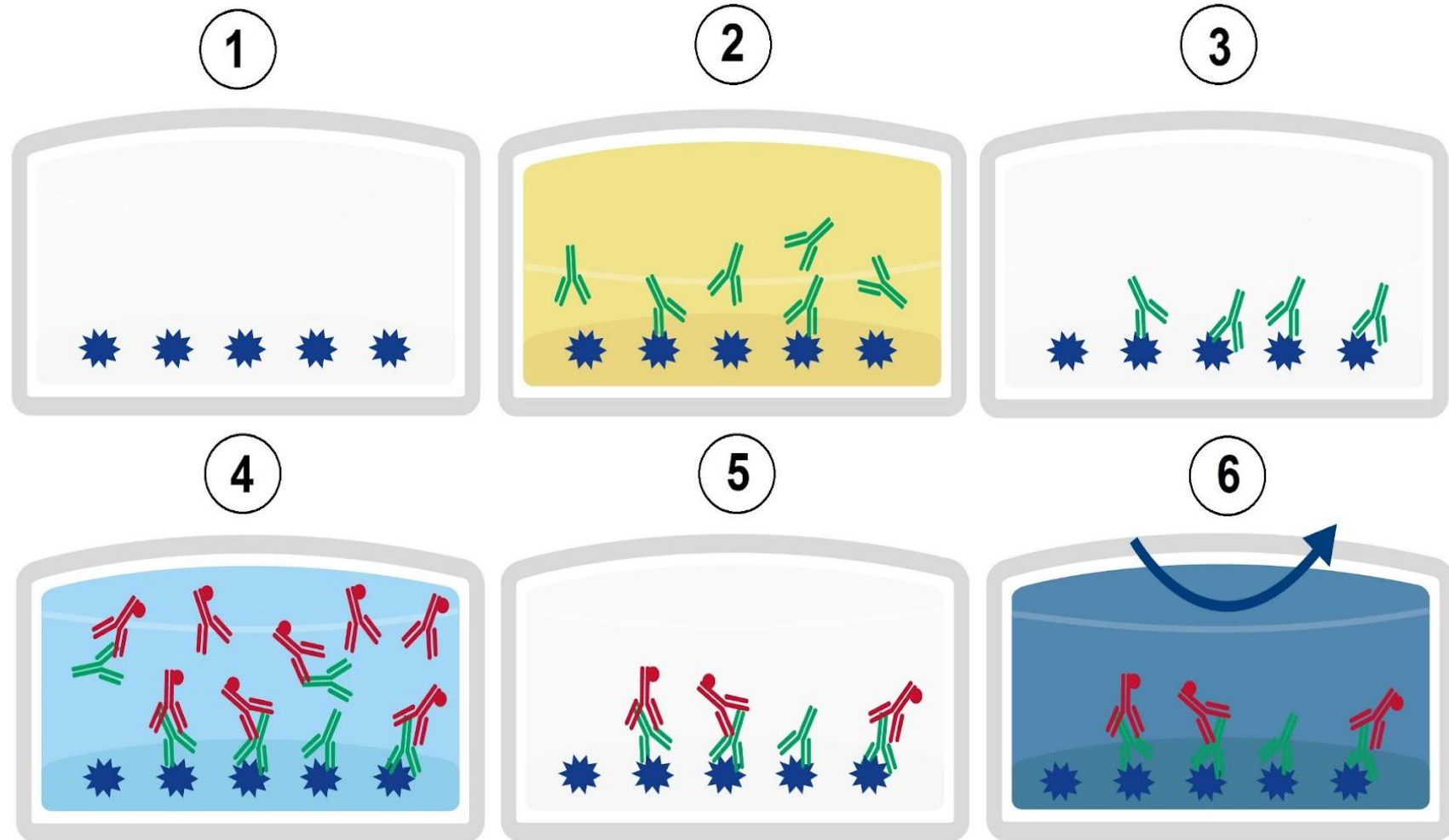
- **Непрямой твердофазный ИФА (определяют АТ):**

1. На дне лунок адсорбированы определенные Аг возбуждает
2. Добавляют сыворотку пациента (потенциально содержит АТ к возбудителю)
3. Инкубируют в течение 30-60 мин для образования комплекса Аг-АТ
4. Промывка физиологическим раствором (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 физиологическим раствором (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 окраски

# Непрямой твердофазный ИФА (2)

**Legend**

-  HRP-Detector Antibody
-  Target analyte
-  Immobilized antigen



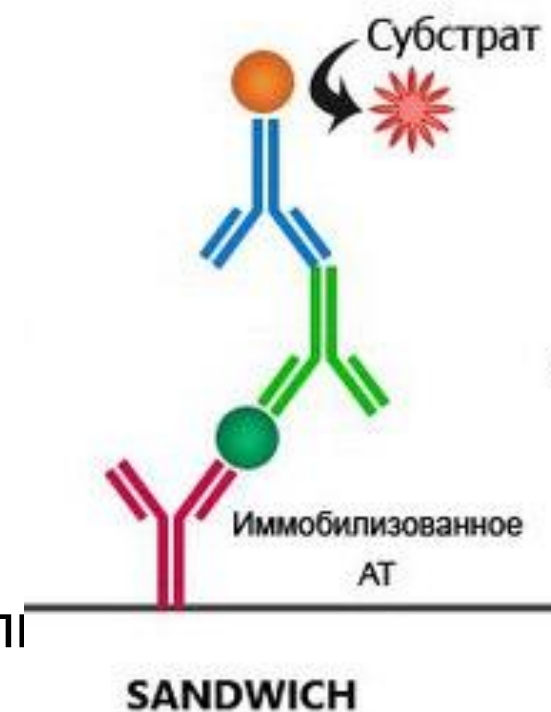




# Сэндвич ИФА

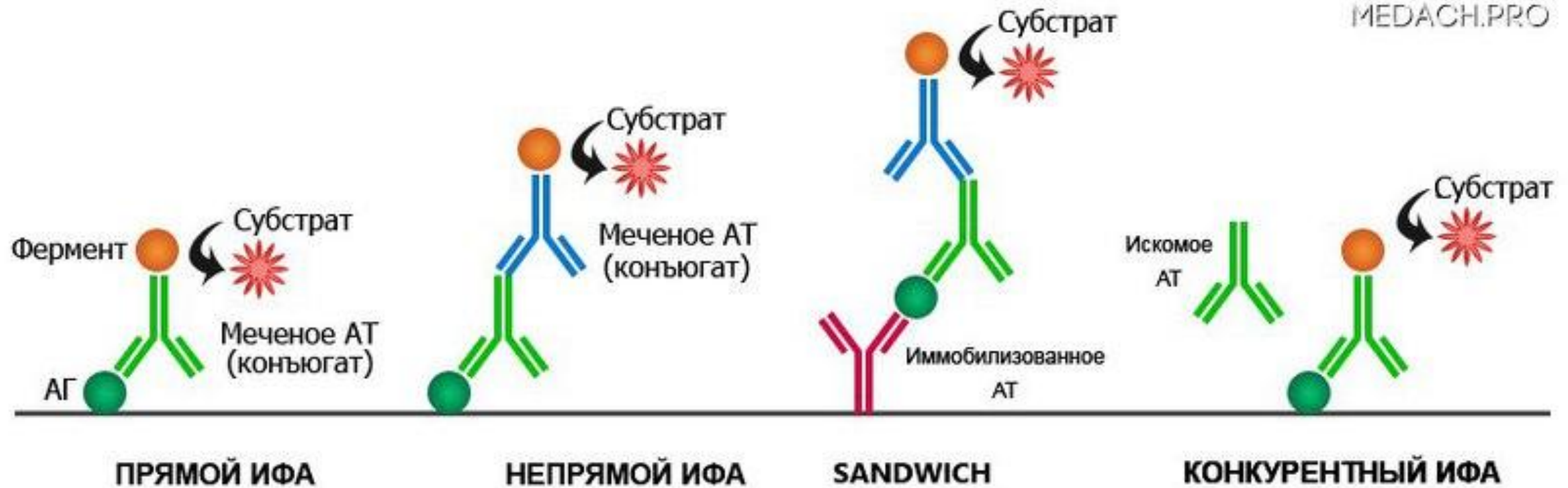
- Сэндвич ИФА (определяют Аг):

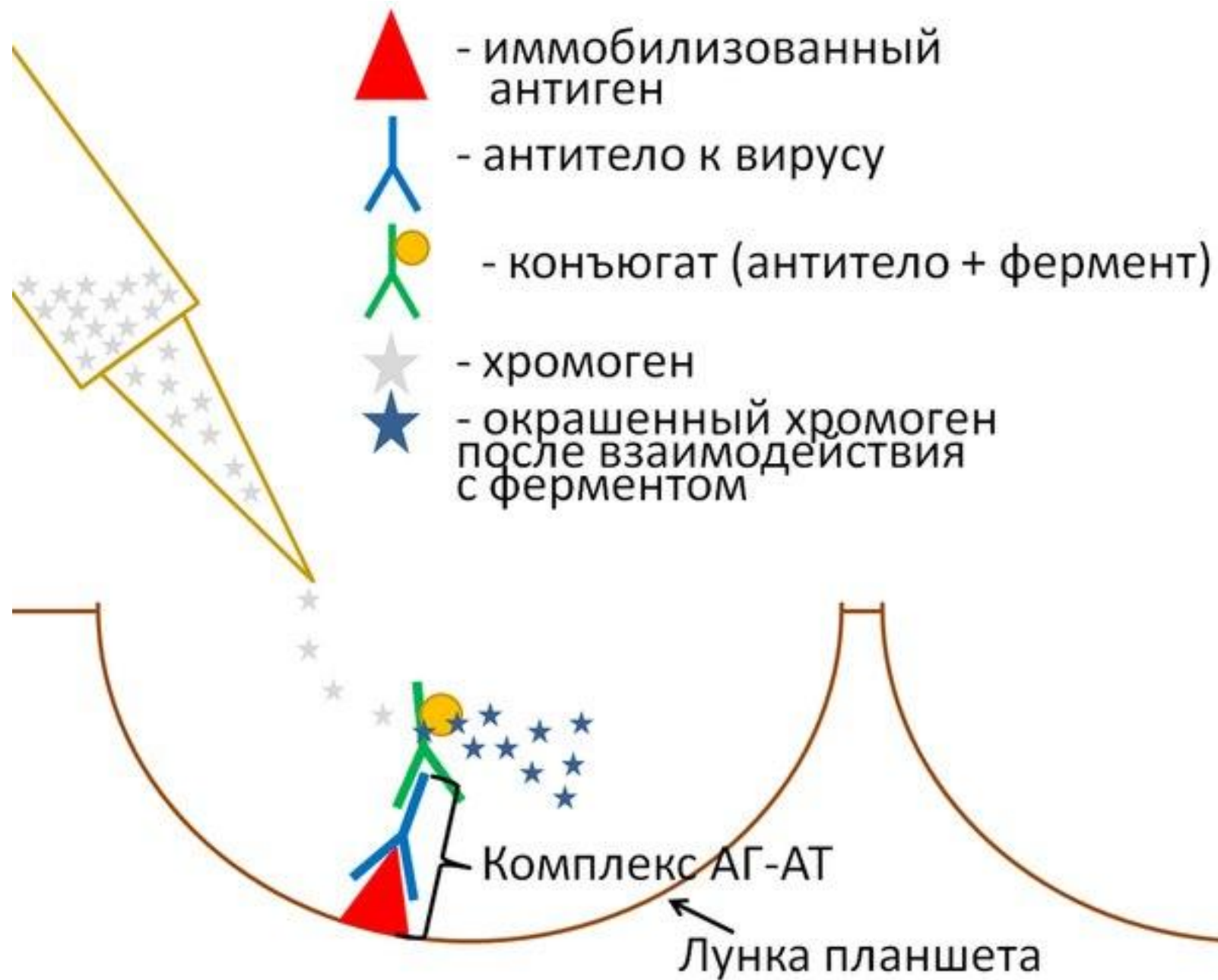
1. На дне лунок адсорбированы определенные АТ против возбудителя
2. Добавляют клинический материал от пациента (потенциал содержит Аг возбудителя)
3. Инкубируют для образования комплекса Аг-АТ
4. Промывка физраствором (в лунках остаются лишь те Аг, которые связались с АТ)
5. Добавляют первичные АТ, а затем и вторичные, связанные с ферментной 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

MEDACH.PRO





# Ферментная метка в ИФА (1)

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

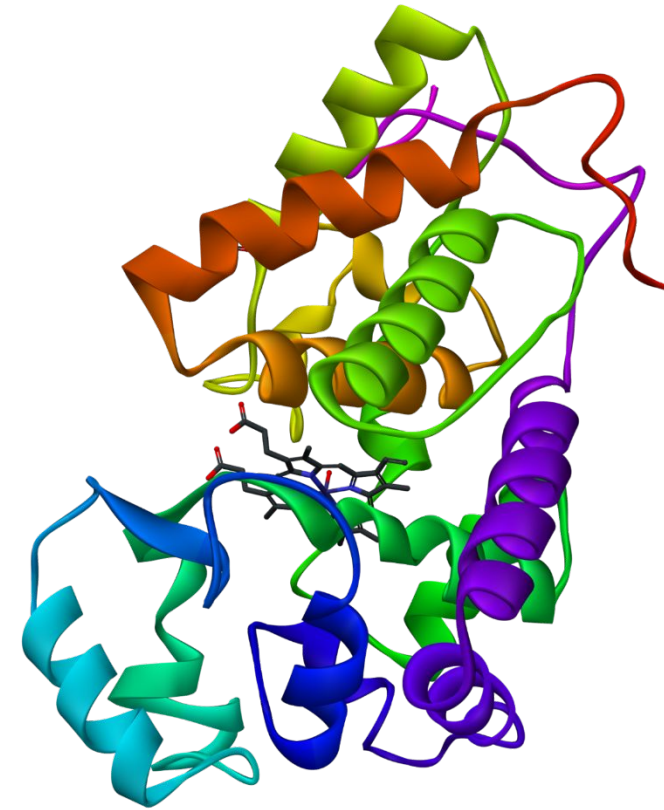
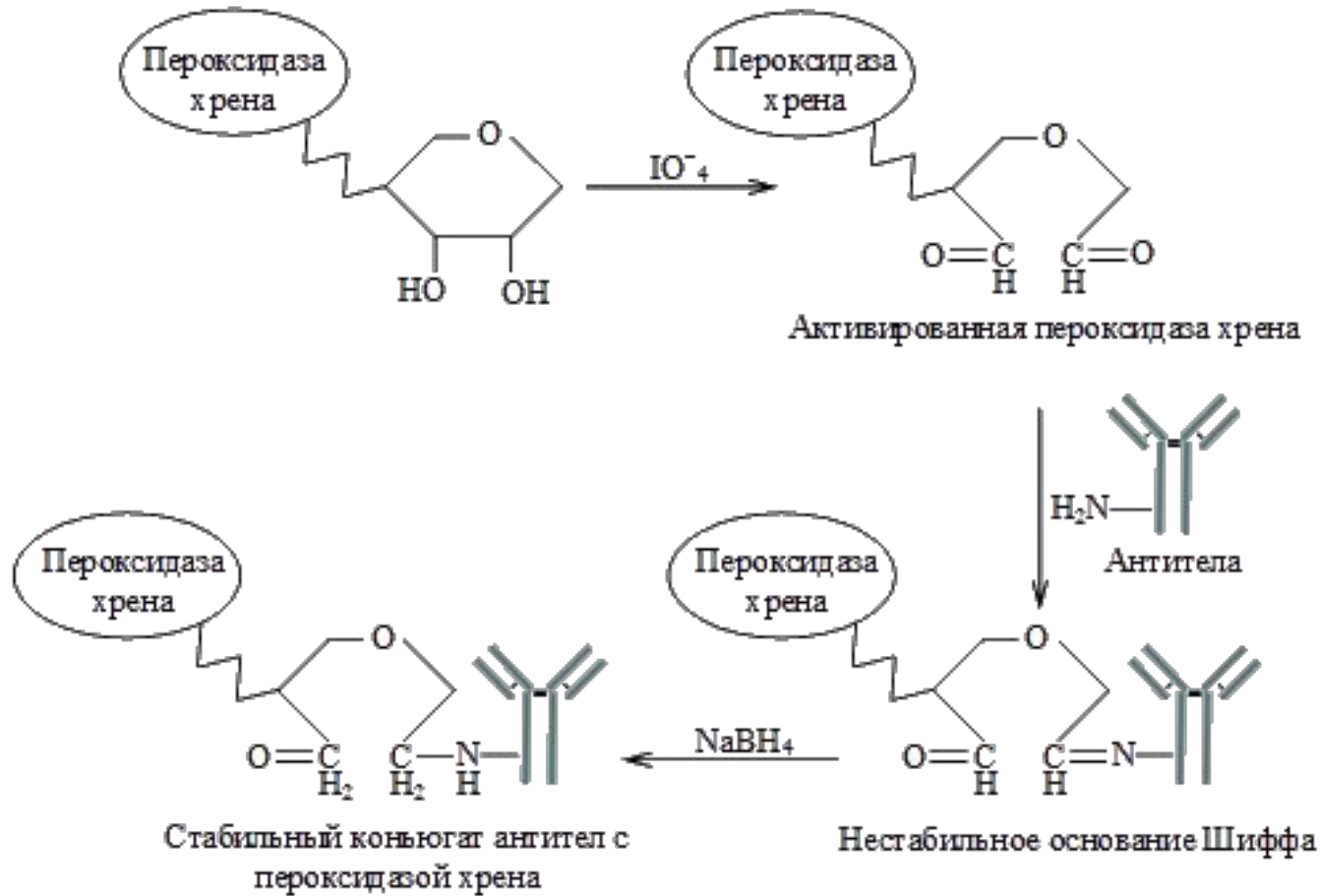
1. пероксидаза хрена

2. щелочная фосфатаза

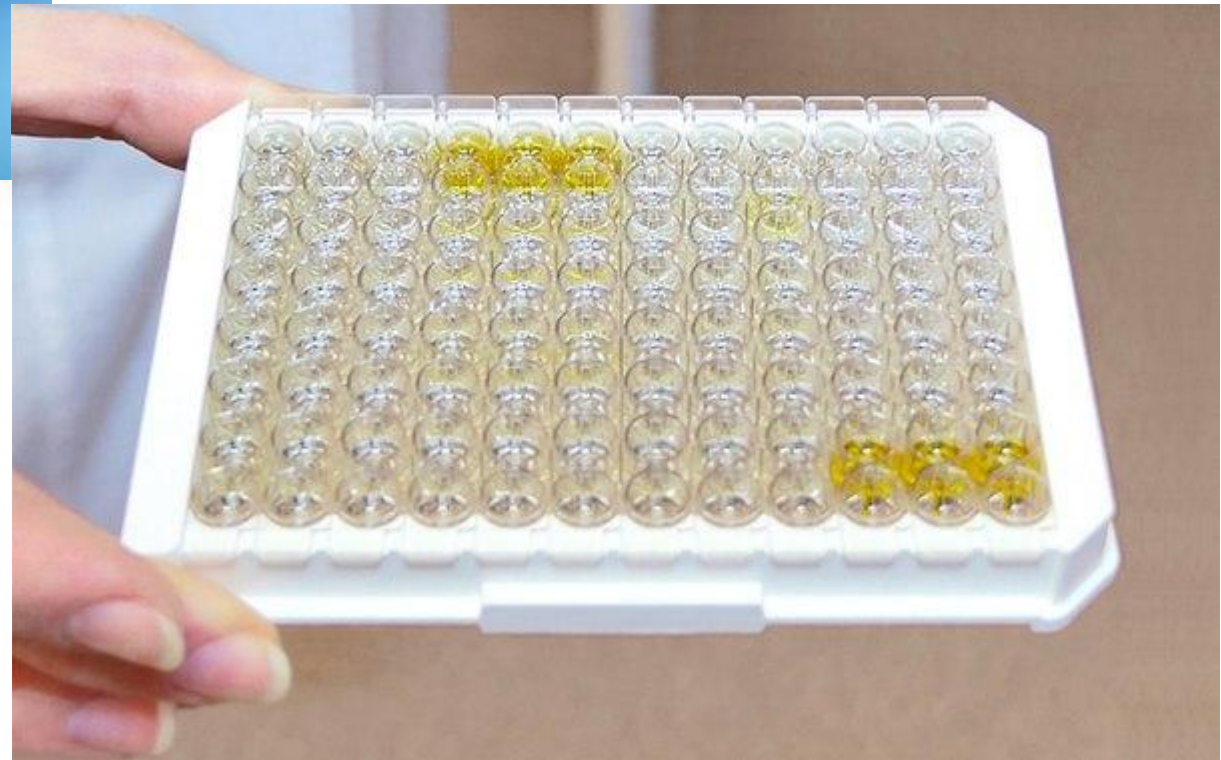
3.  $\beta$ -D-галактозидаза

- 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)







# 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 компонентом.
- В качестве флюорохрома в РИФ используют:
  1. **ФИТЦ (флуоресцеин изотиационат)**
  2. Родамин
  3. Акридиновый оранжевый

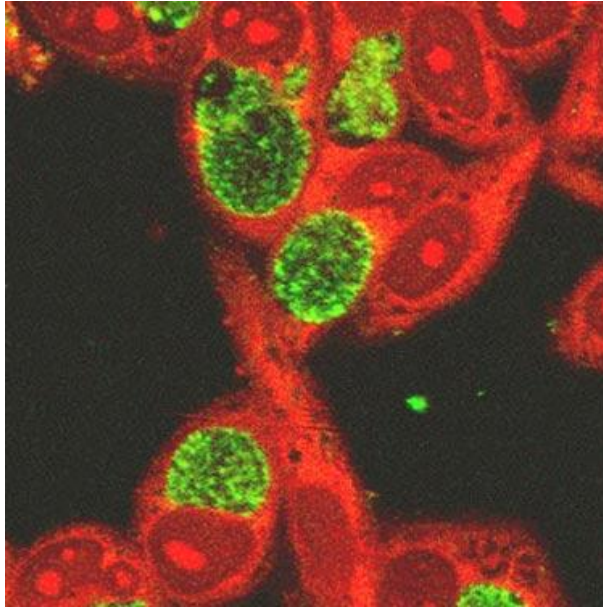


# Прямая РИФ

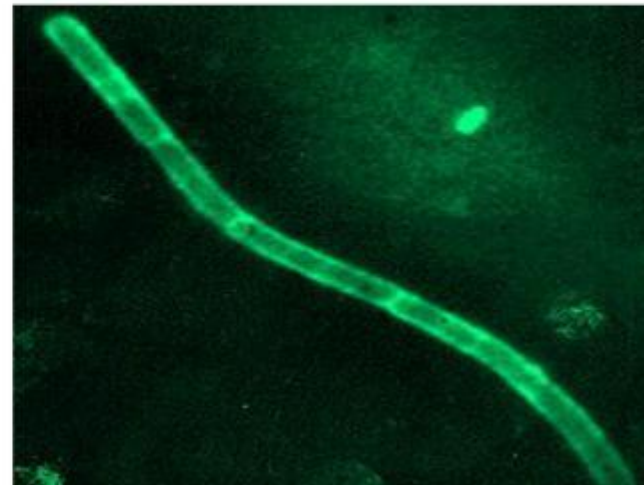
- Суть: прямой метод РИФ основан на том, что **антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа.**
- Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки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



Непрямой метод

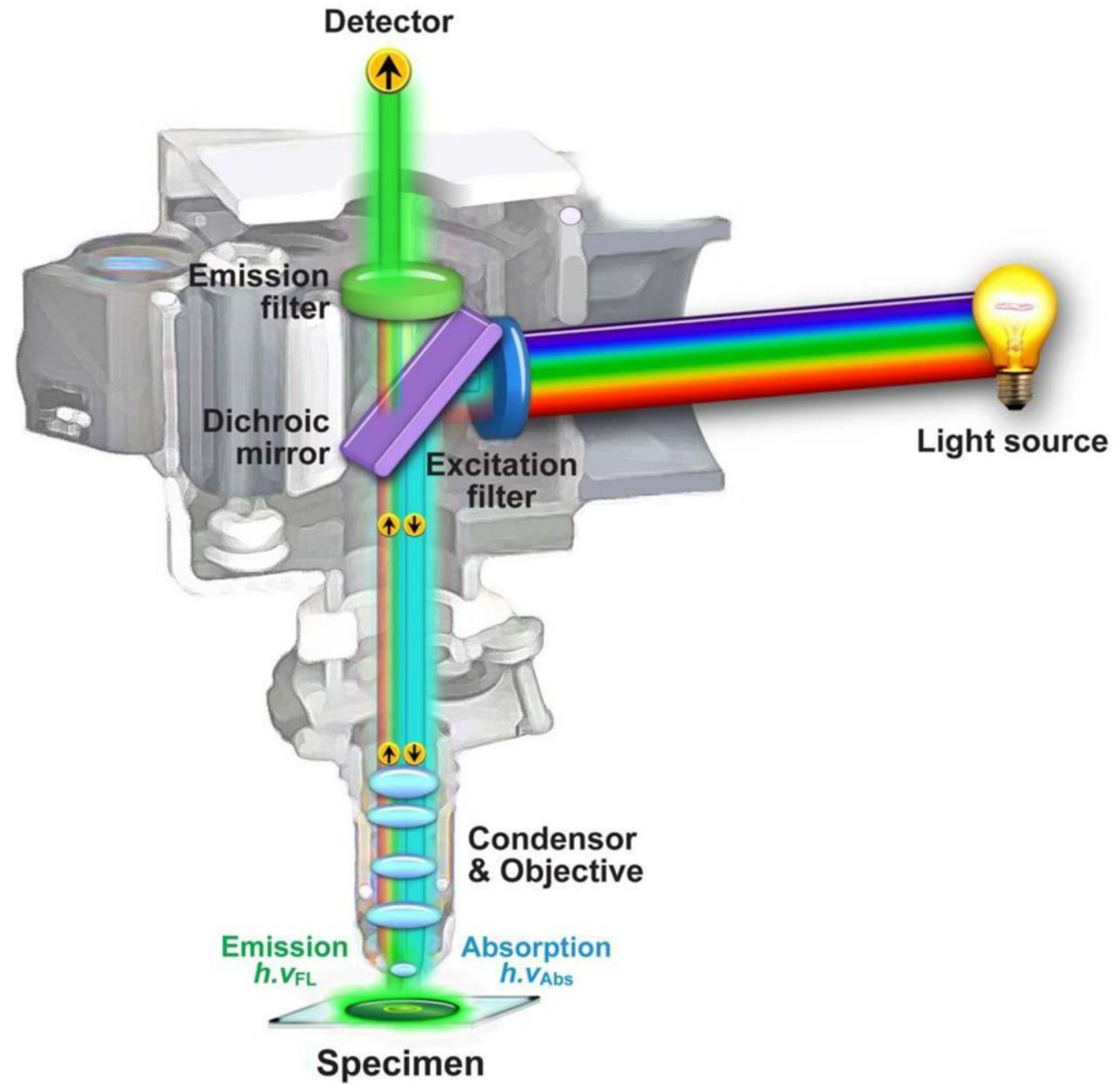
# Люминесцентный микроскоп

- Для учета РИФ необходимо использование люминесцентного микроскопа.

Принцип работы люминесцентного микроскопа:

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





# 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 ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  и др.).
- Наиболее часто используют конкурентный РИА
- РИА основан на конкурентном связывании искомым стабильных и аналогичных им меченных радионуклидом веществ со специфическими связывающими системами, с последующей детекцией на специальных счётчиках — радиоспектрометрах (определение бета- или гамма-излучения).

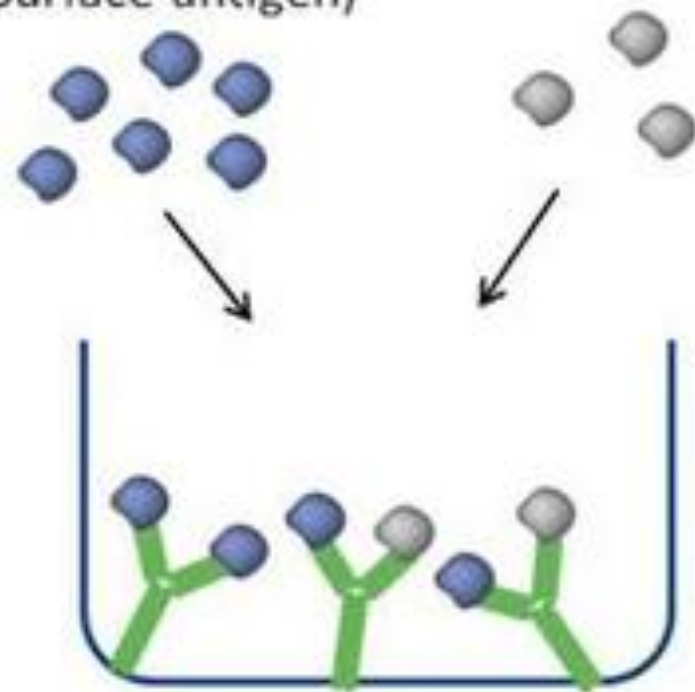
# Конкурентный РИА

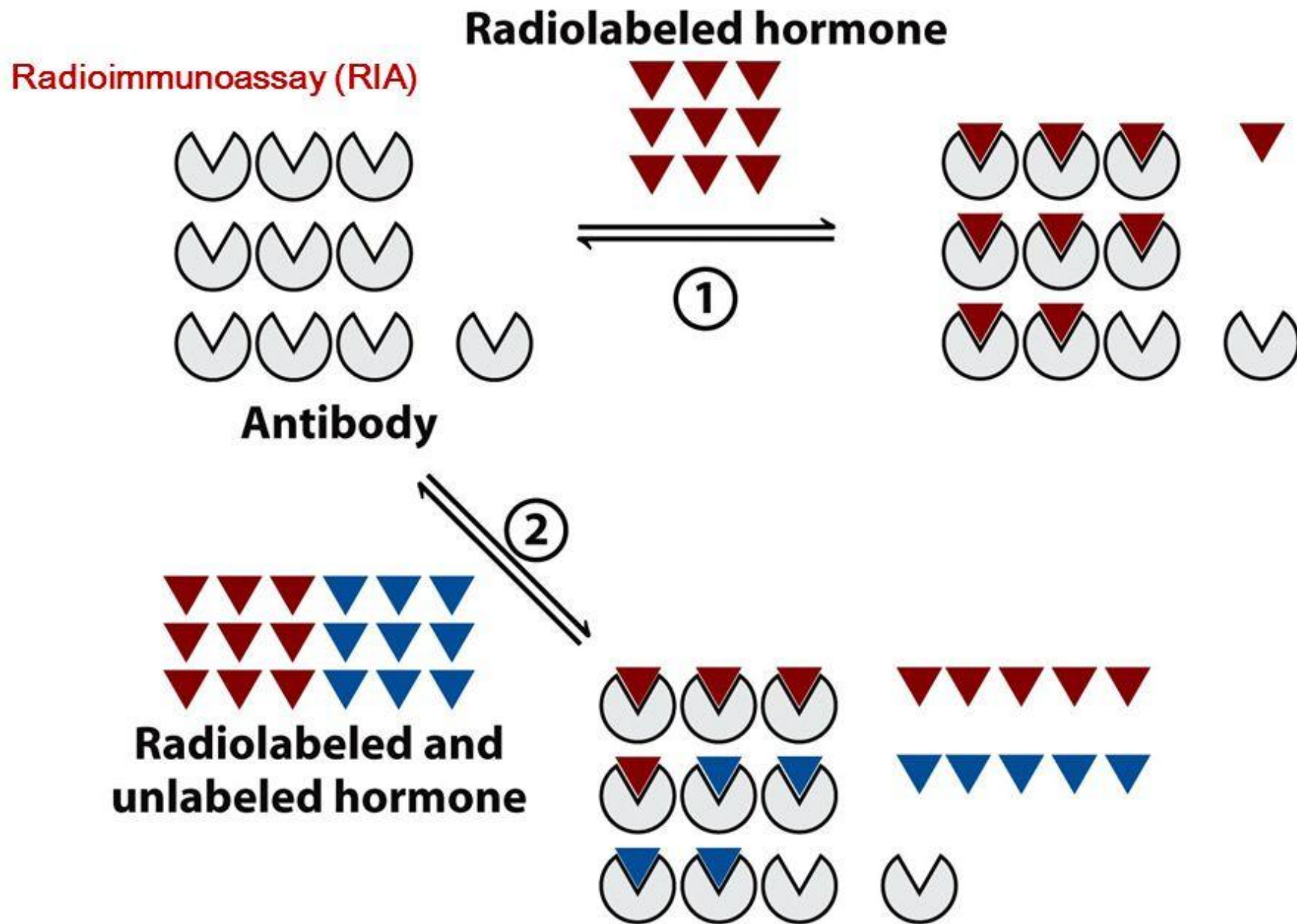
- Техника:

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)

$^{125}\text{I}$  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.

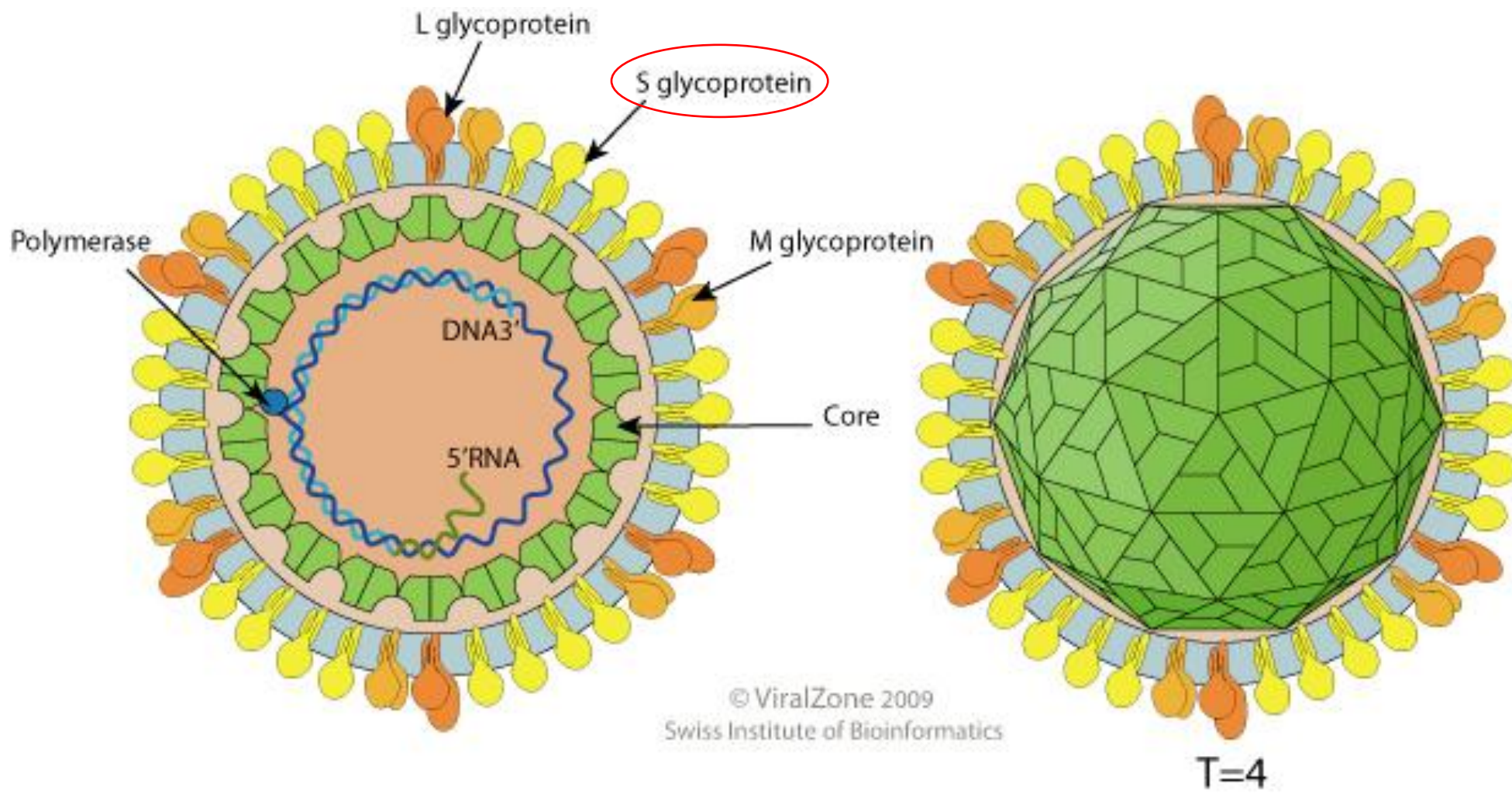
## Недостатки:

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, α-фетопротейна и др.),
  3. **метаболитов** (фолиевой кислоты, циклических нуклеотидов и др.),
  4. **лекарственных препаратов** (дигоксина, дигитоксина, морфина),
  5. **микробных антигенов** (HBsAg).





# Учет результатов



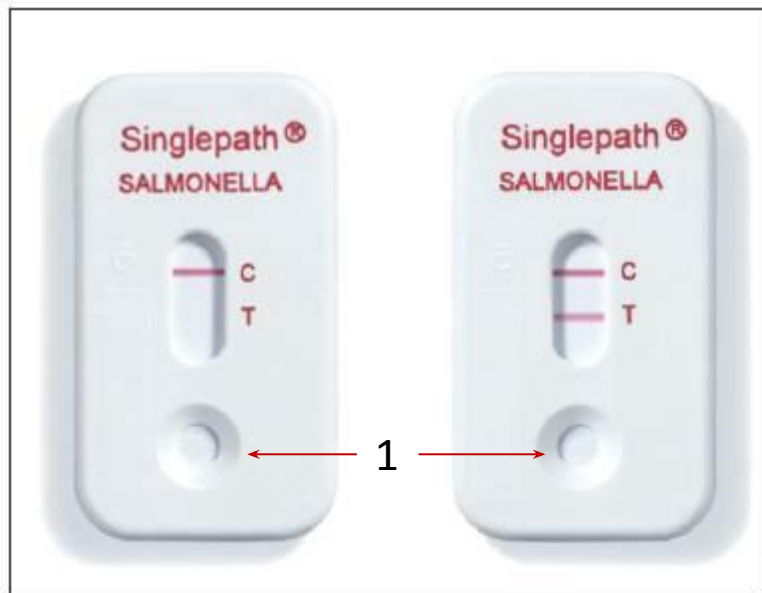
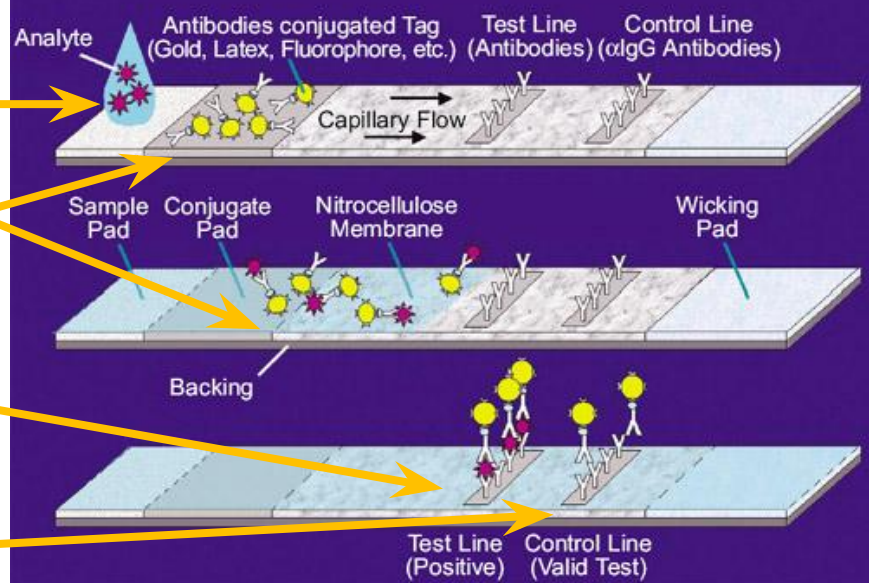
РИГ-12 "Прогресс-  
РИА" 12-канальный  
гамма-радиометр  
для  
радиоиммунного  
анализа *in vitro*



# 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).

## Lateral Flow Assay Architecture



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. Далее аналит проходит зону с мечеными 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**



# 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 анализе должно находиться большое количество Аг