

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ В ИММУНОЛОГИИ

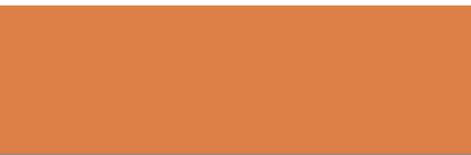




ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛЮОРИЕМЕТР ИЯ



**метод исследования
дисперсных сред
в режиме поштучного анализа элементов
дисперсной фазы по сигналам
светорассеяния и флуоресценции
(исследование одиночных
биологических клеток в потоке)**



ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- анализ «фенотипа» клеточной поверхности клетки по экспрессируемым ею маркерам (иммунофенотипирование лимфоцитов) В основе иммунофенотипирования лежит взаимодействие моноклональных антител (МкАТ), связанных с флюоресцентной меткой, с поверхностными антигенами лимфоцитов
- исследование функционального состояния клеток
- определение как внеклеточного, так и внутриклеточного уровня определенных белков, например, цитокинов

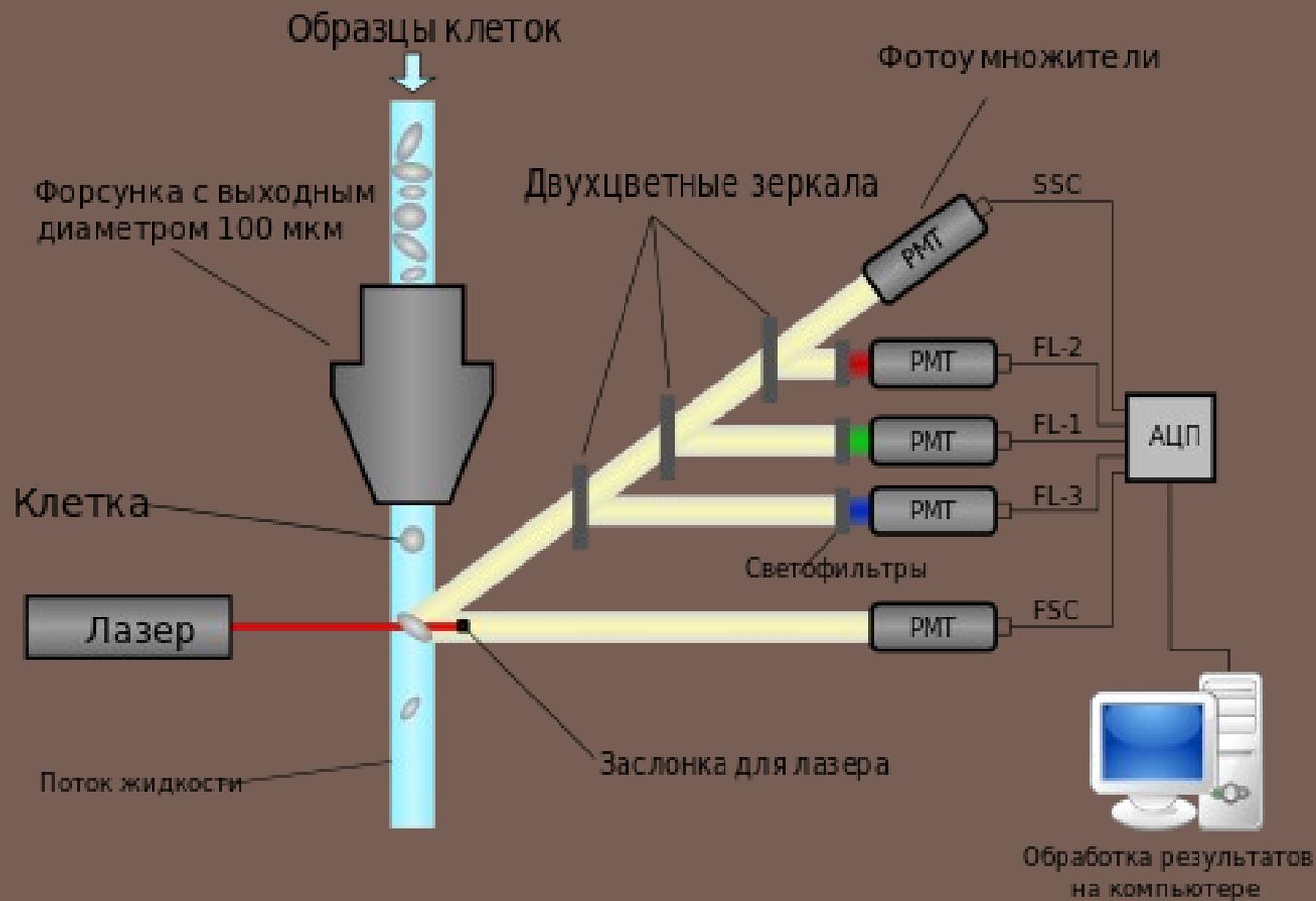
ПРИНЦИП РАБОТЫ МЕТОДА

- ❖ клеточная суспензия, предварительно меченная флюоресцирующими антителами или флуоресцентными красителями, попадает в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку
- ❖ условия подобраны таким образом, что клетки выстраиваются друг за другом за счет т. н. гидродинамического фокусирования струи в струе

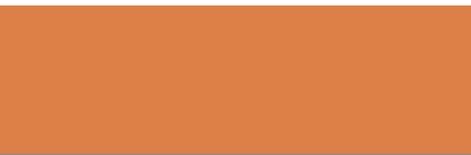
ПРИНЦИП РАБОТЫ МЕТОДА

В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют:

- ✓ рассеяние света под малыми углами (от 1° до 10°) (данная характеристика используется для определения размеров клеток)
- ✓ рассеяние света под углом 90° (позволяет судить о соотношении ядро/цитоплазма, а также о неоднородности и гранулярности клеток)
- ✓ интенсивность флуоресценции по нескольким каналам флуоресцентности (от 2 до 30) - позволяет определить субпопуляционный состав клеточной суспензии



**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ
(ИФА) – СОВРЕМЕННОЕ
ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ,
В ХОДЕ КОТОРОГО ВЕДЕТСЯ ПОИСК
СПЕЦИФИЧЕСКИХ **АНТИТЕЛ** В КРОВИ
ЛИБО **АНТИГЕНОВ** К КОНКРЕТНЫМ
ЗАБОЛЕВАНИЯМ
С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ НЕ ТОЛЬКО
ЭТИОЛОГИИ,
НО И СТАДИИ БОЛЕЗНИ.**



ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. поиск специфических АГ
2. поиск АГ каких – либо заболеваний
3. исследование гормонального статуса пациента
4. обследование на онкомаркеры
5. обследование на предмет наличия аутоиммунных заболеваний

ПРЕИМУЩЕСТВА

- ❖ высокая чувствительность (90%)
- ❖ стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (год и более)
- ❖ быстрота и удобство проведения диагностической реакции
- ❖ возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала
- ❖ возможность автоматизации всех этапов проведения реакции
- ❖ небольшая стоимость диагностических наборов
- ❖ возможность ранней диагностики инфекции
- ❖ унифицированность и пригодность для массовых обследований
- ❖ легкость в отслеживании динамики развития процесса инфекционного заболевания

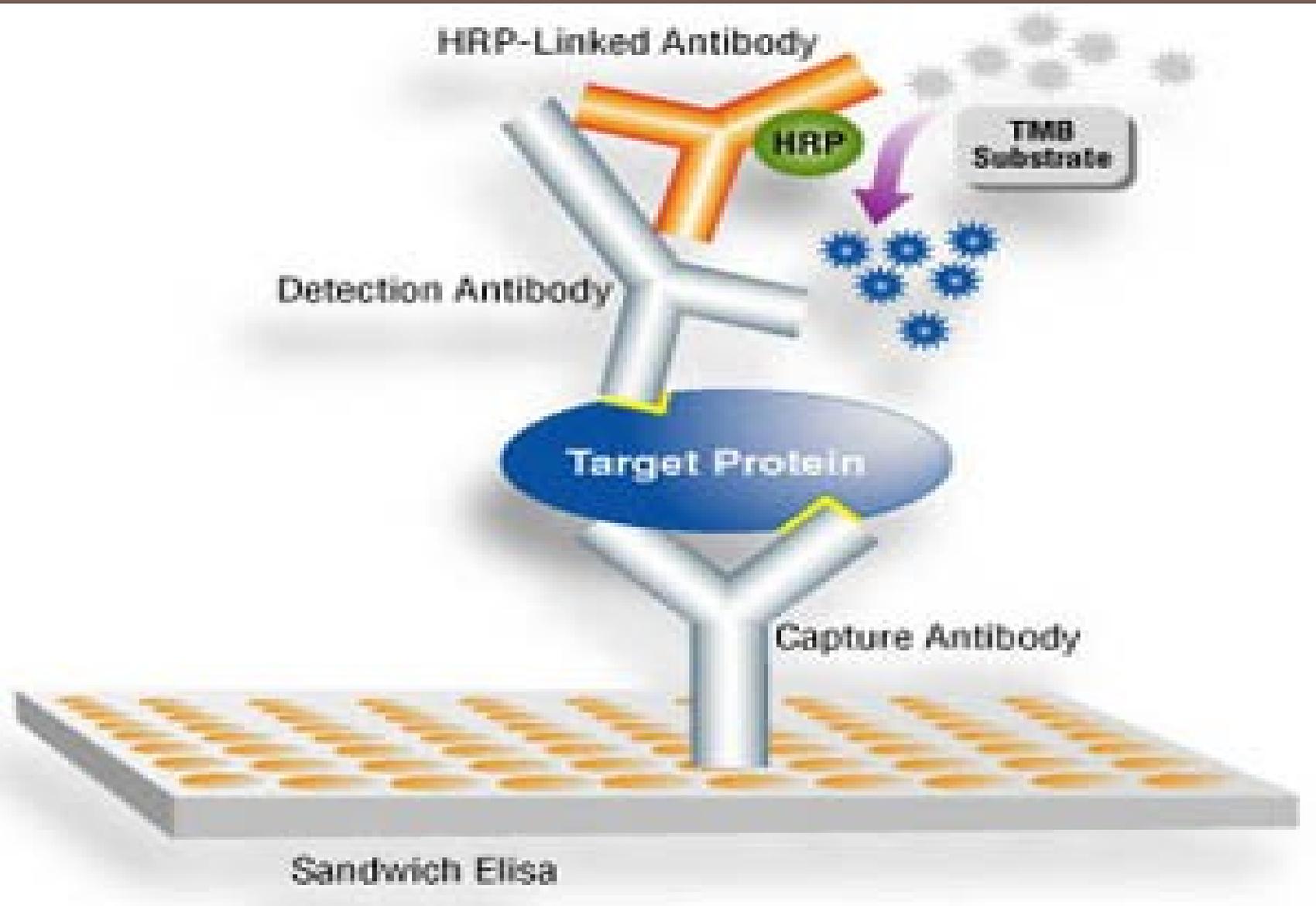
НЕДОСТАТОК ИФА

ОТНОСЯСЬ К НЕПРЯМЫМ
МЕТОДАМ ДИАГНОСТИКИ,
ОН ПОЗВОЛЯЕТ ОПРЕДЕЛИТЬ
ИММУННЫЙ ОТВЕТ ОРГАНИЗМА НА
ВОЗБУДИТЕЛЯ,
А НЕ САМОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ

СУТЬ МЕТОДА ИФА (ELISA)

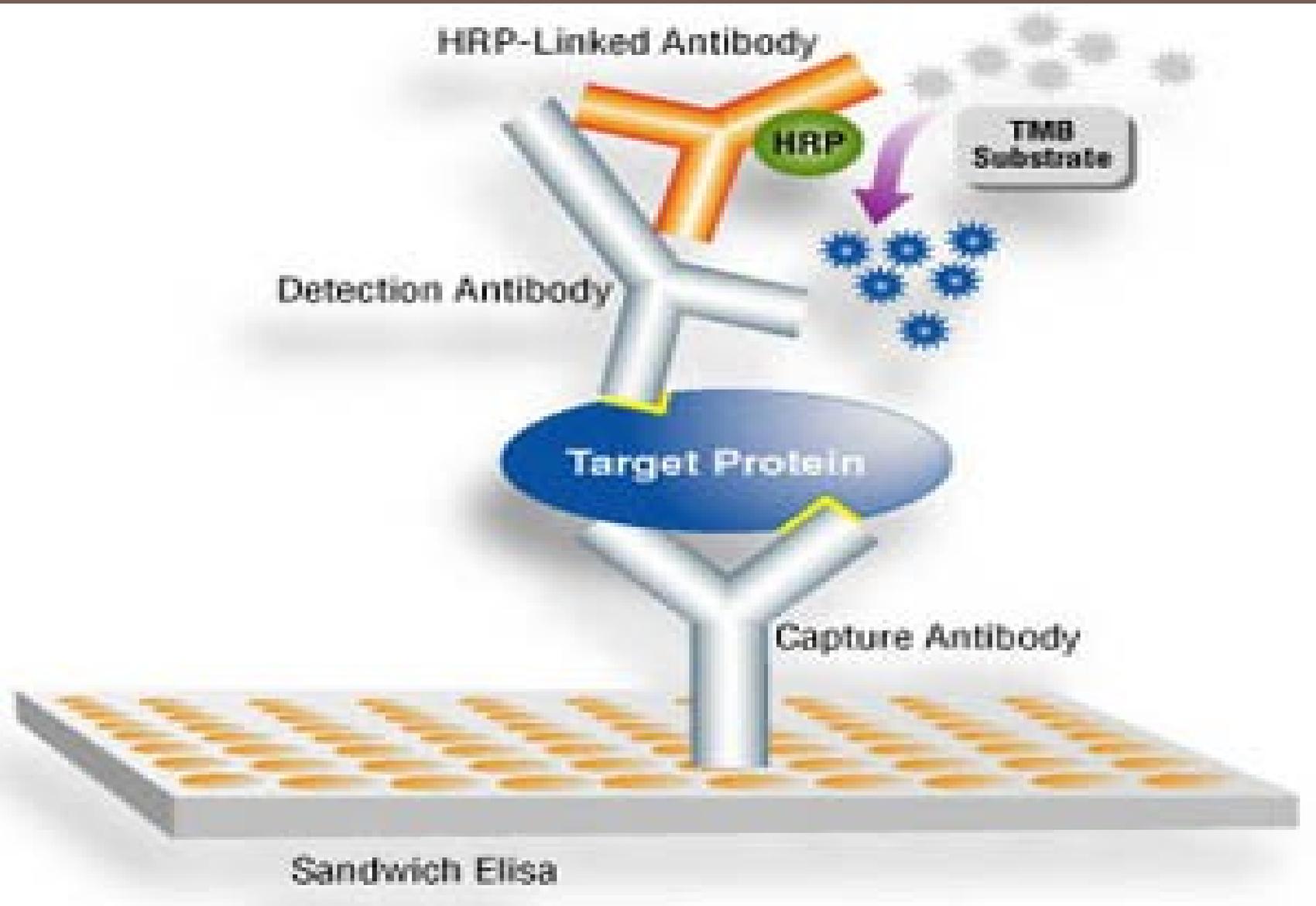
ЭТАП № 1

НА ПОВЕРХНОСТИ ЛУНОК ПЛАНШЕТА ДОКТОРА, ПРОВОДЯЩЕГО ОБСЛЕДОВАНИЕ, НАХОДИТСЯ ОЧИЩЕННЫЙ АНТИГЕН ОПРЕДЕЛЕННОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ. ПРИ ДОБАВЛЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА (СЫВОРОТКИ КРОВИ) ПАЦИЕНТА ПРОИСХОДИТ СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ МЕЖДУ ЭТИМ АНТИГЕНОМ И ИСКОМЫМ АНТИТЕЛОМ (ИММУНОГЛОБУЛИНОМ). ЭТО СОЕДИНЕНИЕ БУДЕТ ВЫСТУПАТЬ «ОСОБЫМ АНТИГЕНОМ» В СЛЕДУЮЩЕМ ЭТАПЕ



ЭТАП № 2

НА ДАННОМ ЭТАПЕ ИДЕТ ОБРАЗОВАНИЕ ИК - РЕАКЦИЯ МЕЖДУ «ОСОБЫМ АНТИГЕНОМ» И КОНЪЮГАТОМ (ЭТО ИММУНОГЛОБУЛИН, МЕЧЕНый ФЕРМЕНТОМ ПЕРОКСИДАЗОЙ). ДОБАВЛЯЕТСЯ ОСОБЫЙ ХРОМОГЕН. РЕЗУЛЬТАТОМ ТАКОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ЯВЛЯЕТСЯ ОБРАЗОВАНИЕ ОКРАШЕННОГО ВЕЩЕСТВА В ЛУНКЕ ПЛАНШЕТА, ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКРАСКИ КОТОРОГО ЗАВИСИТ ОТ КОЛИЧЕСТВА СОДЕРЖАЩИХСЯ В МАТЕРИАЛЕ ПАЦИЕНТА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ (АТ).

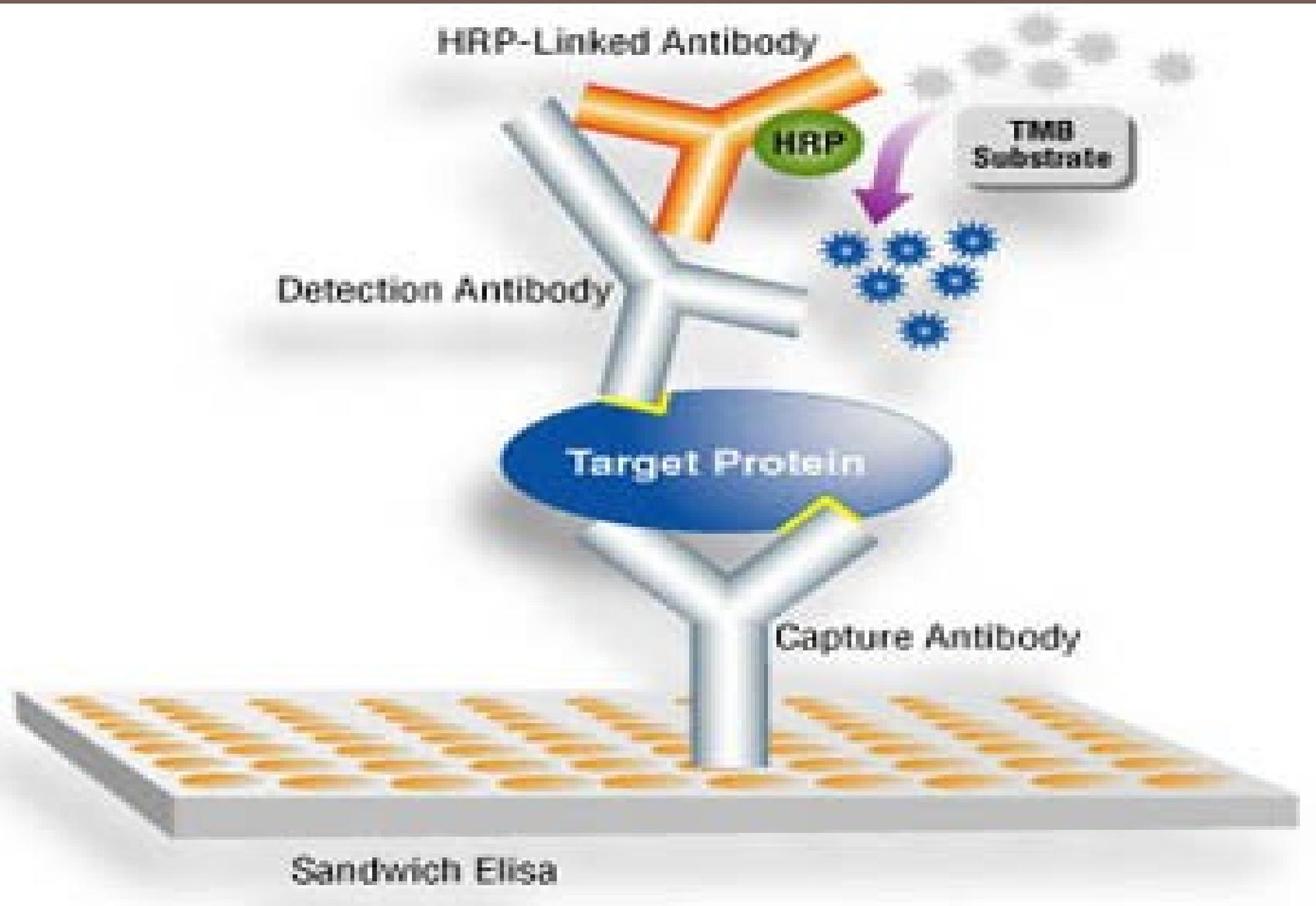


СУТЬ МЕТОДА ИФА

ЭТАП № 3

ДАЛЕЕ ПРОИСХОДИТ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТА:
ФОТОМЕТРИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ
МНОГОКАНАЛЬНОГО СПЕКТРОФОТОМЕТРА,
СРАВНЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ
ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА С ОПТИЧЕСКОЙ
ПЛОТНОСТЬЮ КОНТРОЛЬНЫХ ПРОБ,
МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ.

**КОЛИЧЕСТВО АНТИТЕЛ У ПАЦИЕНТА
НАПРЯМУЮ ЗАВИСИТ ОТ ВЫСОТЫ
ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ДАННОЙ
ЛУНКИ**





Ôèëüì ÈÔÀ.mp4



**ИММУНОБЛОТТИНГ
ИММУННЫЙ БЛОТТИНГ
«ВЕСТЕРН-БЛОТ»
(ИММУННЫЙ БЛОТ)**



ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ
по рекомендации ВОЗ иммуноблоттинг
используется при диагностике ВИЧ-
инфекции в качестве дополнительного
экспертного метода, который должен
подтверждать результаты ИФА

этим методом перепроверяют
положительный результат при ИФА,
поскольку он считается более
чувствительным и специфичным, хотя
более сложным и дорогим

СТАДИИ ИММУНОБЛОТА

- предварительно очищают и разрушают до составных компонентов ВИЧ
- с помощью электрофореза все входящие в состав вируса АГ разделяются по молекулярному весу
- методом блоттинга (аналог выдавливания на «промокашку» избытка чернил) АГ переносят из геля на полоску нитроцеллюлозы или нейлонового фильтра, которые отныне содержат невидимый пока глазом спектр белков, характерный для ВИЧ

СТАДИИ

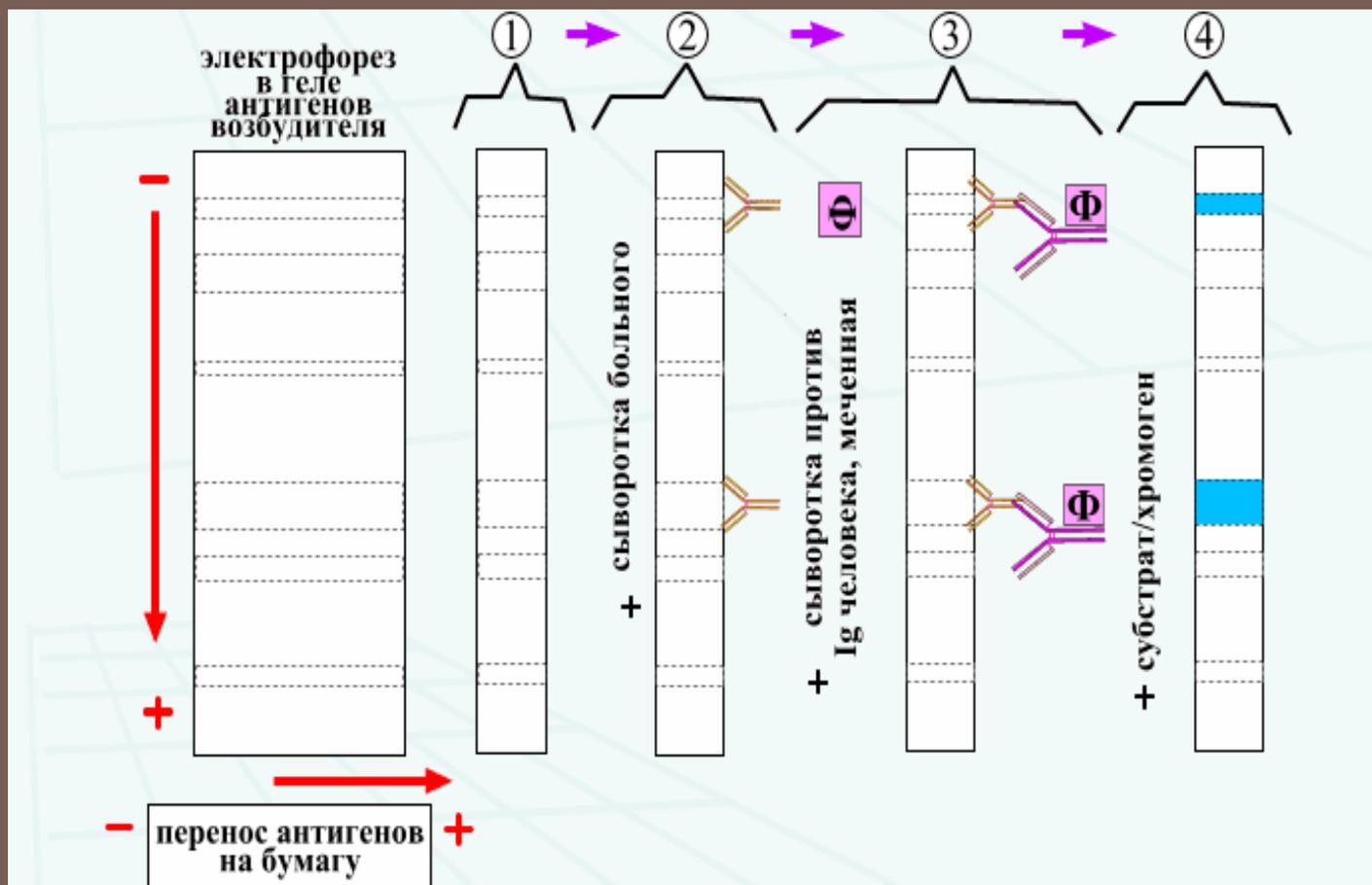
ИММУНОБЛОТ

- на стрип наносится исследуемый материал (сыворотка, плазма крови пациента), и если в пробе есть специфические АТ, то они связываются со строго соответствующими им полосками белков-антигенов
- в результате последующих манипуляций (подобных ИФА) результат этого взаимодействия визуализируется — делается видимым



в конечном итоге наличие полос на определенных участках стрипа подтверждает присутствие в исследованной сыворотке АТ к

строго определенным АГ ВИЧ



ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ,
ПОЗВОЛЯЮЩИЙ НАЙТИ У ЛЮДЕЙ
РАЗНЫЕ ВИДЫ ИНФЕКЦИОННЫХ И
НАСЛЕДСТВЕННЫХ ПАТОЛОГИЙ,
КАК В ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ФОРМЕ,
ТАК И ЗАДОЛГО ДО ТОГО,
КАК ПАТОЛОГИЯ НАЧИНАЕТ СЕБЯ
ПРОЯВЛЯТЬ

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

**МЕТОД, ПОЗВОЛЯЮЩИЙ ДОБИТЬСЯ
ЗНАЧИТЕЛЬНОГО УВЕЛИЧЕНИЯ
МАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ
ОПРЕДЕЛЁННЫХ ФРАГМЕНТОВ
НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ДНК) В
БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ
(ПРОБЕ)**

ПРЕИМУЩЕСТВА ПЦР

- **непосредственное выявление присутствия возбудителя** (а именно, специфического участка ДНК или РНК возбудителя) в исследуемом образце;
- **высокая специфичность**, достигающая 100%, позволяющая определять уникальный участок ДНК или РНК, характерный для конкретного возбудителя, что исключает возможность ложных реакций;
- **высокая чувствительность** метода ПЦР позволяет обнаружить даже единичные клетки возбудителей (вирусов, бактерий). Чувствительность ПЦР-анализа составляет 10-1000 клеток в исследуемом образце (к примеру, чувствительность иммунологических и микроскопических тестов - всего 10³-10⁵ клеток);
- **высокая производительность**, т.к. ПЦР - высокотехнологичная автоматизированная методика, предоставляющая возможность проведения тестирования в день забора материала и избавления, таким образом, пациента от лишних тревог. Полное исследование проводится за 4-4,5 часа, реже - несколько дольше;

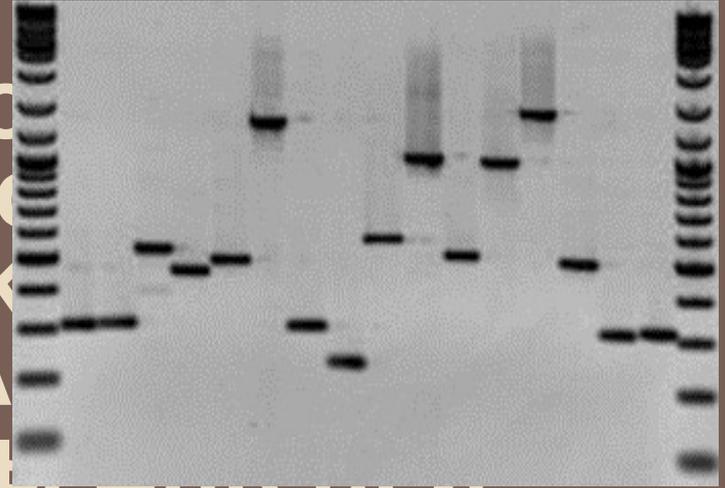
ПРЕИМУЩЕСТВА ПЦР

- позволяет **выявлять несколько возбудителей** из *одной* биологической пробы (например, при диагностике хламидийной инфекции, где ПЦР относится к основным методам, наряду с хламидией, можно обнаружить и нейссериию (гонококк) – возбудитель гонореи. Причем, на достоверности результатов это негативно не отражается);
- возможность обнаружения микроорганизмов до возникновения симптомов заболевания **в инкубационном периоде** (доклиническая диагностика) и после прошедшей болезни (ретроспективная диагностика) ;
- возможность обнаружения латентной инфекции;

ПРЕИМУЩЕСТВА ПЦР

- результаты ПЦР могут зафиксироваться (фотография, компьютер) с целью использования их в экспертных целях;
- работает с любым материалом;
- проведение ПЦР в архивном материале или биологических остатках, что важно для идентификации личности или отцовства.

МЕТОД ОСНОВАН НА МНОГОКРАТНОМ ИЗБИРАТЕЛЬНОМ КОПИРОВАНИИ ОТНОСИТЕЛЬНО КРАТКОГО ОПРЕДЕЛЁННОГО УЧАСТКА ДНК ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТОВ В ИСКУССТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ (IN VITRO). ПРИ ЭТОМ ПРОИСХОДИТ КОПИРОВАНИЕ ТОЛЬКО ТО-ГО УЧАСТКА, КОТОРЫЙ УДОВЛЕТВОРЯЕТ ЗАДАННЫМ УСЛОВИЯМ



КОМПОНЕНТЫ РЕАКЦИИ

- ❖ ДНК - матрица, содержащая тот участок ДНК , который требуется амплифицировать
- ❖ два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК
- ❖ термостабильная ДНК - полимераза - фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК
- ❖ дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
- ❖ ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы
- ❖ буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора

ПЦР ПРОВОДЯТ В АМПЛИФИКАЦИОННОМ ПРИБОРЕ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕМ ПЕРИОДИЧЕСКОЕ ОХЛАЖДЕНИЕ И НАГРЕВ ПРОБИРОК, ОБЫЧНО С ТОЧНОСТЬЮ НЕ МЕНЕЕ 0,1 °С. ДЛЯ ПЦР В РЕАЛЬНОЕ ВРЕМЯ ВЫПУСКАЮТ ПРИБОРЫ С АУДИРУДОВАННЫМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ ДЕТЕКТОРОМ.

СУЩЕСТВУЮТ ТАКЖЕ ПРИБОРЫ С АВТОМАТИЧЕСКОЙ КРЫШКОЙ И ОТДЕЛЕНИЕМ ДЛЯ МИКРОПЛАНШЕТ, ЧТО ПОЗВОЛЯЕТ ВСТРАИВАТЬ ИХ В АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ.



ХОД РЕАКЦИИ

обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий

- денатурация
- ОТЖИГ
- элонгация

ДЕНАТУРАЦИЯ

**ДВУХЦЕПОЧЕЧНУЮ ДНК-МАТРИЦУ
НАГРЕВАЮТ ДО 94—96 °С В ТЕЧЕНИИ 0,5
—2 МИН С ЦЕЛЬЮ РАЗРУШЕНИЯ
ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ДВУМЯ
ЦЕПЯМИ ДНК И РАЗХОЖДЕНИЯ ЦЕПЕЙ
ДНК**

ОТЖИГ

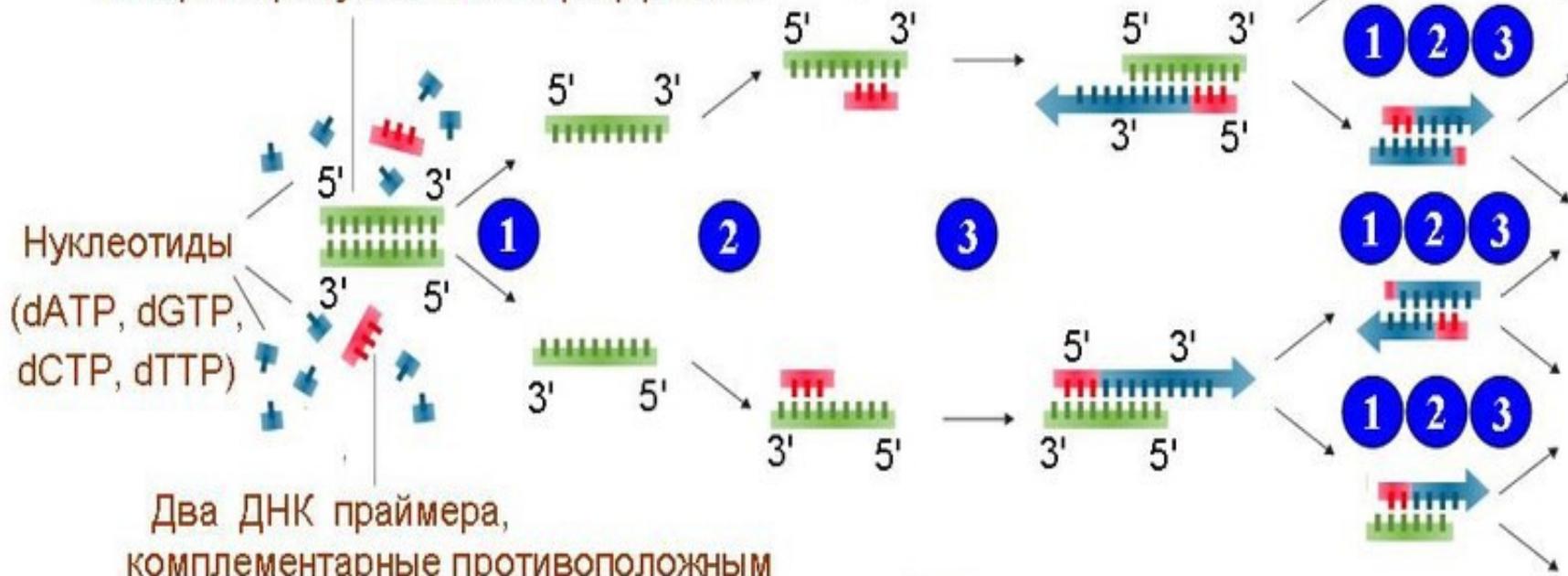
после того, как цепи разошлись, t° понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. t° отжига выбирается на 5 градусов меньше, чем температура плавления праймеров. Время стадии отжига — 30 сек

ЭЛОНГАЦИЯ

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера и синтезирует новую цепь вдоль матрицы в направлении от 5'- к 3'-концу. После окончания всех циклов проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7—10 мин.

Полимеразная цепная реакция - ПЦР

ДНК-матрица, с участком ДНК, который требуется амплифицировать



1 Денатурация при 94 - 96°C

2 Отжиг при ~ 68°C

3 Элонгация при 72°C

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЦР

- ✓ медицинская диагностика—диагностика вирусных, бактериальных инфекций, определение наличия мутаций
- ✓ криминалистика—сравнение генетического материала, установление отцовства
- ✓ персонализированная медицина—индивидуальная восприимчивость к лекарственным препаратам
- ✓ клонирование генов