

Иммунологические методы диагностики микробных заболеваний



План

- Иммунологический метод диагностики (определение, история открытия, классификация, роль в диагностике патологических процессов).
- Дефинитные (дефинитивные) и референтные методы исследования.
- Прямые и косвенные методы исследования.
- Иммуноферментный анализ (ИФА).
- Радиоиммунный анализ (РИА).
- Иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА).
- Иммунохроматографический анализ (ИХА).
- Реакция иммунофлюоресценции (РИФ, РПИФ, РНИФ).
- Электрохемилюминесцентный анализ (ЭХЛА).

- **Иммунологические методы исследований – это диагностические лабораторные методы, основанные на специфическом взаимодействии антигенов и антител**

История иммуноанализа

- *Классические методы иммунохимического анализа* описаны в конце XIX века (Эрлих, Борде, Ландштейнера) и основаны на образовании антителами в присутствии антигена преципитата (осадка)

История иммуноанализа

- *радиоиммунологический анализ (РИА)*, предложен в конце 50-х годов Р. Йалоу и С. Берсон
- *иммуноферментный анализ* впервые в 1971 году Энгвал и Перлман (E. Engvall и R. Perlmann) для IgG фракции, Ван Веemen и Шурс (K Van Weemen и A. Schuurs) для эстрогенов (1971)

История иммуноанализа

- *гомогенный ИФА* В 1972 г. разработали Рубенштейн с сотр., - заключается в проведении анализа без использования твердой фазы

История иммуноанализа

- *флуоресцентный иммуноанализ (ФИА) с использованием флуоресцентных меток впервые провели Смит в 1981 г. и Хеммина в 1984 г.*

История иммуноанализа

- Кёлер и Мильштейн (1976 г.) –
получение моноклональных антител
Нобелевская премия в 1984 г.)

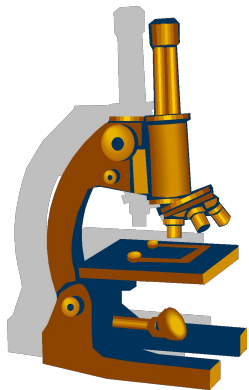
Зачем нужны лабораторные анализы

- Установка правильного диагноза
- Мониторинг эффективности лечения



Основные недостатки использования ручных технологий

- Наличие ошибок «человеческого фактора»
- Низкая производительность
- Снижение воспроизводимости результатов
- Невозможность стандартизации процесса
- Повышенный риск заражения персонала



Методы исследования по аналитическим качествам

- **Рутинные** методы используются в повседневной лабораторной практике
- **Референтные** методы обладают более высокой точностью, чем рутинные, используются для оценки свойств последних и их аттестации, для апробации материальных средств анализа
- **Окончательные (дефинитивные)** методы обладают наивысшими точностными характеристиками. Используются для оценки референтных методов и первичных референтных материалов

Прямые методы выявляют непосредственно возбудителей инфекций или материал, входящий в состав возбудителя, или им продуцируемый

К числу прямых методов относятся следующие:

- ***Прямые методы лабораторной диагностики***
- Микробиологические - Выделение чистой культуры возбудителя - 100% “золотой стандарт” лабораторной диагностики
- Цитологический (микроскопия) - Исследование окрашенных мазков
- Иммуноцитологический и серологический - Выявление антигенов после связывания с антителами РИФ, ИФА 70-90% 1 000-100 000 кл/ мл
- Молекулярно-биологический Определение специфического участка ДНК/ РНК в геноме возбудителя 99-100% приравнивается к “золотому стандарту”

Непрямые методы выявляют материал не самого возбудителя, а специфические антитела, выработанные человеком в ответ на инфекцию данного типа

К таким методам относятся:

- реакция связывания комплимента (РСК), реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ),
- реакция микроиммунофлуоресценции (МИФ),
- иммуноферментный анализ (ИФА)

Автоматизированные технологии



Цели внедрения автоматических анализаторов

- Повысить воспроизводимость исследований
- Обеспечить стандартизацию процесса исследований
- Повысить производительность работы вследствие:
 - Ускорения регистрации, обработки результатов, информационного обмена.
 - Эффективного использования рабочего времени квалифицированного персонала.
 - Снижение числа повторных исследований.

Цели внедрения автоматических анализаторов

- Обеспечить возможность централизации потоков исследования
- Повысить уровень безопасности работы персонала;
- Создать основу для соответствия международным стандартам организации лабораторной службы.

Требования к анализаторам:

- автоматическое разведение проб
- возможность использования для образцов стандартных пробирок
- наличие удобного интерфейса (системы ввода) с возможностью включения новых методики неограниченным количеством протоколов
- компактный дизайн
- встроенная программа контроля качества
- сохранение результатов анализов неограниченное время
- легкий поиск и распечатка
- возможность установки сканера и штрих-кода

Требования к анализаторам:

- анализатор должен быть полностью автоматическим
- производительность не должна зависеть от типа реакций
- исследуемый материал – плазма, сыворотка, ликвор, моча, цельная кровь
- открытая реагентная система
- сенсоры уровня реагентов и образцов
- автоматическая система контроля за остатками реагентов
- возможность подключения к внешнему компьютеру
- высокая надежность
- высокая точность результатов в условиях потока исследований

Анализаторы содержат одинаковые для всех исследований блоки:

- система, перемешивающая жидкость
- держатели проб и реагентов
- система нагрева
- архитектура программного обеспечения

Требования к автоматизации процесса исследований

- Высокая производительность.
- Гибкость схемы тестирования.
- Открытость системы - возможность использования тест-систем различных производителей; простота адаптации новых методик для пользователя.
- Низкая стоимость и доступность тест-наборов и расходных материалов.
- Высокая надежность системы.
- Автоматизация всех этапов тестирования
- Значительное количество протоколов исследования. Простота перехода от одних тест-наборов к другим.

Требования к автоматизации процесса исследований

- Возможность повышения мощности системы при растущем потоке исследований без значительного вложения дополнительных средств.
- Автоматический контроль рабочего состояния системы.
- Автоматическая идентификация проб, реагентов и расходных материалов.
- Полноценная система отчетности, включающая данные об ошибках системы и оператора.
- Программное обеспечение на русском языке, встроенная система помощи, возможность подключения системы к информационной базе лаборатории.

Автоматизация лабораторий





Задачи:

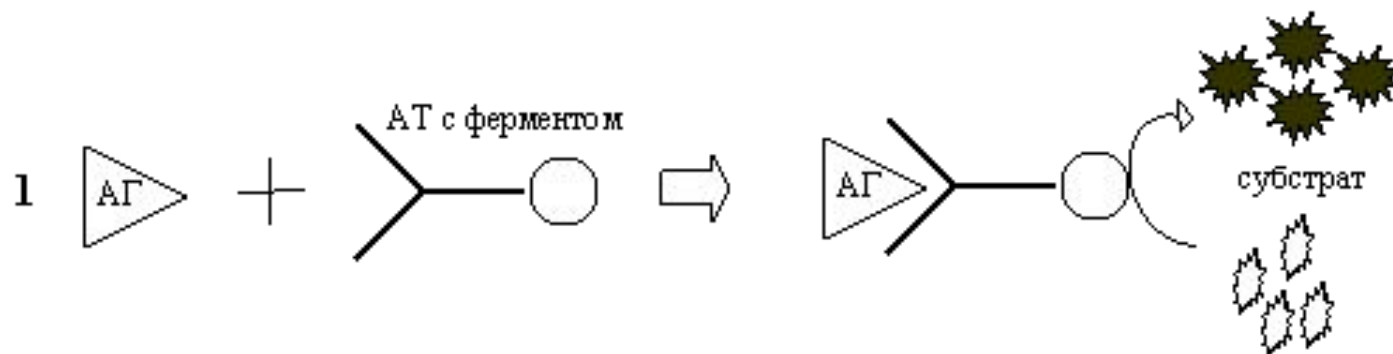
- Сведение к минимуму количества ошибок при проведении исследований и обработке данных
- Ускорение исследований
- Обеспечение оперативного доступа к результатам исследований
- Снижение финансовых расходов лаборатории
- Соблюдение требований информационной безопасности
- Повышение эффективности лабораторного оборудования
- Уменьшение затрат рабочего времени персонала при подготовке отчетности

Функции

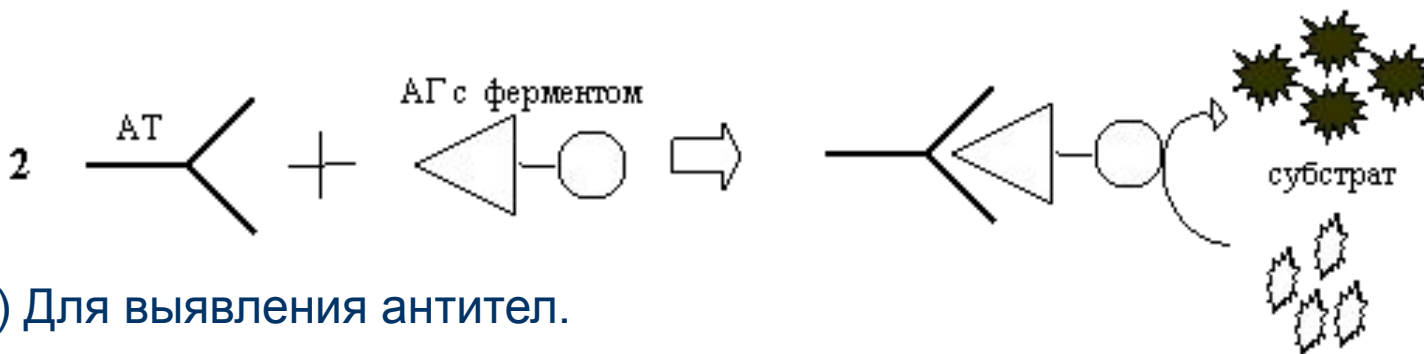
- Регистрация сведений о материале, поступающем на исследование, и о пациентах
- Контроль качества исследований
- Интеграция с внешними информационными системами
- Обмен данными с лабораторными анализаторами
- Подготовка бланков с результатами анализов
- Обеспечение финансово-экономической деятельности лаборатории
- Поддержка хранения данных в архиве лаборатории длительное время;
- Формирование отчетной документации



Иммуноферментный анализ



1) Для выявления антигенов.



2) Для выявления антител.

Автоматические имуноферментные анализаторы

- Открытая система
- Образцы: 400 образцов/час с промывкой иглы промывочным раствором объемом 500 мкл
- Реагенты: 800 лунок/час при многоканальном раскапывании



Автоматические имуноферментные анализаторы



- сохранение калибровочной кривой, в результате чего новая кривая может быть рассчитана с использованием всего двух калибраторов;
- запись истории пациентов со статистической обработкой результатов;
- программа контроля качества;
- управление многофункциональным манипулятором, состоящим из иглы-диспенсера, промывочного блока и устройства для перемещения микропланшет

Автоматические имуноферментные анализаторы



- Планирование анализов одновременно на нескольких планшетах
- До 12 разных анализов на одном планшете
- До 50 разных анализов на одном анализаторе одновременно
- Анализ контроля качества

Выполняемые тесты

- **Инфекции:** гепатит А (антитела к ВГА), HBsAg, HBeAg, HBcAg, HBsAg подтверждающий, анти-HBsAg, HBeAg, HBcAg, гепатит С (антитела к ВГС), хламидиоз (антигены, IgG, A, M), трихомониаз (IgM), токсоплазмоз (IgG, M), лямблиоз, аденовирус (IgG, M), кандидозы, аспергиллез, болезнь Лайма, цитомегаловирус (IgG, M), вирус Эпштейна-Барр (IgG, M), ВИЧ 1,2 (антитела), вирус простого герпеса (IgG, M), вирус опоясывающего герпеса (IgG, M), вирус кори (IgG, M), вирус гриппа А,В (IgA, G, M), вирус парагриппа 1,2,3 (IgA, G, M), вирус паротита (IgA, G, M), вирус краснухи (IgG, M), кампилобактериоз (IgG, M), полиомиелит, дифтерия (IgG), эхинококкоз (IgG), сифилис (IgG, M), иерсиниоз, столбняк

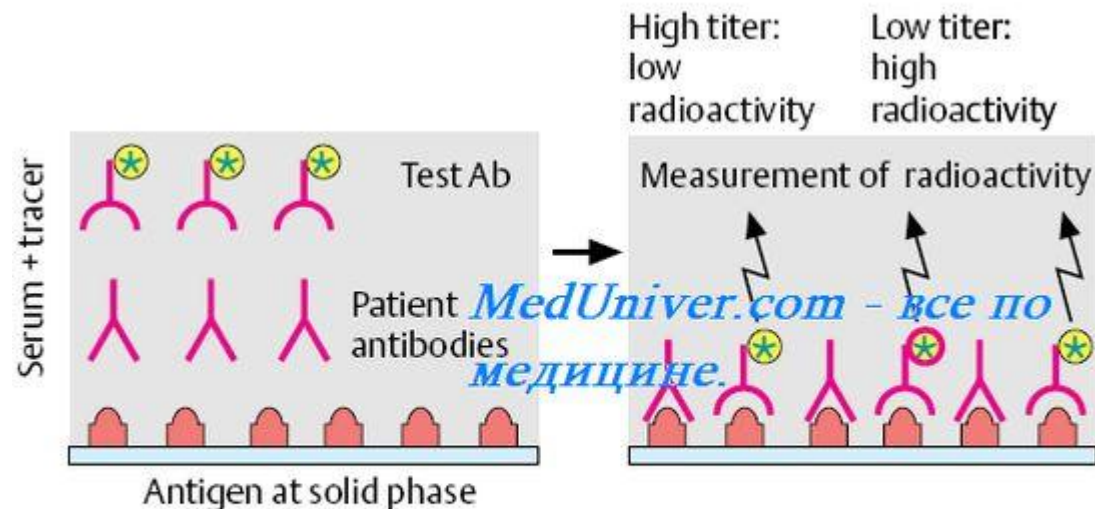
Выполняемые тесты

- **Опухолевые маркеры:** альфа-фетопротеин, карциноэмбриональный антиген, простатспецифический антиген, СА-125, СА-15-3, СА-19-9, СА-242, ферритин, ХГЧ, NSE, тканевой полипептидный антиген, бета2-микроглобулин, UBC (рак мочевого пузыря)
- **Щитовидная железа:** трийодтиронин (Т3), тироксин (Т4), тиреотропный гормон (ТТГ), тироглобулин, антитела к тироглобулину, антитела к тиреопероксидазе, антитела к микросомальным антигенам тиреоцитов
- **Репродуктивная функция:** пролактин, лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), антитела к сперме

Выполняемые тесты

- **Эндокринология:** кортизол, тестостерон, андростендион, прогестерон, адреналин, мелатонин, серотонин, СТГ, эстрадиол, эстриол, АКТГ, кальцитонин
- **Аллергия:** иммуноглобулин Е, антитела к аллергенам, гистамин
- **Беременность:** ХГЧ в моче и в сыворотке
- **Аутоиммунные и системные заболевания:** ревматоидный фактор, С-реактивный белок, АСЛО, антитела к ДНК и РНК (dsDNA, гистоны, SS-A, SS-B, RNP, Scl-70, Sm, Jo-I)

Радиоиммунный анализ



Principle: antibody in patient serum competes with radioactively labeled test antibody

C. Radioimmunoassay (classical method)

Многоканальный радиометр для радиоиммунного и иммунно-радиометрического анализа



Предназначен для проведения анализов содержания биологически активных веществ одновременно в 12 биопробах радиоиммунологическим методом с использованием радиоактивной метки на основе радионуклида I-125.

Программное обеспечение дает возможность работать с любыми RIA наборами.

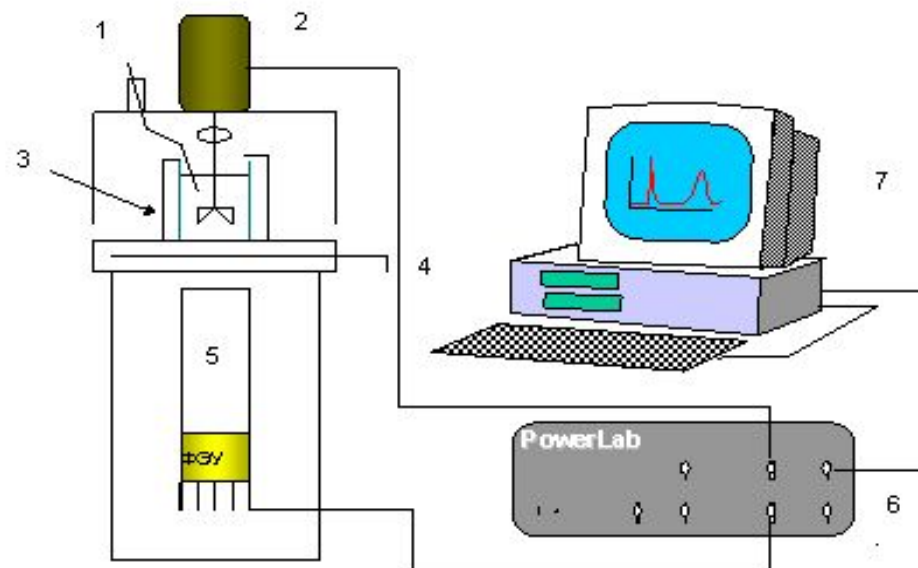
Интерфейсы программы позволяют использовать для печати и редактирования отчетов редактор текстов MSWord.

Результаты измерений хранятся в формате базы данных Access, что позволяет переносить их в другие программы.

Хемилюминесценция

- Хемилюминесценция - энергично протекающие химические реакции сопровождаются, как правило, выделением энергии в форме тепла; существуют, однако такие реакции, которые сопровождаются излучением света. свечение, сопровождающее химические реакции

Хемилюминометр



Хемилюминесценция (ХЛ) в биологических системах

Биохемилюминесценция



Хемилюминисцентный анализатор

Немедленный доступ:

- загрузка приоритетных тестов без прерывания работы анализатора;
- последовательный доступ: загрузка до 125 образцов на модуль;

Вместимость анализатора:

- образцов - 125 первичных пробирок;
- реагентов - до 25 наборов реагентов на 100 или 500 тестов;





Рабочий цикл анализатора:
- время получения первого результата - 28 мин,
каждый последующий -
через 18 сек.

- производительность до 200 тестов/час на модуль;
- одновременное проведение разных видов анализа

ХРОМАТОГРАФИЯ

(от греч. chroma, родительный падеж chromatōs - цвет, краска и... графия), физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами - неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную.

Основные виды хроматографии

В зависимости от природы взаимодействия:

- Адсорбционная
- Распределительная
- Ионообменная
- Эксклюзионная
- Осадочная

Основные виды хроматографии

В соответствии с агрегатным состоянием элюента:

- Газовая
- Жидкостная

Автоматизированные хроматографы



ЭЛЕКТРОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

люминесценция специальных жидких люминофоров в электрическом поле, которая происходит в несколько этапов: под действием электрического поля молекулы электролита в растворе диссоциируют, затем, при их рекомбинации, выделяется химическая энергия, которая идёт на возбуждение молекул активатора, присутствующего в растворе; возбуждённые молекулы активатора, возвращаясь в основное состояние, испускают квант света

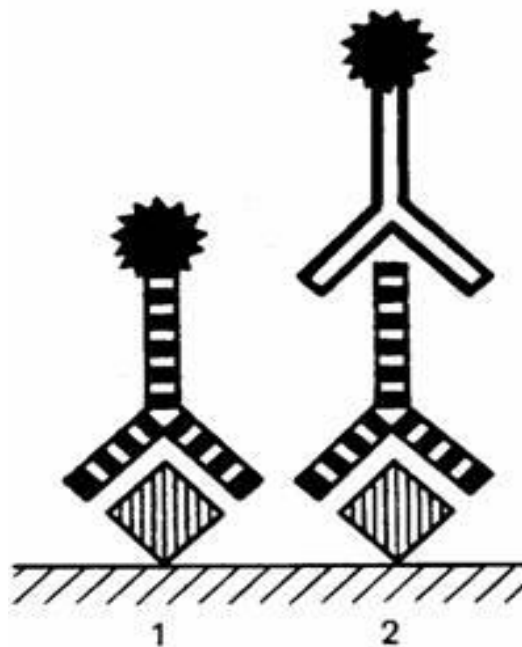


- твердофазный пробирочный (магнитные микрочастицы)
- до 90 анализов в час; первый результат через 9 или 18 мин.
- рутинный анализ, экстренный анализ, стандартный профиль
- рекалибровка по 2 точкам; стабильность до 8 недель
- до 15 тестов на борту одновременно
- штрих-код для реагентов, калибраторов и образцов

Иммунофлюоресцентный метод

метод выявления специфических Аг с помощью Ат, конъюгированных с флюорохромом. Обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Схема РИФ



Реакция иммунофлуоресценции:
1 - прямой метод;
2 - не прямой метод

Критерии специфичности РИФ

- **характерная морфология, размеры и расположение возбудителя в мазке;**
- **периферический характер свечения объекта;**
- **цвет флюоресценции;**
- **интенсивность флюоресценции.**

