

Современные технологии в диагностике инфекционных болезней

Старцева Галина Юрьевна

К.м.н., доцент кафедры
инфекционных болезней СЗГМУ
им. И.И.Мечникова

Введение

- К современным высоко достоверным методам лабораторной диагностики инфекционных болезней можно отнести 3 основных методики: ИФА (иммуноферментный анализ), иммуноблоттинг, ПЦР (полимеразная цепная реакция). Они позволяют оценить ситуацию с разных сторон.

ELISA – ensim-linked immunosorbent assey (ИФА)

- Это **иммунохимический** метод, основанный на образовании комплекса антиген-антитело, который затем выявляется с помощью фермент-субстратной реакции.

Историческая справка

- Ялоу Р. и Берсон С. в 60-ых годах 20-го века предложили метод радиоиммунологического определения инсулина (РИА).
- Энгвалл Е. и Пэлман Р. заменили радиоактивную метку на ферментную и заложили основы твердофазного иммунохимического анализа.

Общие принципы ИФА

- Гетерогенный твердофазный ИФА.
- Существует множество модификаций, но схемы постановки очень похожи:

АГ-АТ → промывка + конъюгат → + субстрат/хромоген → детекция.

Оптическая плотность является количественной мерой степени окраски, которая пропорциональна концентрации определяемого вещества (аналита).

Аналиты (определяемые вещества)

- Химическая природа аналитов очень разнообразна, чаще всего это белки :
 - Антитела, антигены
 - Гормоны
 - Нуклеиновые кислоты
 - Витамины
 - Лекарственные и токсические вещества

Качество рекомбинантных тестов

- Специфичность качественных рекомбинантных тестов приближается к 100%.

Учет результатов в ИФА

- Для качественной диагностики важно установить наличие или отсутствие антител(антигена) при этом за положительное значение принимают сигнал, который в 2-3 раза превышает сигнал контрольного образца, не содержащего аналит.

Причины получения ложных результатов в ИФА

- ***Погрешности, связанные с забором материала, транспортировкой, постановкой реакции.***
 - Письменные обозначения проб
 - Длительная доставка материала
 - Контаминация отрицательных проб положительными.

Преимущества ИФА

- Стандартизация метода
- Высокая чувствительность и специфичность.
- Стабильность при хранении и доступность реагентов.
- Инструментальный и визуальный учет реакции.
- Быстрота и возможность автоматизации на всех этапах проведения исследований.

ИФА

- **Достоинства:**

Высокая чувствительность и специфичность

Наличие недорогих отечественных тест/систем.

Стандартизация и автоматизация процессов.

Контроль качества.

Доступность

- Понятие «авидность» может быть применено ко всем реакциям взаимодействия между АГ и АТ.
- ***Подозревается первичная инфекция***
Или
Реактивация хронической инфекции
- ***Реинфицирование***
Для верификации всех вариантов может быть выполнено определение авидности.

Например...

- Подтверждением этого является постепенное снижение у детей, рожденных от инфицированных матерей, концентрации суммарных анти-НСV и Ат к структурным и неструктурным белкам до полного исчезновения при неизменно высокой их авидности. И, напротив, низкая авидность, а в дальнейшем ее повышение с одновременным нарастанием концентрации структурных и неструктурных Ат указывало на продолжающееся антигенное раздражение и выработку собственных Ат, а значит, — текущую инфекцию.

Иммуноблот

- Иммуноблоттинг (иммуноблот) - высокоспецифичный и высокочувствительный референтный метод, подтверждающий диагноз для пациентов с положительными или неопределенными результатами анализов, полученных в т.ч. при помощи ИФА.

Иммуноблот

- Этот 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. Уникальность иммуноблота заключается в его высокой информативности и достоверности получаемых результатов.

Недостатки лабораторной диагностики до появления молекулярных методов

1. Неэффективность диагностики в период т.н. «серологического окна».
2. Выявление антител у всех детей, рожденных от инфицированных матерей.
3. Ложноположительные результаты ИФА.
4. Неинформативность результатов анализа для мониторинга терапии .
5. Недостаточная информативность результатов анализа для прогноза заболевания.

Молекулярно-генетические тесты

- **Реакция молекулярной гибридизации (МГ)**
- **ПЦР – полимеразная цепная реакция**
 - ПЦР – тест качественный
 - ПЦР – тест количественный

МГ и ПЦР

- В реакции МГ происходит взаимодействие однонитевых комплементарных цепей НК и образование двунитевой структуры. Известными компонентами реакции являются зонды с меткой. При этом не происходит увеличения копий искомого возбудителя, поэтому МГ менее чувствительна, чем ПЦР.

ПЦР (1)

- Разработана Кэрри Мюллісом, Нобелевская премия 1993г.
- Это метод амплификации *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определенную последовательность нуклеиновой кислоты в количестве, превышающем исходную млн. раз.

ПЦР(2)

- **Праймеры** – синтетические олигонуклеотиды, состоящие из 20-30 пар оснований, комплементарных участкам отжига (присоединения) на идентифицируемой матричной нуклеиновой кислоте.
- **Tag – pol** – выделена из термостойких бактерий, высоко стабильна и сохраняет активность до конца реакции.
- **дНТФ** – дезоксинуклеотидтрифосфат.

Чувствительность реакции

- **Аналитическая чувствительность** – представляет собой то минимальное количество копий НК в 1 мл. образца, которое может быть определено данной тест-системой.
- **Диагностическая чувствительность** оценивается в % и определяет количество пациентов с данным заболеванием, дающих истинно положительные результаты при использовании конкретного набора.

- Широкое использование ДНК-, РНК-диагностики ни в коей мере не отменяет методы иммунохимических исследований (ИФА, РИФ и др.), а дополняет их.

Материал для ПЦР

- Кровь
- Сыворотка
- Моча
- Слюна
- Соскобы и мазки со слизистых
- Биоптаты органов и тканей
- Ликвор
- Слезная жидкость
- Каловые массы

Хранение образцов

- Необходимо минимизировать время от момента забора образца до постановки
- При температуре 2-4° С не более 48 часов, для более длительного хранения используют максимально низкую температуру.
- При определении вирусной нагрузки необходимо ставить реакцию в тот же день. Хранение в течение 24 часов снижает ВН на 14%, через 48 часов ВН снижается на 20%.

Область применения метода ПЦР в клинической диагностике:

- ранняя диагностика инфекционных заболеваний у серонегативных пациентов;
- выявление персистирующих, латентных и рецидивирующих форм инфекций;
- контроль проведения лечения;
- диагностика оппортунистических инфекций, часто протекающих на фоне иммунодефицита;
- уточнение сомнительных результатов серологических исследований;

Область применения метода ПЦР в клинической диагностике:

- эпидемиологические исследования;
- выявление наиболее патогенных штаммов инфекционных агентов;
- исследования инфекционности пулированных образцов крови и ее продуктов;
- определение резистентности к лекарственным препаратам.

- Методы ДНК-диагностики незаменимы в пренатальной диагностике наследственных заболеваний (муковисцидоза, фенилкетонурии, гемофилии и пр.), а также при установлении отцовства.

Современные диагностические наборы позволяют:

- дифференцировать генотипы вирусов
- проводить определение вирусной нагрузки (ВН) в диапазоне от 30 до 10^7 МЕ/мл
- наборы реагентов некоторых производителей имеют чувствительность 15 МЕ/мл РНК (ВГС) и надежно определяет ее концентрацию в интервале 15– 10^7 МЕ/мл.

- В реальной ситуации при анализе клинических проб применение современных методических приемов позволяет уменьшить совокупную погрешность анализа до значений $0,1-0,2 \lg$. Такой точности достаточно для решения актуальных клинических задач.

- Количественная ПЦР открывает перспективы для решения широкого спектра задач клинической лабораторной диагностики: контроль уровня бактериальной обсемененности слизистых оболочек, выявление ассоциированных с развитием опухолей онкогенов, сравнительная оценка экспрессии генов в норме и при патологических состояниях.

- Важнейшей сферой применения ПЦР с детекцией в режиме реального времени является определение вирусной нагрузки (количество копий генетического материала вирусного патогена в анализируемом объеме сыворотки или плазмы крови) для назначения противовирусной терапии и мониторинга ее эффективности.

- Особое значение имеет количественное определение возбудителей таких инфекций с парентеральным путем передачи, как ВИЧ-инфекция и вирусные гепатиты В и С. Аналогичные исследования имеют диагностическую значимость для заболеваний, вызываемых цитомегаловирусом и парвовирусом В19. Целесообразность определения вирусных нагрузок обсуждается для некоторых других герпесвирусов (HHV6-8 и вируса Эпштейна-Барр).

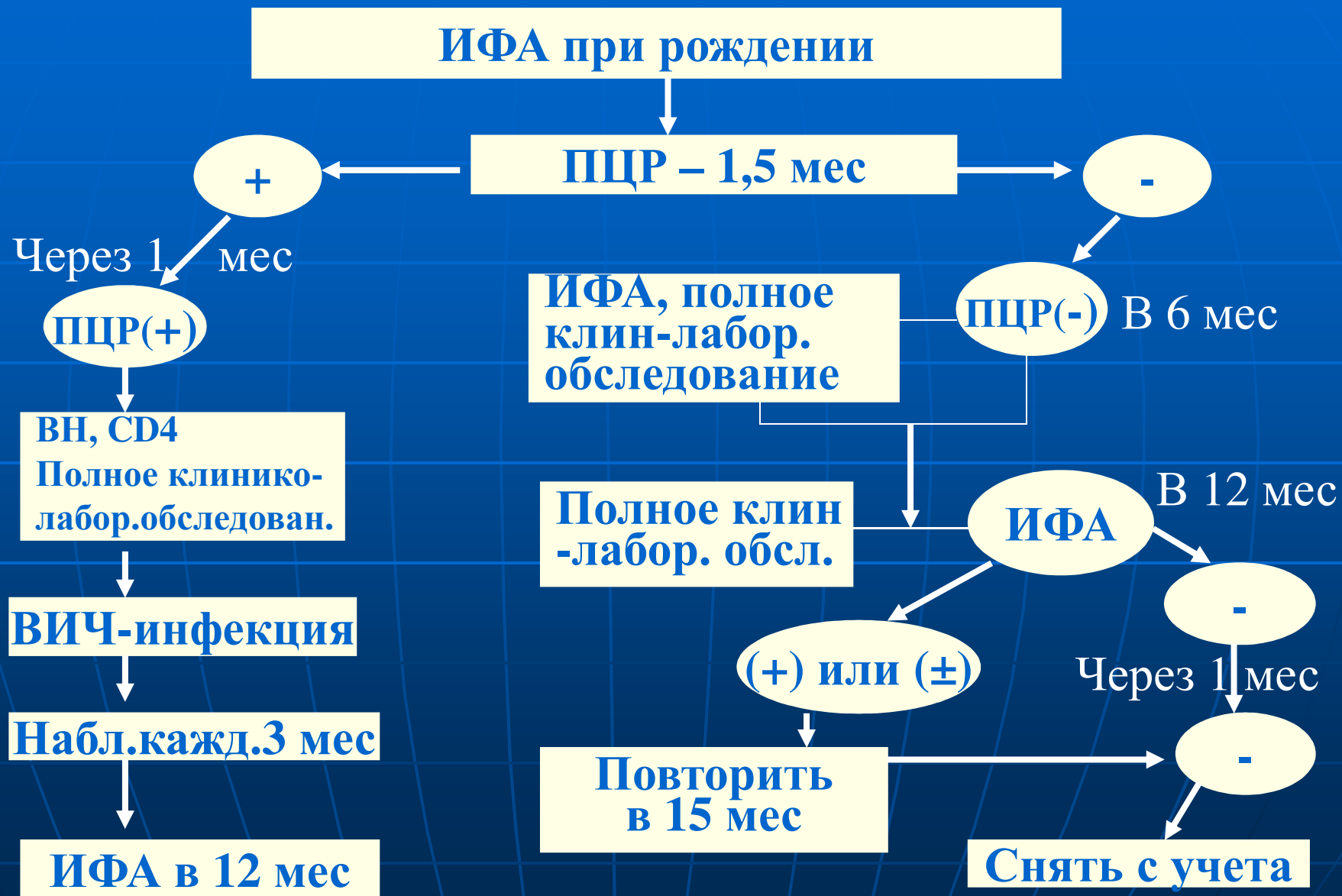
Основные маркеры в лабораторной диагностике ВИЧ-инфекции после появления молекулярных методов



ПЦР на ДНК

- Метод выявления ДНК, которую вирус внедрил в клетки организма.
- В основном используется для диагностики ВИЧ-инфекции у новорожденных.
- Через 48 ч после заражения чувствительность 38%.
- Через 2 недели после заражения чувствительность 93%.
- Через 4 недели после заражения чувствительность 96%.

Алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции



Серологическое окно составляет:

- Для ВИЧ – 23- 28 дней. АГ p24 выявляется с 16 дня, РНК с 10-11 дня.
- Для ВГС – АТ появляются через 56 дней. РНК- 7-14 дней, АГ – выявляется быстро.
- Для ВГВ – ДНК выявляется через 35 -36 дней, ИФА –на HbsAg через 12 дней т.е эффективность ПЦР не столь значительна.

Продолжение ...

- Серологическое окно состоит из двух фаз:
- А) эклипсная – репликация вируса происходит в лимфоузлах, печени, в крови вирус практически отсутствует.
- Б) виремическая – вирус присутствует в плазме, АТ не выявляются. В фазе виремии
- ВН составляет:
 - 100 - 100000000 г- экв./мл при ВИЧ.
 - 1000000 - 100000000 г- экв./мл при ВГС.
 - 100 - 10000 г- экв./мл при ВГВ

- В ряде случаев отрицательный тест на антитела не исключает инфекции. К таким случаям относятся острый гепатит С и иммунодефициты. Для диагностики острого гепатита С можно прибегнуть к определению вирусной РНК, так как она выявляется уже в первые 1-2 нед заболевания, в то время как антитела появляются в среднем через 8 нед.

- Определение вирусной РНК подходит и для обследования лиц, у которых антитела к вирусу не обнаружены, но в силу сопутствующих заболеваний или других причин (ВИЧ-инфекция, постоянный гемодиализ) снижена выработка антител, ложно-положительный результат ИФА на антитела, изредка, преходящая или стабильно низкая вирусемия.
- Наличие или отсутствие РНК ВГС не является диагностическим критерием хронического гепатита С и определяет фазу процесса (активный, неактивный).

- ПЦР ВГС количественное определение – незаменимый тест в мониторинге эффективности терапии

- ДНК – маркер вирусной репликации
- HBsAg - маркер инфекции ВГВ- отражает баланс вирус-иммунная система
 - продуцируется «в избытке» по сравнению с вирионами
 - в крови в форме сферических частиц (неинфекционные)
- Количественное определение HBsAg и ДНК – взаимодополняющие и коррелирующие между собой тесты

Продолжение

- Снижение концентрации HBsAg и ДНК ВГВ: хороший прогноз устойчивого вирусологического ответа
- ДНК и HBsAg - нет снижения концентрации - нет ответа, рекомендована альтернативная терапия
- ДНК ВГВ – уровень падает, HBsAg – нет, низкая вероятность устойчивого вирусологического ответа, коррекция противовир. терапии?

Применение ПЦР в донорстве.

- Причины инфекционного риска при гемотрансфузии:
 - недостаточная чувствительность т/с.
 - Низкие титры антител
 - Процедурные ошибки
 - Отсутствие маркеров в серонегативном окне
 - Соотношение этих причин составляет: 0,6 : 0,1:0,4:15 т.е наибольшую угрозу представляют образцы, полученные от серонегативных доноров.

Алгоритм диагностики плазмы

- А) ИФА - , ПЦР - → все образцы используют.
- Б) ИФА+, ПЦР - → образцы изымаются, пул подразделяется и проводится исследование для исключения позитивного пула и образца.
г-экв./мл при
- В) ИФА-, ПЦР+ → пул подразделяется . Исследуются индивидуальные образцы для выявления источника.

- Комплексное обследование пациента различными методами дает возможность врачу получить более полную информацию как о наличии инфекционного агента, так и об иммунном статусе пациента.
- Более точная постановка диагноза и назначение соответствующего этиотропного лечения с последующим его контролем

Спасибо за внимание.