

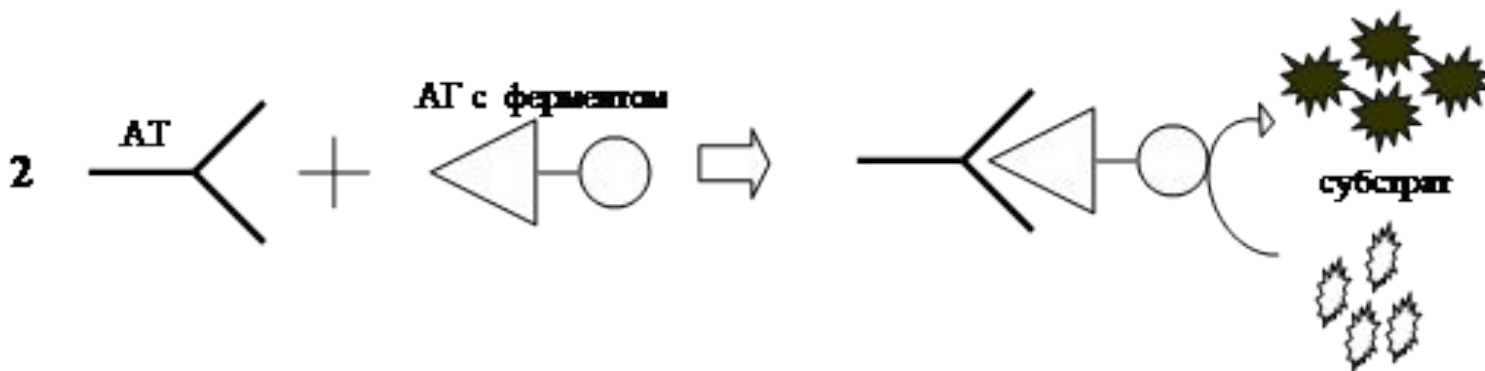
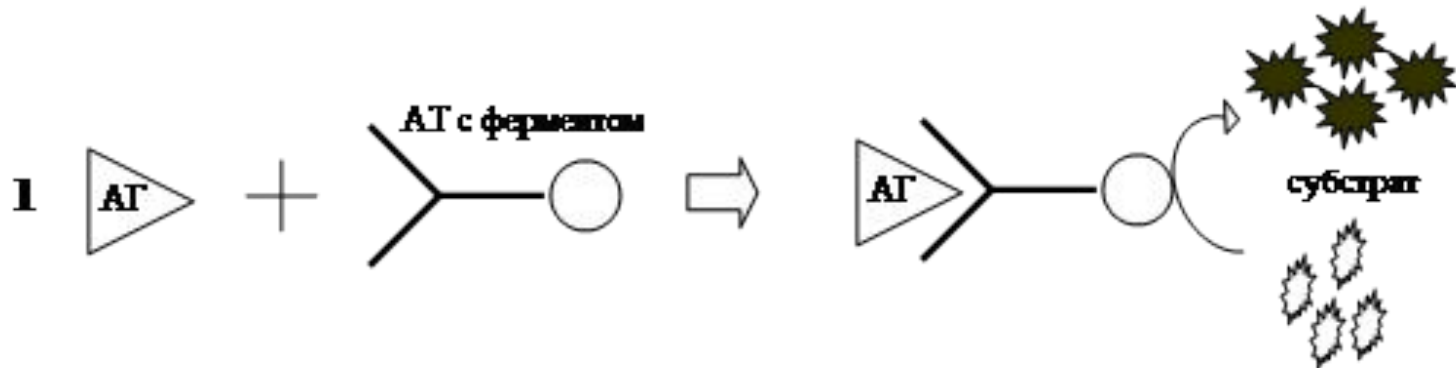
Презентация на тему:
**Иммуноферментный
анализ**

Иммуноферментный анализ

(сокращённо **ИФА**, англ. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. В настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.

- ИФА появился в середине 60-х годов и первоначально был разработан как метод для идентификации 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 участия Е. Энгвалл и Р. Пэлман, а также независимо от них В. Ван Вееман и Р. Шурс.

Основной принцип ИФА.

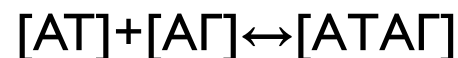


1) Для выявления антигенов.

2) Для выявления антител.

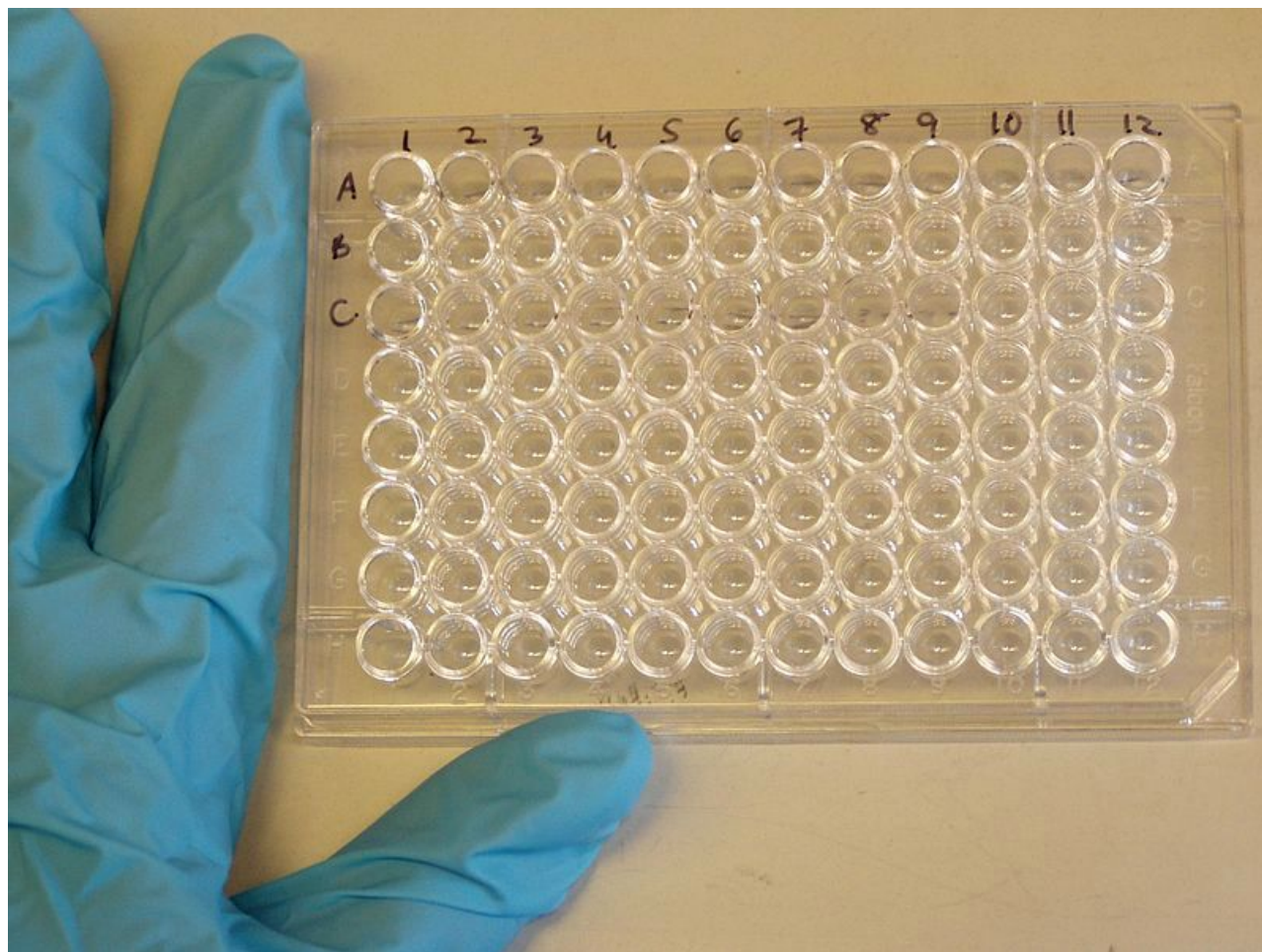
- 
- Метод основан на специфическом связывании антитела с антигеном, при этом один из компонентов коңюгирован с ферментом, в результате реакции с соответствующим хромогенным субстратом образовывается окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически
 - Открытие возможности 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.

96 ячеечный микропланшет,
используемый для постановки ИФА.



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.

Сущность и классификация

Из-за разнообразия объектов исследования — от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, и многообразия условий проведения ИФА существует большое количество вариантов этого метода.

Возможна *классификация по типу иммунохимического взаимодействия* на первой стадии анализа (в которой происходит связывание определяемого вещества):

- Если в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), то метод является *неконкурентным*.
- Если же на первой стадии в системе одновременно присутствует анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за ограниченное количество центров специфического связывания, то метод является *конкурентным*.



Примером неконкурентного формата ИФА является «сэндвич»-метод. К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации на первой стадии на твердой фазе образуется комплекс антиген-антитело. Затем носитель отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют меченные ферментом специфические антитела. После вторичной инкубации и удаления избытка конъюгата антител с ферментом определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена. На стадии выявления специфического иммунокомплекса антиген оказывается как бы зажатым между молекулами иммобилизованных и меченных антител, что послужило поводом для широкого распространения названия «сэндвич»-метод.

Ферментативная реакция (цветная реакция) проходит в присутствии перекиси водорода и субстрата, представленного неокрашенным соединением, которое в процессе пероксидазной реакции окисляется до окрашенного продукта реакции на заключительном этапе проведения исследования. Интенсивность окрашивания зависит от количества выявленных специфических антител.

Результат оценивается спектрофотометрически или визуально.

«Сэндвич»-метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, две антигенные детерминанты. На этом формате основано большое количество тест-систем для иммуноферментной диагностики различных инфекций: ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, цитомегаловирусная, герпесная, токсоплазменная и другие инфекции.

Среди конкурентных схем твердофазного ИФА существует два основных формата:

- *Прямой конкурентный* формат ИФА использует иммобилизованные на твердой фазе специфические антитела, а меченый ферментом и немеченый антиген конкурируют за связь с иммобилизованным антителом.

К иммобилизованным антителам добавляют раствор, содержащий определяемое вещество и фиксированную концентрацию меченого антигена, инкубируют и после отмывки носителя от несвязавшихся компонентов регистрируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов. Величина детектируемого сигнала находится в обратной зависимости от концентрации антигена.

Преимуществом прямой схемы является небольшое число стадий, что позволяет легко автоматизировать анализ. К недостаткам схемы относятся сложность методов синтеза ферментных конъюгатов, а также возможное влияние компонентов образца на активность фермента.

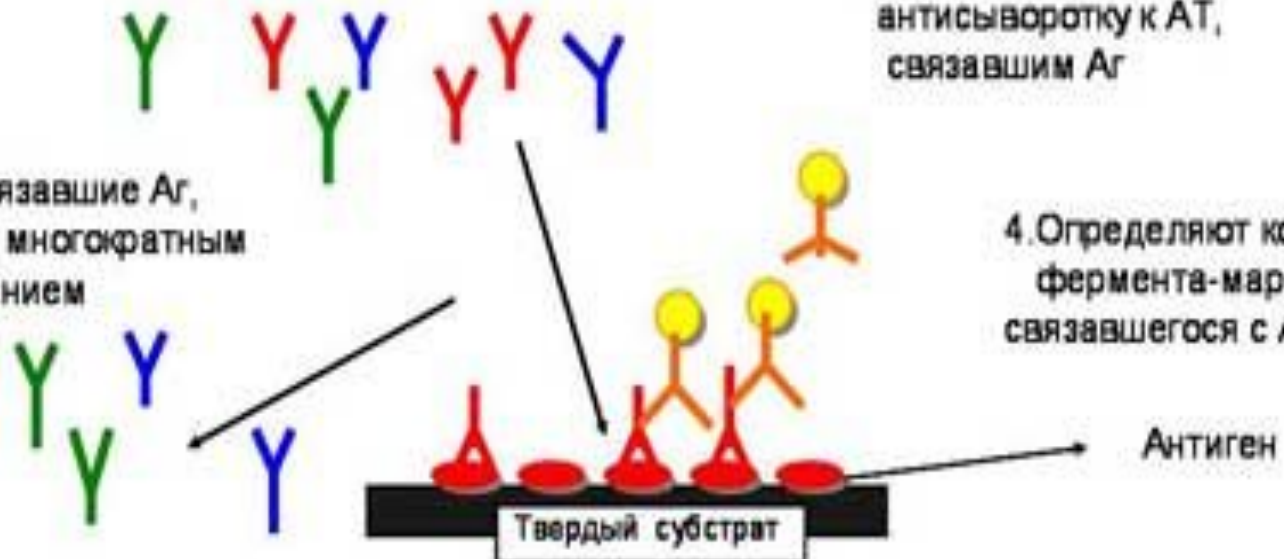
Прямой твердофазный ИФА (схема)

1. Сыворотку инкубируют с Аг, фиксированным на твердом субстрате (пластиковая микропланшетка)

2. АТ, не связавшие Аг, удаляют многократным промыванием

3. Вносят меченную ферментом антисыворотку к АТ, связавшим Аг

4. Определяют количество фермента-маркера, связавшегося с АТ



- В *непрямом конкурентном* формате ИФА используются меченные ферментом антитела (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель. Непрямая схема с использованием меченых антивидовых антител является одной из наиболее распространенных схем ИФА. На поверхности носителя иммобилизуют конъюгат антиген-белок, к которому добавляют раствор, содержащий определяемый антиген и фиксированную концентрацию немеченых специфических антител, инкубируют и после удаления несвязавшихся компонентов добавляют фиксированную концентрацию меченых антивидовых антител. После инкубации и отмывки носителя детектируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов, причем величина сигнала находится в обратно-пропорциональной зависимости от концентрации определяемого антигена.

Применение универсального реагента — меченых антивидовых антител — даёт возможность выявлять антитела к разным антигенам. Кроме того, анализируемый образец и меченый реагент вводятся в систему на разных стадиях, что устраняет влияние различных эффекторов, содержащихся в образце, на каталитические свойства ферментной метки. Однако такая схема анализа усложняет его проведение из-за введения дополнительных стадий.

Непрямой метод

АТ-положительная сыворотка



АТ-отрицательная сыворотка



- ❖ 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 коңюгатов 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* методов 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 I стадия – образование специфических комплексов происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу с иммобилизированным реагентом.



Как любые иммунохимические методы анализа, ИФА может давать **ложноположительные** и **ложноотрицательные** результаты.

Например, ложноположительные результаты при определении антител к различным инфекциям могут возникнуть за счёт ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека; за счёт антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приёме лекарственных препаратов; у новорождённых такие ложноположительные реакции могут возникать за счёт образования в организме ребёнка М-антител к иммуноглобулину G матери. Помимо этого, причиной ложноположительных результатов может быть синдром поликлональной активации. При этом, особые вещества — суперантигены — неспецифически стимулируют выработку В-лимфоцитами антител к различным инфекциям. Практически это выражается в неспецифическом нарастании титра антител сразу ко многим возбудителям. *Ложноотрицательные результаты* при определении антител могут быть обусловлены состояниями иммунодефицита, а также техническими ошибками при постановке реакции.

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 тиразина 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 β -D-галактозидаза (табл. I). 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.

Ферменты и их субстраты наиболее широко используемые в ИФА.

Фермент	Источник получения	М.М. (кДа)	Субстрат (рекомендуемая длина волны при фотометрии, нм)	Конъюгирующий реагент
Пероксидаза хрена	Хрен (<i>Armoracia rusticana</i>)	40	О-фенилендиаминдигидро-хлорид (ОФД, 492 нм) 5-аминосалициловая кислота (450 нм), диаминобензидин, о-дианизидин.	Глутаральдегид Мета-периодат натрия N-сукцинимидил-3 (2-пиридилдитио) пропионат
β -D-галактозидаза	E. Coli	540	О-нитрофенил- β -D-галактозид (420 нм)	Мета-малеимидобензол-N-гидроксисукцинимидный эфир
Щелочная фосфатаза	E. Coli, слизистая кишечника теленка	84-150	P-нитрофенилфосфат (405 нм), 5-Бром-4-хлоро-3-	Глутаральдегид

преимущества иммуноферментного анализа

- высокая чувствительность, позволяющая выявлять концентрации до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата;
- возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала;
- стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более);
- простота проведения реакции;
- наличие как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;
- возможность автоматизации всех этапов реакции
- относительно низкая стоимость диагностических наборов.

Основные типы тест-систем в зависимости от используемых антигенов

В зависимости от того, какие антигены используются, иммуноферментные тест-системы подразделяются на:

- *Лизатные* — в которых используется смесь нативных антигенов (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре);
- *Рекомбинантные* — в которых используются полученные генно-инженерным способом белки-аналоги определённых белковых антигенов возбудителя;
- *Пептидные* — использующие химически синтезированные фрагменты белков.

Общее направление развития ИФА-диагностикумов — это направление от лизатных тест-систем, которые принято называть тест-системами первого поколения, к рекомбинантным и пептидным. Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в достаточно чистом виде аналог практически любого отдельного антигена. Для создания высококачественной рекомбинантной тест-системы необходимо из всего антигенного многообразия возбудителя выбрать антигены, которые были бы иммуногенными (то есть, в организме инфицированного человека должны вырабатываться антитела к этим антигенам) и высоко специфичными (то есть, характерными лишь для данного возбудителя и, по возможности, не дающими перекрёстных реакций с антителами к другим антигенам). Кроме того, большое значение имеет качество очистки рекомбинантных белков. В идеальном случае возможно получение рекомбинантной тест-системы практически со 100%-ной специфичностью при высокой чувствительности. На практике этого не всегда удаётся достичь, однако специфичность лучших рекомбинантных тест-систем приближается к 100 %.

История развития иммуно-химических методов анализа

- 60-е: **радиоизотопные методы** (высокая чувствительность и специфичность);
- 70-е: **иммуноферментные методы** (улучшенная стабильность реагентов, возможность автоматизации);
- 80-е: **иммунохемилюминесцентные методы** (сокращенное время инкубации, увеличенная чувствительность);
- 90-е: **электрохемилюминесцентные методы.**



Иммунохимические методы

При взаимодействии антигена и специфического иммуноглобулина (АГ) образуется высокомолекулярный комплекс . Можно определять АГ с помощью специфических АГ, можно определять АГ с помощью специфических АТ.



- **1) Методы преципитации в геле (иммунодиффузия).**
- **2) Методы лигандного анализа.**
- **3) Иммунотурбидиметрия.**



Гомогенный и гетерогенный методы

Гетерогенный анализ отличается от гомогенного тем, что в реакционной смеси имеются две фазы- твердая(осадок, суспензия) и жидкая, что позволяет отделить комплекс от исходных компонентов.

Самый распространенный вариант гетерогенного анализа- это твердофазный, когда с самого начала один из компонентов реакции фиксирован на твёрдом носителе. Широко распространен вариант ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).



Определение индивидуальных белков на основе реакции взаимодействия антиген-антитело.

При взаимодействии АГ с АТ образуется иммунный комплекс, который может выпадать в виде преципитата. Реакция преципитации была использована в методе радиальной иммунодиффузии, предложена в 1964-65 гг.. Манчини Карбонара и Херемансом.

Метод радиальной иммунодиффузии

не требует специального оборудования, но он довольно длительный, не поддается автоматизации, несет определённую долю субъективизма.



Реакция между АГ и АТ в жидкой фазе.

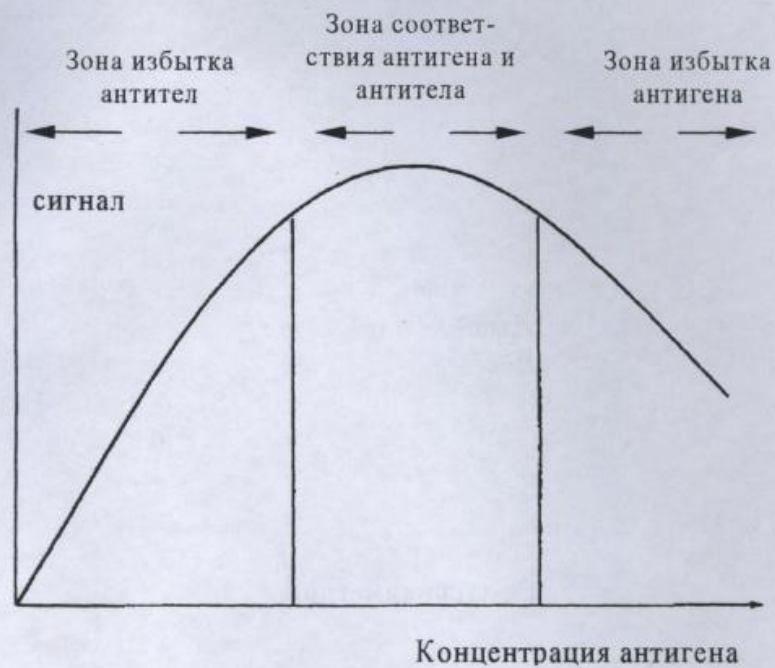
Метод турбидиметрии и нефелометрии.

Реакция АГ-АТ проявляется в растворе в виде образования агрегатов.



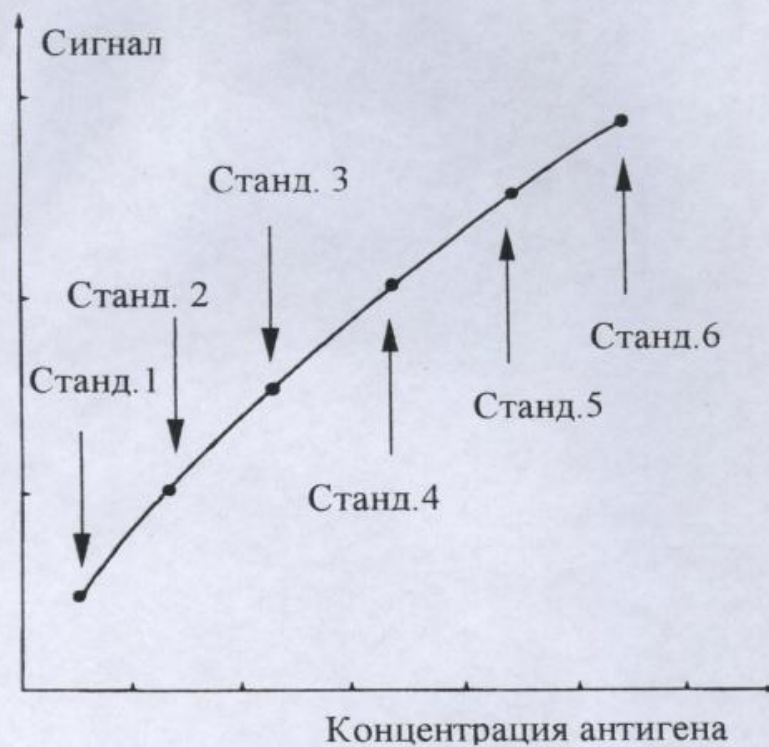
Схематическая диаграмма формирования преципитата при взаимодействии антиген-антитело.





Кривая доза-эффект при образовании комплексов антиген-антитело в иммунохимической реакции (кривая Хайделбергера-Кендала)





Стандартная кривая.

Характерна для определения индивидуальных белков турбидиметрическим и нефелометрическим методами. Для построения кривой требуется по крайней мере 5 стандартных растворов антигена.



Лигандный анализ.

- специфическое связывание с лигандами как аналитический метод начинается с работы Ялоу и Берсон, предложивших в 1960 году метод радиоиммунологического определения (РИА) инсулина. Эта работа была удостоена Нобелевской премии.



● **В лигандном анализе выделяют три компонента:**

- 1) АНАЛИТ- определяемое вещество. Оно может содержаться в анализируемом материале, может быть добавлено в качестве калибратора и т.д..**
- 2) ЛИГАНД- вещество, избирательно связывающееся с аналитом.**
- 3) МЕТКА- легкоопределяемое соединение, добавляемое в аналитическую систему для измерения количества аналита.**



ЭТАПЫ:

- 1. Взаимодействие аналита с лигандом.**
- 2. Формирование меченного комплекса.**
- 3. Измерение сигнала (определение количества метки).**



ОСНОВНЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ:

- 1. Прямые- определяется количество комплекса аналит- лиганд. При увеличении концентрации аналита сигнал возрастает.
- 2. Непрямые- определяется количество оставшихся свободными валентностей лиганда.



Иммуноферментный анализ

Метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса антиген-антитело за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску.



Иммуноферментный анализ

Существует множество вариантов постановки ИФА, из которых наибольшее практическое значение получил гетерогенный твердофазный иммуноферментный анализ.

Использование твердой фазы позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции.



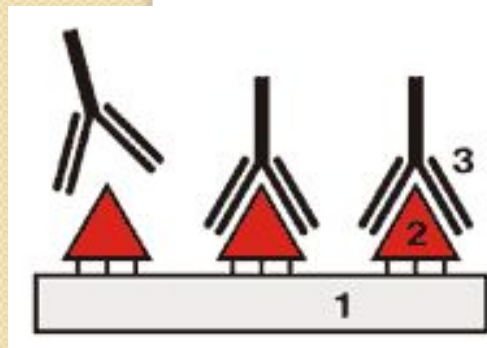
Иммуноферментный анализ

Для ферментативной метки конъюгата могут быть применены разнообразные ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, глюкозооксидаза и др. Во всех коммерческих тест-системах используется пероксидаза хрена, выбор которой определяется ее высокой удельной каталитической активностью, доступностью, стабильностью, простотой детекции.

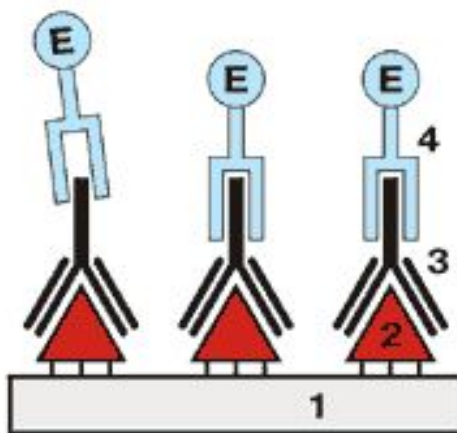


Иммуноферментный анализ

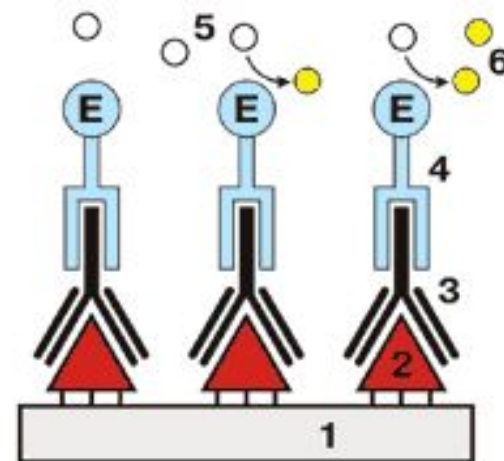
Этапы ИФА:



Взаимодействие
аналита с лигандом



Формирование
меченного комплекса

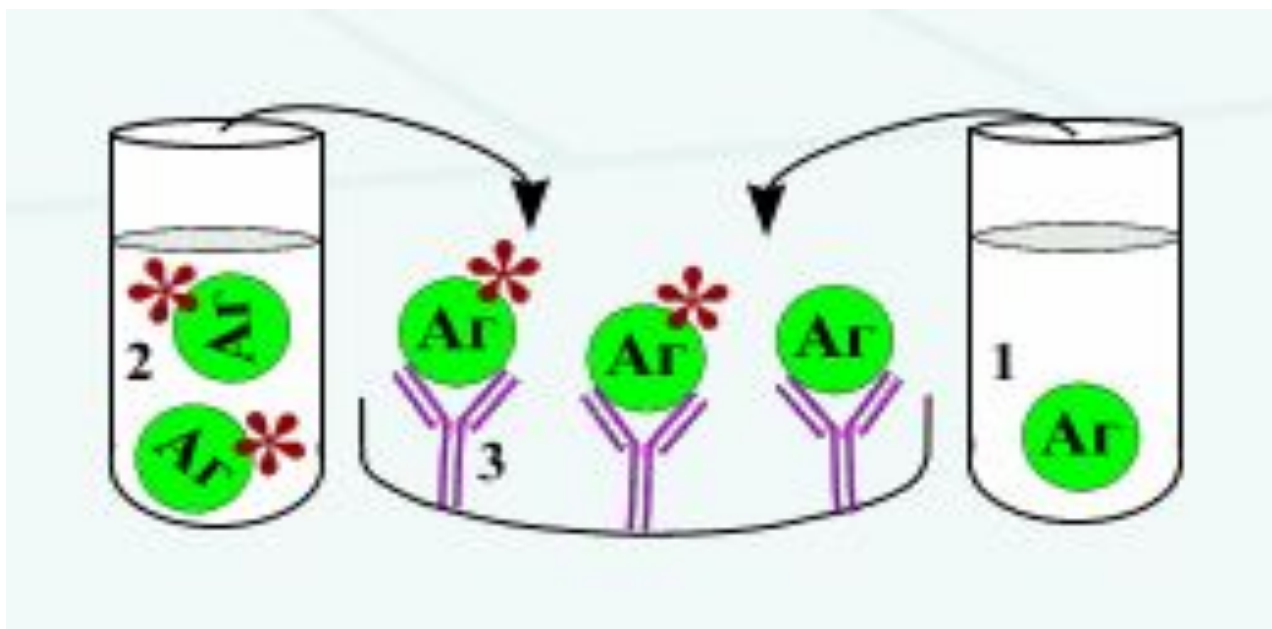


Измерение сигнала



Конкурентный ИФА для определения антигенов

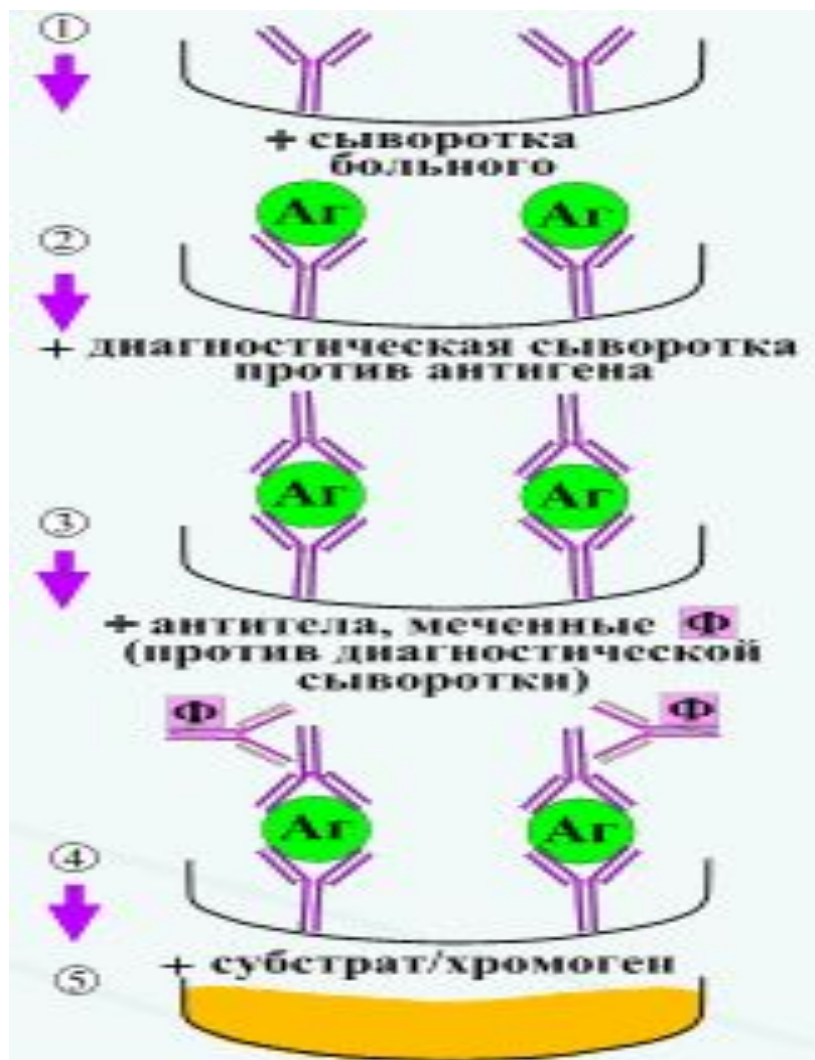
Искомый антиген(1) и меченый ферментом антиген(2) конкурируют друг с другом за антитела (3), сорбированные на твердой фазе.



- **Определение АТ в сыворотке больного (в лунках планшеток с сорбированным АГ (прямой ИФА))**



Определение АГ в сыворотке больного (в лунках планшеток с сорбированными АТ) прямой ИФА



Иммуноферментный анализ- это:

- **Чувствительность, позволяющая выявлять концентрации до 0,05нг/мл;**
- **Возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала;**
- **Стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более);**
- **Простота проведения реакции;**
- **Наличие как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;**
- **Возможность автоматизации всех этапов реакции;**
- **Относительно низкая стоимость диагностических наборов.**



Иммунохемилюминесцентный метод



Иммунохемилюминесцентный метод

- **Аналитическая чувствительность-
(ТТГ третьей генерации - 0,002 IU/ml.
ПСА третьей генерации - 0,003 ng/ml.);**
- **Производительность - до 120 тестов в час;**
- **Автоматическое разведение для некоторых тестов;**
- **Количество реагентов, одновременно находящихся на борту - 12;**
- **Время выполнения исследования - 42 (72) минуты в зависимости от вида теста.**



Иммунохемилюминесцентный метод

Смешивание и инкубация

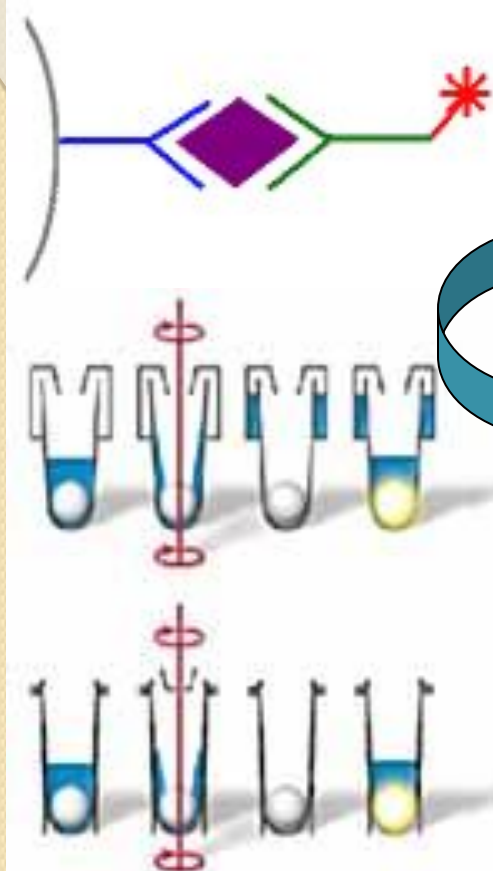
В состав входят пробирки со специальными шариками, покрытыми антителами или антигеном, которые используются в качестве твердой фазы реакции. Проба автоматически вносится в пробирку, содержащую шарик. Добавляется конъюгат, меченный ферментом щелочной фосфатазой.

Промывка

Для удаления неспецифических компонентов реакции используется уникальная система автоматической промывки.

Детекция

Добавление хемилюминесцентного субстрата, который взаимодействуя с щелочной фосфатазой выделяет кванты света.



Электрохемилюминесцентный метод



Электрохемилюминесцентный метод

Метод основан на детекции эмиссии света, возникшей под воздействием электрического поля.

Метка - рутениевый комплекс, чрезвычайно стабильная водорастворимая соль.

Рутениевый комплекс способен излучать свет на поверхности электрода при подаче на него напряжения (свечение достигает максимума за доли секунды).



Электрохемилюминесцентный метод

- **1-я инкубация.** Проба + биотинилированное МА + второе МА, помеченное рутениевым комплексом реагируют с образованием "сэндвич"-комплекса.
- **2-я инкубация.** Добавление микрочастиц, покрытых стрептавидином, связывание комплекса на твердой фазе за счет взаимодействия между биотином и стрептавидином.
- **Реакционная смесь подается в измерительную кювету, где микрочастицы притягиваются магнитом на поверхность электрода. Несвязанные вещества затем удаляются с помощью буфера. После этого подача напряжения на электрод индуцирует хемилюминесцентное излучение, которое измеряется фотоумножителем.**

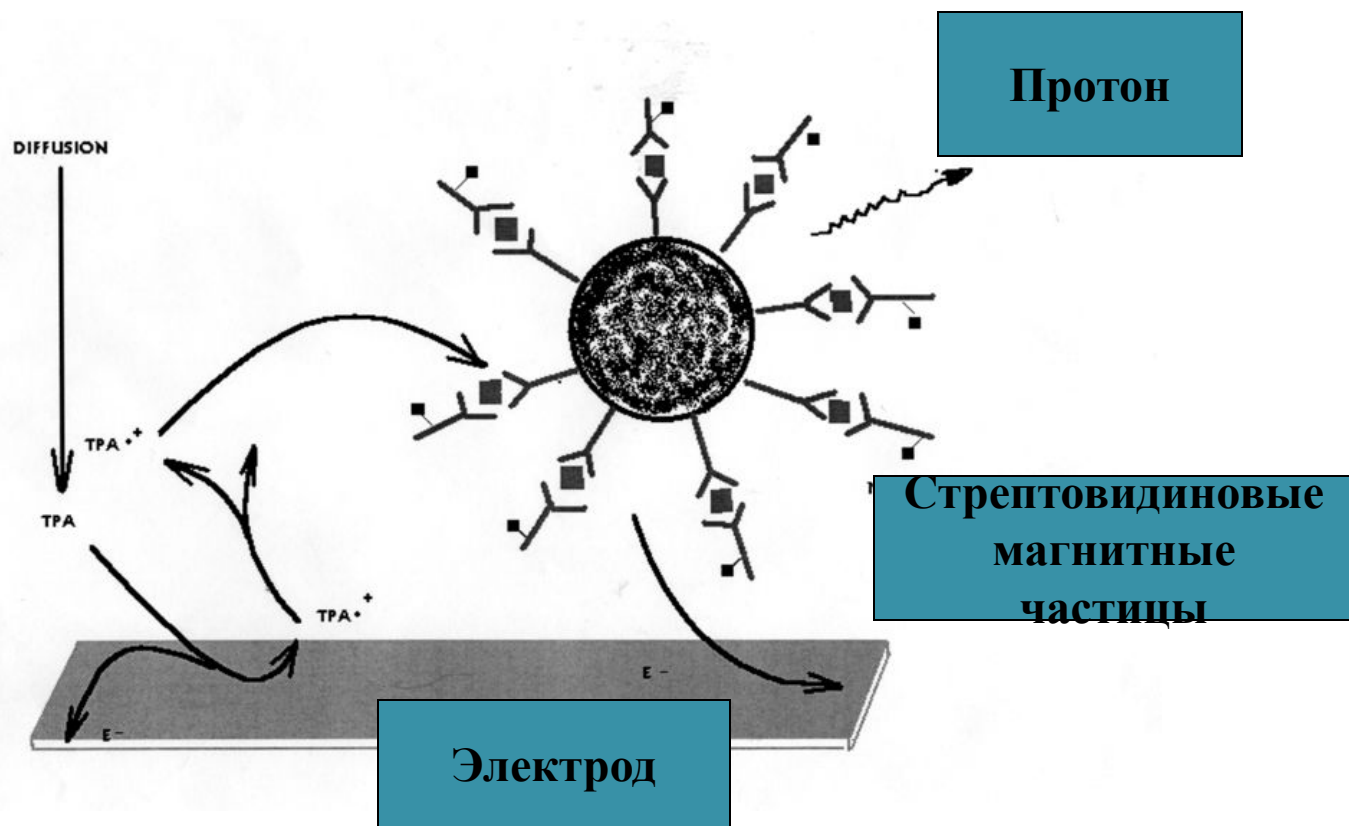


Электрохемилюминесцентный метод

- **Высокая стабильность рутениевой метки (ферменты не используются, что значительно повышает стабильность реакции);**
- **Быстрота и надежность возникновения светового сигнала;**
- **Высокая -аналитическая чувствительность;**
- **В качестве твердой фазы используются мельчайшие (2,8 мкм), покрытые стептовидином магнитные частицы. Частицы находятся в виде суспензии, обеспечивая большую поверхность для иммобилизации иммунных комплексов, что значительно ускоряет реакцию.**



Электрохемилюминесцентный метод



Электрохемилюминесцентный метод

- **Короткое время инкубации. (9-18 минут).**
- **Аналитическая чувствительность-
(ТТГ - 0,005 IU/ml., ПСА - 0,005 ng/ml.);**
- **Широкий диапазон измерения;**
- **Производительность прибора до 90
анализов в час;**
- **Возможность параллельного тестирования
- до 15 тестов одновременно;**
- **Автоматическое разведение.**



Сопоставление методов применительно к гормональным исследованиям

Метод детекции	Чувствительность (моль/л)	Преимущества метода	Недостатки метода
Турбидиметрия, Нефелометрия (ИДЦ)	~ 10 ⁻⁶	Возможность проведения анализа в б/х пробе	Узкий спектр показателей
ИФА плащечная технология (ИДЦ)	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁶	«Открытость» системы	Концентрация ряда гормонов ниже чувствительности системы
ИФА пробирочная технология (ИДЦ)	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁶	Возможность быстрого получения результата (1 анализ)	Ограничен спектр, закрытая система
Флюоресценция (ИДЦ)	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁸	Возможность быстрого получения результата (1 анализ)	Эффект гашения флюоресценции, закрытые технологии
Флюоресценция с генерацией сигнала (ИДЦ)	10 ⁻¹⁶ - 10 ⁻⁹	Позволяет проводить измерения в широком диапазоне концентраций	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей
Люминесценция (ИДЦ)	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁸	Позволяет проводить измерения в широком диапазоне концентраций	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей
Люминесценция с генерацией света (ИДЦ)	10 ⁻¹⁶ - 10 ⁻¹⁰	Измерения в широком диапазоне концентраций, включая минимальные	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей



Группы методов лабораторной диагностики

- **Прямые**
выявляют инфекционный агент
- **Непрямые (косвенные)**
выявляют ответ организма на
инфекционный агент



Непрямые методы

■ Все серологические реакции – РСК, РТГА, РПГА, ИФА и т.д.

■ Несомненные плюсы

- ответ появится независимо от места локализации процесса
- дают представления об ответе организма на ПБА
- можно определить стадию заболевания

■ Минусы

- подходят только для инфекционных заболеваний
- наличие «серологического окна»
- малая информативность в случае иммунодефицита
- целый ряд инфекций встречается и у здоровых пациентов



Прямые методы

- **Микроскопия**
- **ИФА на антигены**
- **ПЦР**
- **Культуральный метод**

Особенности прямых методов

- Врач должен знать стадии течения и представлять, где в какую стадию инфекционный агент может быть.
- Важно грамотное взятие материала.
- Надо помнить, что понятия «ИНФИЦИРОВАННОСТЬ» и «ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС» - не тождественны.
- Отрицательный результат при некорректном методическом подходе не исключает факта заболевания.



Выбор среди прямых методов лаб.диагностики

Световая микроскопия

Ряд микроорганизмов
не визуализируется;
Схожесть морфотипов;
Субъективность
оценки;
Высокая скорость
проведения анализа.

Бак.посев

Трудности
транспортировки и
хранения материала до
исследования;
Ряд микроорганизмов
трудно или
невозможно
культивировать;
В процессе роста
теряется соотношение;
Есть чувствительность
к а/б;
Низкая скорость.

ПЦР

Скрининг – ДА или
НЕТ;
Количественная
оценка;
Динамические
наблюдения;
Нет чувствительности
к а/б;
Высокая скорость.

ИФА

Доступность для
лаборатории;
Быстрота получения
результата;
Качественная или
количественная оценка;
Динамическое наблюдение
при количественном
определении.



Тем не менее:

- Ни один метод не является абсолютным, исключаящим все остальные**
- Лучше всего комбинировать прямые методы с косвенными**
- Результаты лаборатории врач должен сопоставлять с клинической картиной**



Хроматографические методы исследования

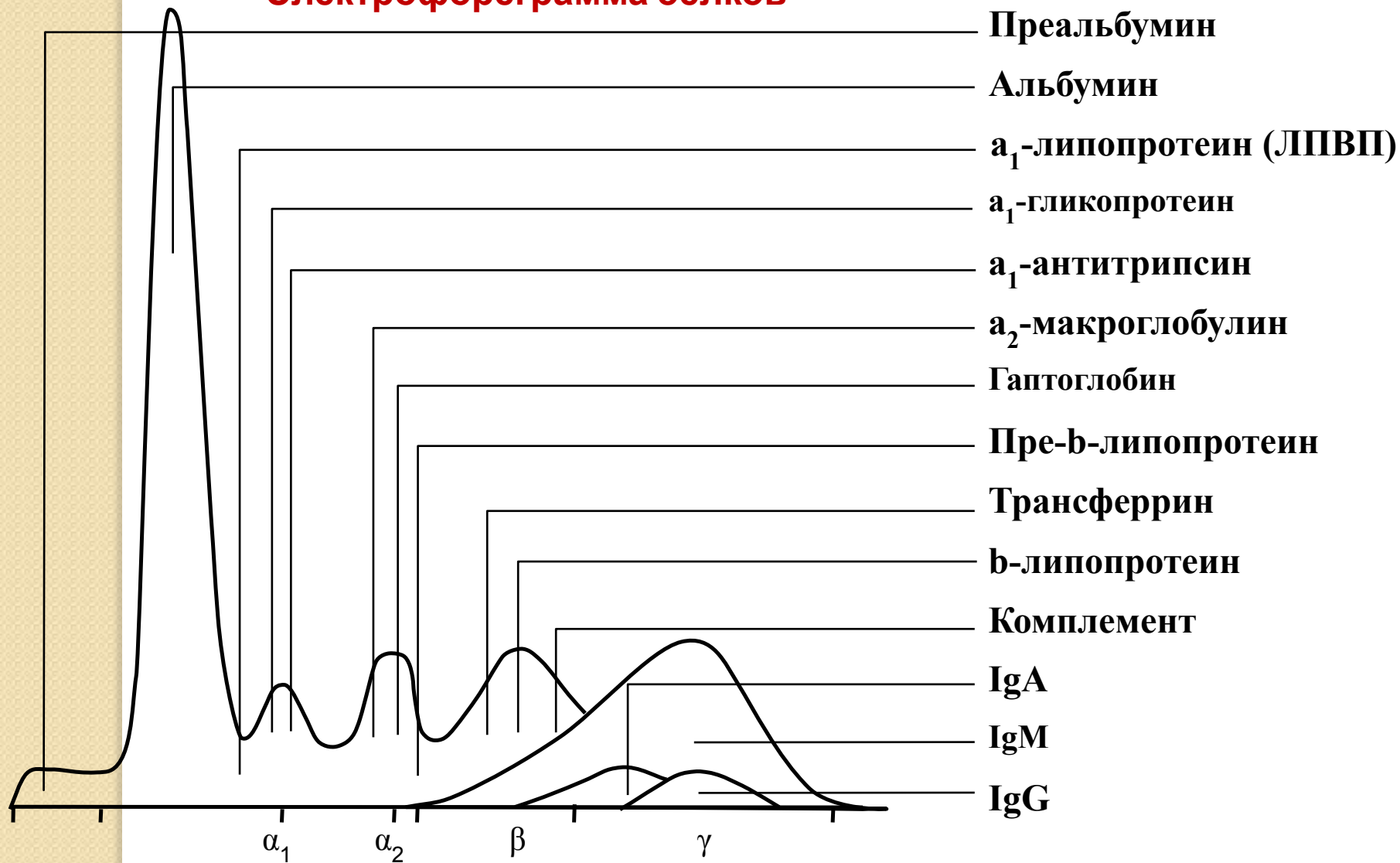
- Аффинная ЖХВД; Тонкослойная хроматография
Техника ТСХ. Приготовление пластинок.
Нанесение препаратов. «Проявление» пластинок,
обнаружение пятен или полос (денситометрия).
- Метод трудоемкий, токсичный.



Paragon-Appraise



Электрофореграмма белков





Система капиллярного электрофореза CAPILLARYS 2 (SEBIA)»

Инновационная технология разделения и анализа белковых фракций сыворотки крови, мочи

Производитель: SEBIA
ELECTROPHORESIS (Франция)



Система капиллярного электрофореза V8 – восьмиканальная автоматизированная система капиллярного электрофореза для разделения и анализа белков, цельной крови, сыворотки и мочи.
Производитель: HELENA BIOSCIENCES (Великобритания)

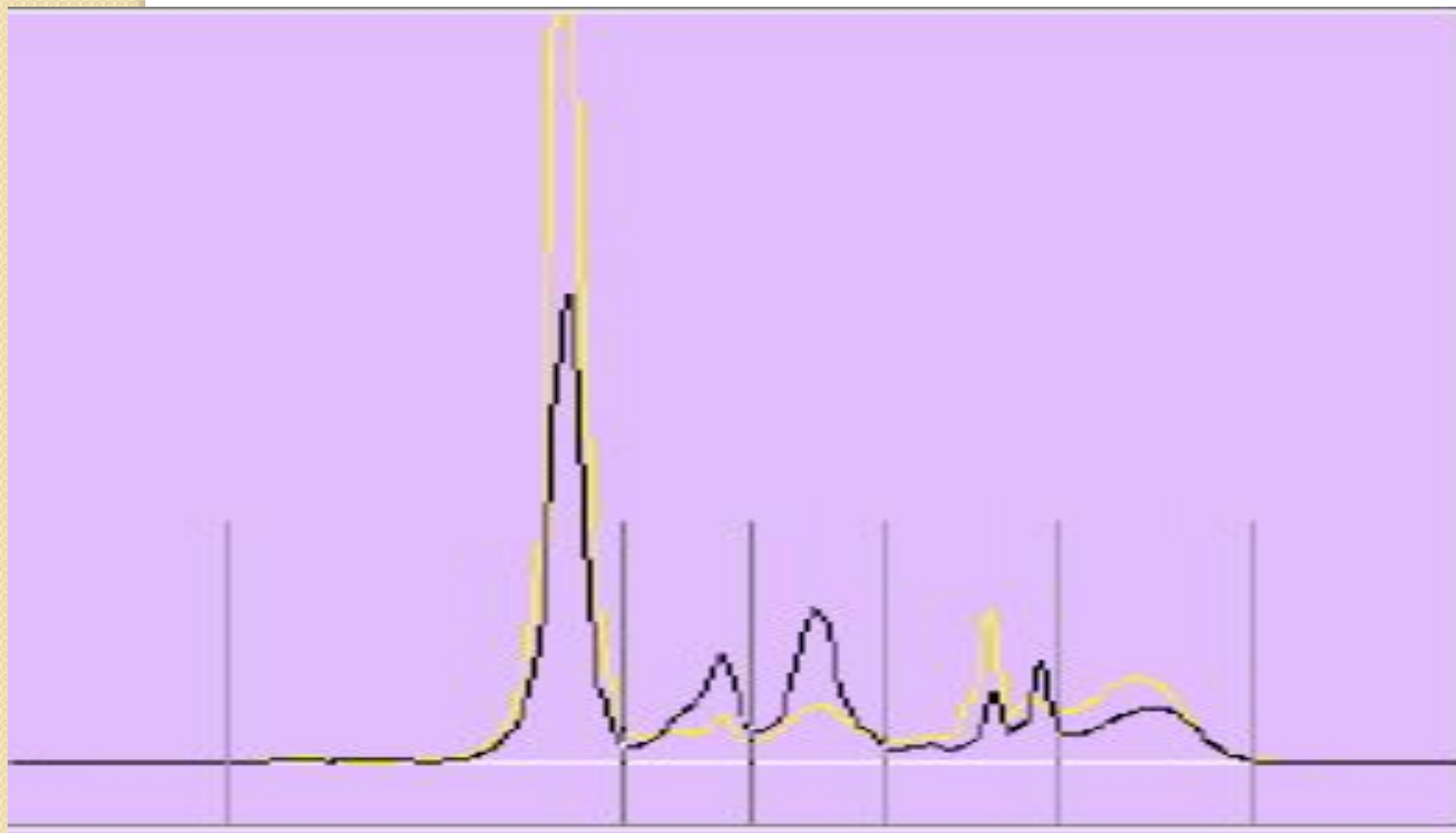


Система клинического капиллярного электрофореза PARAGON CZE® 2000 для разделения и анализа белковых фракций сыворотки крови, мочи и спинномозговой жидкости
Производитель: "Beckman-Coulter", (США)

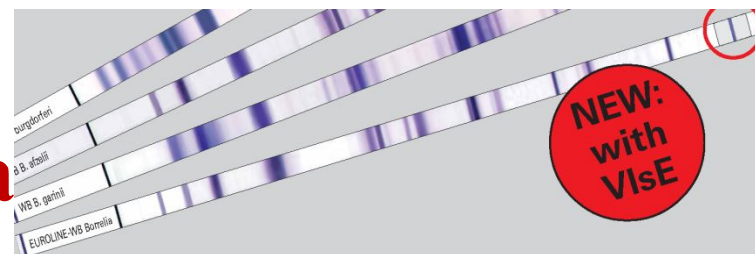
ИДЦ



Функция накладывания контрольной кривой



Экспресс-диагностика



- Иммуноблотинг;
- Диагностические наборы для клинической химии;
- Латекс-тесты для качественного и полуколичественного анализа;
- Иммунохроматографические тесты на картриджах и тест-полосках;
- Полоски для анализа мочи.



Преимущества экспресс-методов

- **Анализ без доставки в КДЛ;**
- **Получения результатов через 2-20 мин.;**
- **Отсутствие дорогостоящих приборов при качественном и полуколичественном анализе;**
- **Использование простых приборов-ридеров для количественных исследований;**

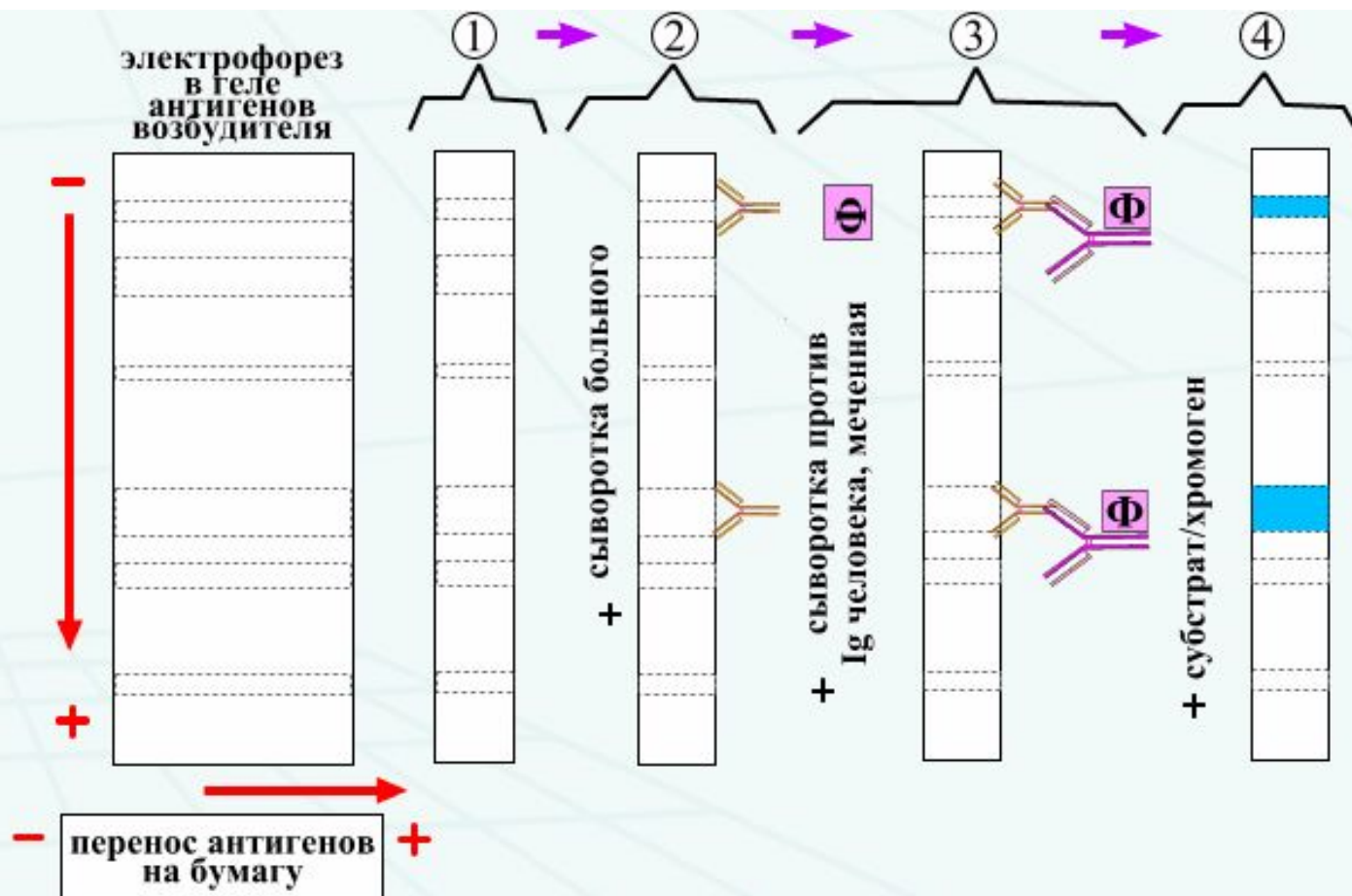


Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг (син. вестернблоттинг) - высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА.

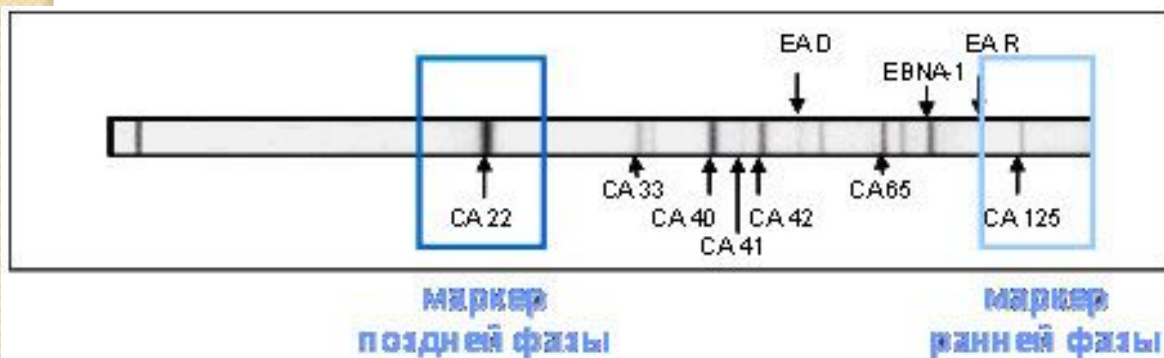
Метод выявления антител к отдельным антигенам возбудителя основан на постановке ИФА на нитроцеллюлозных мембранах, на которые в виде отдельных полос нанесены специфические белки, разделенные гель-электрофорезом. Если имеются антитела против определенных антигенов - появляется темная линия в соответствующем локусе стрипа.

Иммуноблоттинг



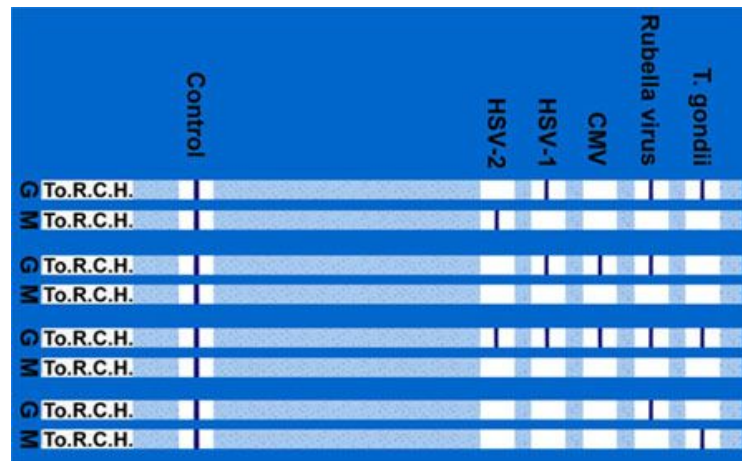
Иммуноблоттинг: виды наборов

Вестерн-блот: Наборы содержат тестовые стрипы-мембраны с электрофоретически разделенными нативными антигенами соответствующих инфекционных агентов, т.о. антигены располагаются в порядке молекулярной массы



Иммуноблоттинг: виды наборов

Лайн-блот: на тестовые стрип-мембраны нанесены только клинически значимые антигены (нативные, синтетические или рекомбинантные) в определенном порядке. Такой подход используется при дифференциальной диагностике нескольких инфекций на одном стрипе



Иммуноблоттинг: виды наборов

Southern Blot - разделение ДНК

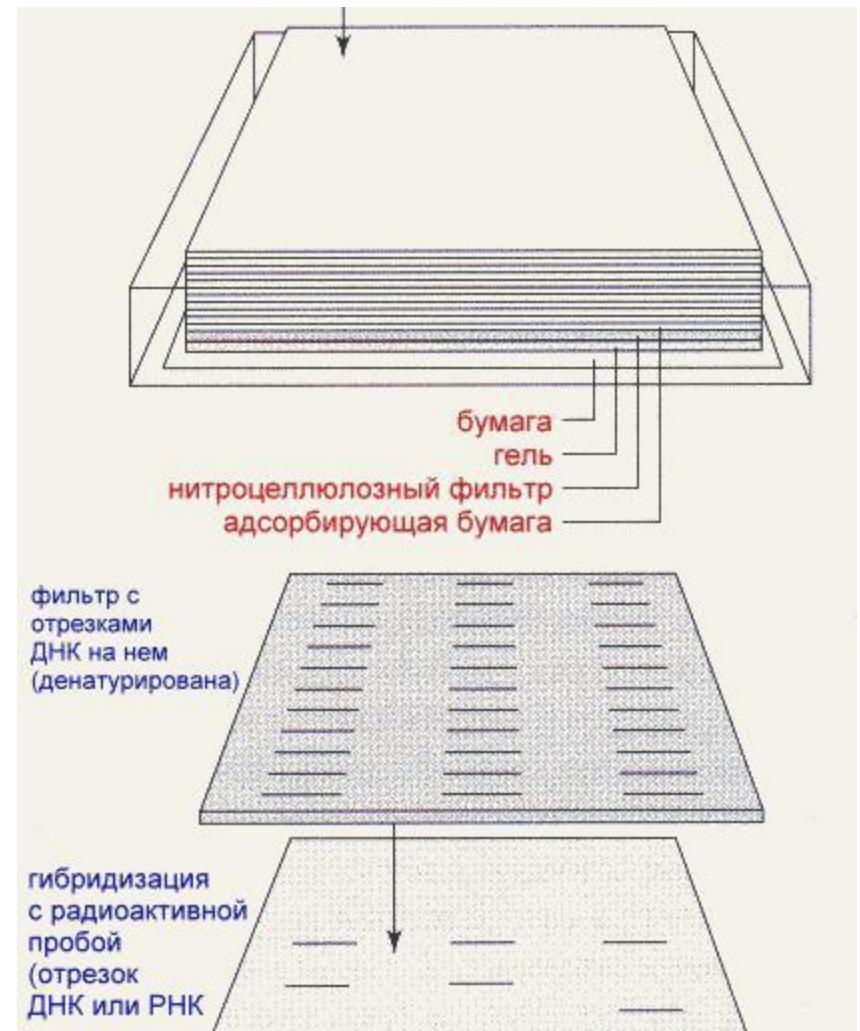
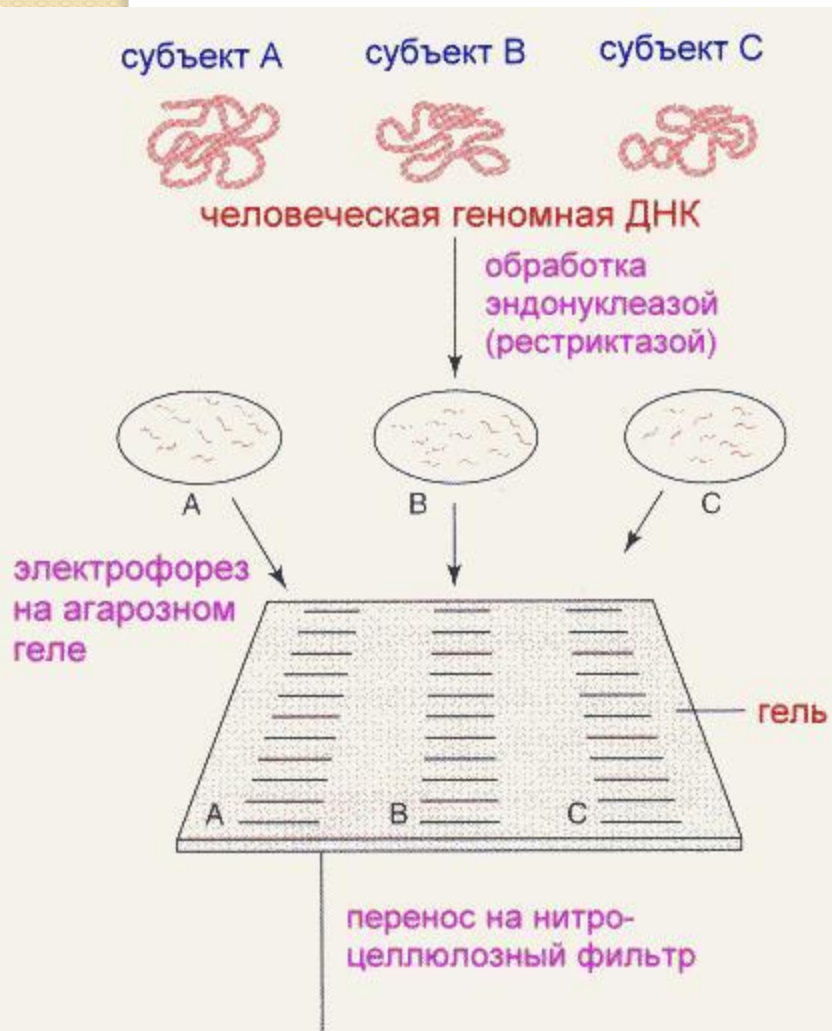
Northern Blot - разделение РНК

Western Blot - разделение белков

SOUTHERN BLOT - Процедура была разработана Е. М. Southern и в основе ее лежит перенос отрезков ДНК с поверхности геля ПААГ после разделения электрофорезом на нитроцеллюлозный фильтр под воздействием потока солевого элюента, вызываемого его впитыванием в слои фильтровальной бумаги.



SOUTHERN, WESTERN, NORTHERN BLOTS



SOUTHERN, WESTERN, NORTHERN BLOTS

На практике это используется для сравнения геномов отдельных лиц с целью выявления патологических изменений в последовательности нуклеотидов или установлении родственных отношений. Патологическая замена ряда нуклеотидов в зоне рестрикции приводит к ее исчезновению и смещению полосы относительно полос пациентов в норме.



Бесприборные тест-системы ИФА



IMMUNOCOMB ORGENICS

Оригинальная модификация твёрдофазного иммуноферментного анализа на гребенках, реализованная в наборах Иммунокомб, не требует использования дополнительного оборудования и растворов (набор полностью укомплектован и готов к использованию).

В качестве исследуемого материала применяется сыворотка или плазма крови, в исключительных случаях - цельная кровь.

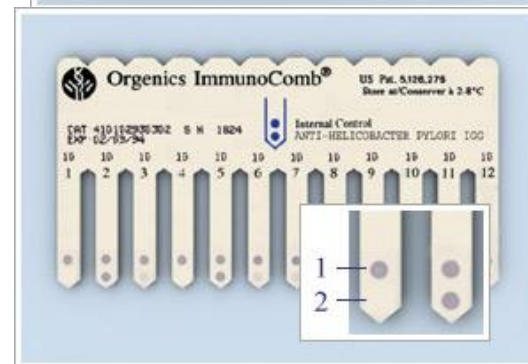
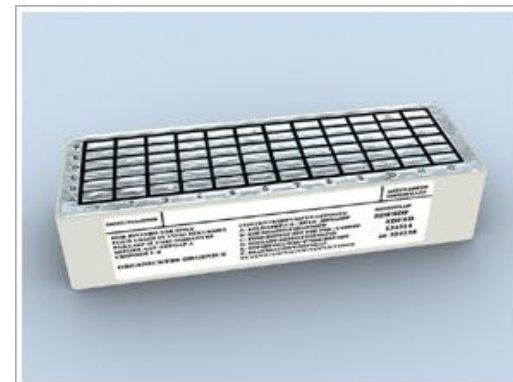
**Один набор Иммунокомб рассчитан на 36 определений.
Результаты можно получить через 40**



IMMUNOCOMB ORGENICS

**Зубцы пластикового гребня
сенсibilизированы
соответствующими
антигенами или антителами.
Ячейки ванночек заполнены
готовыми растворами
конъюгата, промывочными
буферами и красителем**

**Учёт результатов – визуальный
(с помощью CombScale)
или полностью
автоматизированный на
приборе CombScan.**



IMMUNOCOMB ORGENICS



При необходимости гребешок можно согнуть и отломить зубцы для индивидуального тестирования

3

Введите гребешок в ряд В, инкубируйте.



ВСЛЕД ЗА ИНКУБАЦИЕЙ В РЯДАХ С, Д И Е:



1

Внесите образцы и контроли в ряд А

4

Цветная реакция в ряду F



2

Вставьте гребешок в ряд А, инкубируйте.

5

Считывание результатов. Гребешок можно хранить длительное время вместе с историей болезни в качестве документального подтверждения результатов теста.



Латекс-тесты

- **Скрининг-тесты для диагностики ревматоидных заболеваний;**
- **Для выявления инфекционных заболеваний (кандидоз, инфекционный мононуклеоз, токсоплазмоз, сифилис);**
- **Фертильность и бесплодие(ХГч, анти-овариальные АТ, антиспермальные АТ);**



Реакция агглютинации

Ревматоидный фактор «RF Direct Latex»

Изготовитель - VEDA.LAB – Франция

РФ латекс-реагент – является суспензией полистироловых частиц, сенсibilизирован-ных гамма-глобулином. При смешивании реагента с образцом сыворотки, содержащим ревматоидный фактор, происходит реакция агглютинации, которая легко регистрируется визуально. Наличие или отсутствие видимой агглютинации указывает на наличие или отсутствие РФ в тестируемом образце.

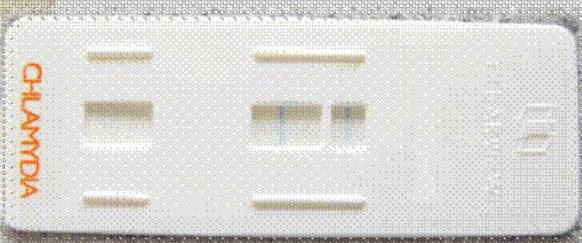


Иммунохроматографические тесты

- Диагностика гепатитов, половых инфекций, гриппа А и Б, инфекций ЖКТ, туберкулеза, малярии, прочих инфекций, в том числе и torch-инфекций.
- Скрининг врожденного гипотиреоза (неонатальный ТТГ), выявление гормональной дисфункции щитовидной железы (ТТГ), проблемы беременности (ХГч, ЛГ, ФСГ), диагностика патологии сосудов (миоглобин, Д-димер, сердечный тропонин и т.д.).
- Онкомаркеры (ПСА, АФП, скрытая кровь в фекалиях и т.д.).
- Наркотический контроль (Барбитураты, марихуана, Экстази, опиаты и т.д.)



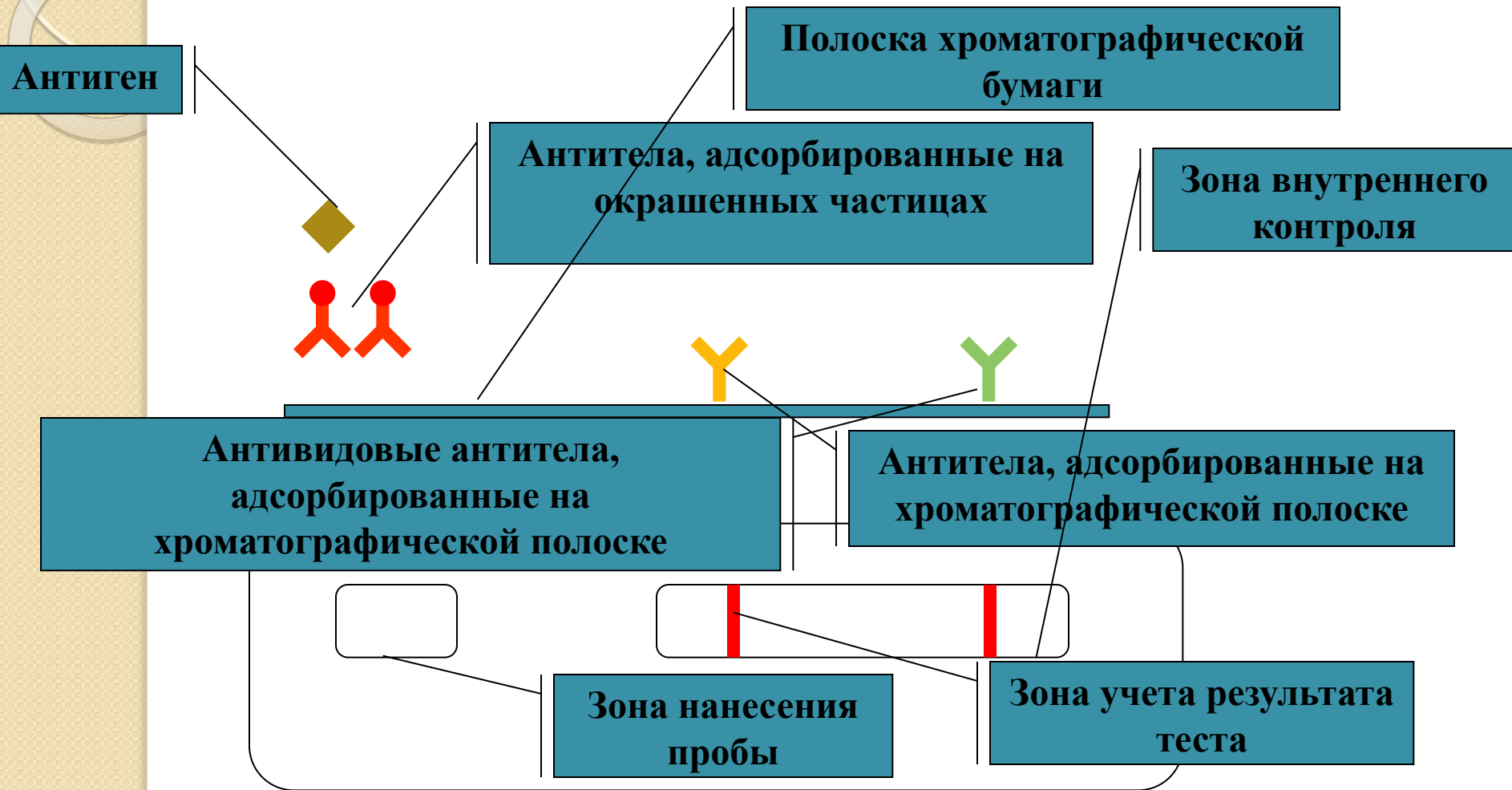
Иммунохроматография



В реакции используют антитела к искомому антигену, адсорбированные на микрочастицах (окрашенный латекс или частицы коллоидного золота), и антитела к тому же антигену, иммобилизованные в виде полосы на хроматографической бумаге. Кроме того, в этой реакции имеется внутренний контроль (антивидовые антитела, также закрепленные в виде полосы на хроматографической бумаге).



Принцип действия иммуно-хроматографического планшета





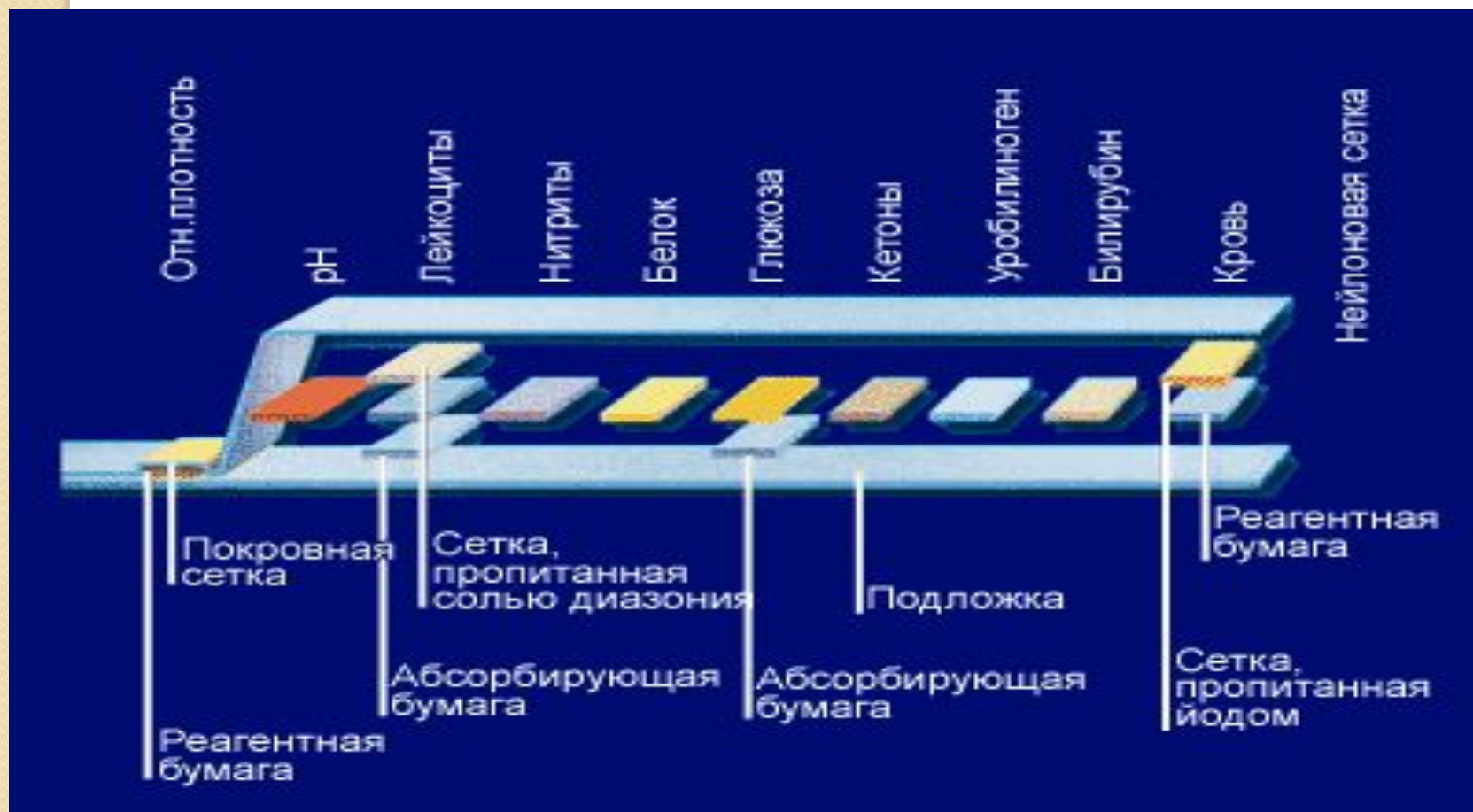
- 
- ТЕСТ-ПОЛОСКА

Тест-полоски для анализа мочи

Тестовые поля представляют собой бумагу, пропитанную стандартным количеством необходимых для реакции компонентов, которые предварительно были стабилизированы с помощью высушивания. Компоненты эти могут быть индикаторами, ферментами или другими добавочными реагентами. При взаимодействии с исследуемой биологической жидкостью реагенты растворяются и вступают в реакцию, которая проявляется окраской различной интенсивности и пропорциональна концентрации исследуемого параметра.



Принципиальная схема полоски для анализа мочи



Тестовое поле на гемоглобин в поперечном сечении



Литература

- ❖ Галактионов В.Г. Иммунология. Издательство Московского университета, 1998 г.
- ❖ Кишкун А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. Медицинское информационное агентство, 2009 г.
- ❖ Кондратьева И.А. Практикум по иммунологии. Учебное пособие для ВУЗов. Академия, 2004 г.
- ❖ Лефковитс И., Пернис Б. Иммунологические методы исследования. Мир, 1988 г.
- ❖ Ройт А., Бростофф Д., Мейл Д. Иммунология. Мир, 2000 г.