

ЧУОВО медицинский университет «РЕАВИЗ»

Презентация
по дисциплине «Иммунология»
на тему:
«Плюсы и минусы методов ЛД»

Выполнил:

Гусак А.А.

«Лечебное дело»

4 курс группа 411

Преподаватель:

Хабибуллина Л.Р.

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 лабораторной 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.

Серологические исследования



- Реакции иммунитета широко используют для диагностики инфекционных заболеваний у человека.
- Различают реакции, в которых по известным антителам определяют неизвестные антигены, и реакции, направленные на поиск неизвестных антител по известным антигенам.
- Перспективны методы, основанные на обнаружении в ранний период болезни микробных антигенов в различных субстратах.

ДОСТОИНСТВА МЕТОДА:

- высокая специфичность,
- относительная простота,
- доступность, безопасность,
- быстрота получения результатов.
- определение классов Ig чётко характеризует этапы инфекционного процесса

Методы выявления микробных АГ - важный инструмент экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, а количественное их определение в динамике инфекционного процесса служит критерием эффективности проводимой антимикробной терапии.

НЕДОСТАТКИ МЕТОДА: при острых инфекционных заболеваниях обнаружение АГ часто бывает ретроспективным диагнозом, т.к. они появляются в достаточных титрах к 7-8 дню от начала болезни

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

ИДЦ

*АВТОМАТИЧЕСКИЙ
НЕФЕЛОМЕТР «BNProSpec»-*



Преимущества автоматической нефелометрии

- + ОДИНОЧНЫЙ АНАЛИЗ
- + ВЫСОКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ
- + ВЫСОКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ (ОСОБЕННО ВАЖНО ОКОЛО «НУЛЯ», НЕТ ЛОЖНЫХ ЗНАЧЕНИЙ)
- + ВЫСОКИЙ ДИНАМИЧЕСКИЙ ДИАПАЗОН

Недостатки

ДОРОГОВИЗНА, НЕОБХОДИМОСТЬ СПЕЦИАЛЬНЫХ ЗНАНИЙ

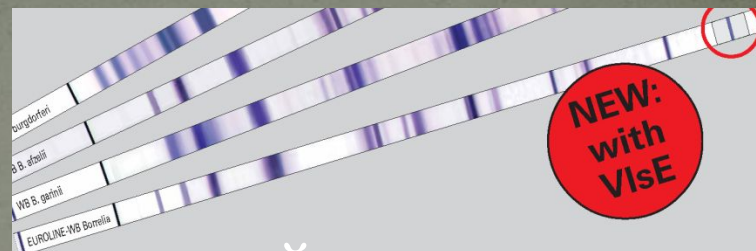
Нефелометрия

- **Нефелометрия** основана на феномене рассеивания света, когда падающий луч ударяется в частицу или комплекс антиген — антитело в растворе. В результате этого количество рассеянного света пропорционально количеству антигена.
- Нефелометрию типично используют для определения уровня специфических белков, которые, связываясь с антителами, образуют крестообразные частицы в растворе.
- Под нефелометры обычно специализированы отдельные анализаторы, имеющие ограниченное меню тестов, поскольку принцип рассеивания света применим только для молекул размером не больше 40 нм.

Приборы для нефелометрии программируются под измерение определенных компонентов биологической жидкости.

Экспресс-диагностика

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



Иммуноблоттинг

Этот метод используется для определения некоторых антител для диагностики инфекционных заболеваний. Является более чувствительным и специфичным, чем скрининговые методы выявления антител IgG и IgM.

Суть метода состоит в следующем:

На полоску наносятся различные антигены, связанные с инфекционным агентом.

1. Далее наносится проверяемый биологический материал (сыворотка). Если в сыворотке есть антитела к этим антигенам, они связываются с ними. После этого проводится отмывка от несвязавшихся антител.
2. После этого полоски промываются и на них наносятся вторичные антитела (антитела к антителам). Если на первом этапе после промывки остались антитела, они связываются с вторичными антителами. После этого вновь проводится промывка. Несвязавшиеся вторичные антитела смываются.
3. Вторичные антитела имеют специальную метку, по которой мы можем определить, связались они с антителами или нет.

Оценка такой полоски проводится комплексно.

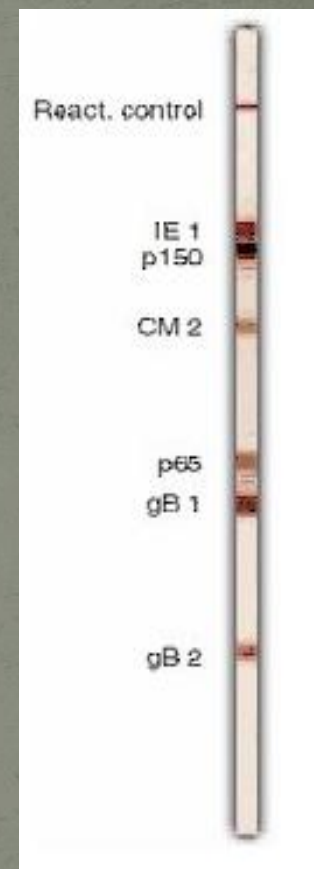
- **Высокочувствительный и специфичный тест!**

- ❖ Чувствительность 97 %
- ❖ Специфичность 99 %

- **Высокая разрешающая способность между отрицательным и положительным результатами!**

- **Более точное выявление срока заражения**

Используется для подтверждения результатов скрининговых исследований, таких как ИФА (ELISA) или реакция иммунофлуоресценции (РИФ).



Преимущества экспресс-методов

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

Однако тест-полоски не лишены недостатков

- *Надежность и чувствительность* зависит,
 - *во-первых*, от качества используемых в тесте реагентов
 - *во-вторых*, от концентрации антигена в биоматериале.
- Качество используемых реагентов *зависит* от способов их получения, очистки и фиксации на полоске.
- Концентрация антигена – от стадии заболевания и количества биоматериала.

Количество биоматериала особенно важно при использовании цельной крови.

- Существенную роль играет гематокрит, т.е. соотношение плазмы и форменных элементов. *При высоком гематокрите снижается доля элементов антигена из плазмы по сравнению с форменными элементами*

Кроме того:

- ❑ ИХА-тесты обеспечивают только **качественный результат** (да - нет), измерение концентрации невозможно. При некоторых заболеваниях, они могут быть малоинформативными.
- ❑ Экспресс-тесты (антигенные) **«работают» только в течение ~ 3-7 дней** после заражения (только при первоначальном воздействии антигена на организм)
- ❑ Минимальная определяемая ИХА концентрация антигена или антител сильно выше, чем у ИФА, что может давать **«ложноотрицательный»** результат на ранней стадии, поскольку уровень антигена/антител может быть **слишком низким**, чтобы обнаружить заболевание на ранней стадии.
- ❑ Большой процент **«ложноположительных»** результатов, что мешает при исследовании на вирусоносительство.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Метод ПЦР был разработан американским биохимиком Кэри Мюллисом в 1983 г. на основе применения открытой им термостабильной ДНК-полимеразы (Tag-полимеразы).

Принцип метода состоит в увеличении в 10^6 — 10^8 раз числа копий специфического участка ДНК возбудителя, катализируемого *in vitro* ДНК-полимеразой в автоматическом режиме.



К достоинствам метода ПЦР следует отнести:

- высокую чувствительность, позволяющую определять 10—1000 клеток в пробе;
 - высокую специфичность, поскольку в исследуемом материале выявляется уникальный для данного возбудителя фрагмент ДНК;
 - универсальность процедуры обнаружения различных возбудителей из одной биопробы;
 - высокую скорость анализа (4—4,5 ч);
 - возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.
- ❖ ПЦР эффективна для диагностики труднокультивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов. Ее использование целесообразно для выявления возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.
 - ❖ Применение ПЦР эффективно для диагностики широкого спектра бактериальных и вирусных инфекций.

В последнее время достаточно успешно реализуются количественные методы ПЦР-анализа, позволяющие определить концентрацию возбудителя в материале (микробную или вирусную нагрузку), например оценить репликативную активность вируса гепатита В, С и ВИЧ.

Однако следует иметь в виду, что метод ПЦР имеет и свои ограничения, в частности, для диагностики инфекций, вызванных условно-патогенной аутофлорой.

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

наиболее старые и широко применяемые, являются «золотым стандартом»

ДОСТОИНСТВА МЕТОДА:

- Дешевизна
- Возможность качественного и количественного анализа
- Широта применения
- Возможность обнаружения «живого» возбудителя
- Являются во многих случаях подтверждающими, весьма достоверными и входят во многие комплексные исследования.

НЕДОСТАТКИ МЕТОДА:

- ✓ Длительность
- ✓ Наличие сероваров и серотипов одного вида возбудителя
- ✓ Относительная сложность приготовления препарата

Тем не менее:

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



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ