



## «Новые» и «старые» методы в практике диагностики инфекционных заболеваний лаборатории КГБУЗ ЦПБСИЗ

Заведующая лабораторией  
Горовенко Н.А.



# ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Лабораторный отдел функционирует с апреля 1990 года и является структурным подразделением Центра.

Лаборатория создавалась в целях проведения скрининговых и арбитражных исследований по диагностике ВИЧ, кровоконтактных вирусных гепатитов, оппортунистических инфекций бактериальной и вирусной этиологии, исследования иммунного статуса.



# ЗАДАЧИ ЛАБОРАТОРИИ

На современном этапе лаборатория решает следующие задачи:

- Первичная (скрининговая) диагностика ВИЧ инфекции с использованием ИФА тест-систем четвертого поколения.
- Референтная диагностика ВИЧ
- Экспертная (окончательная) диагностика ВИЧ инфекции методом иммуноблотинга.
- Диагностика ВИЧ инфекции с использованием метода ПЦР. Выявление провирусной ДНК ВИЧ-1, выявление и количественное определение РНК ВИЧ



# ЗАДАЧИ ЛАБОРАТОРИИ

- Выявление генетических полиморфизмов, ассоциированных с ответом на лекарственную терапию (аллель 5701 локуса В главного комплекса гистосовместимости). Выявление мутаций устойчивости к лекарственным препаратам при секвенировании.
- Лабораторная диагностика оппортунистических инфекций методами ИФА и ПЦР.
- Лабораторная диагностика вирусных гепатитов В, С, D методом ИФА, ПЦР (выявление, количественное определение, генотипирование, определение однонуклеотидных полиморфизмов SNP rs8099917 и rs12979860 в гене интерлейкина-28В).

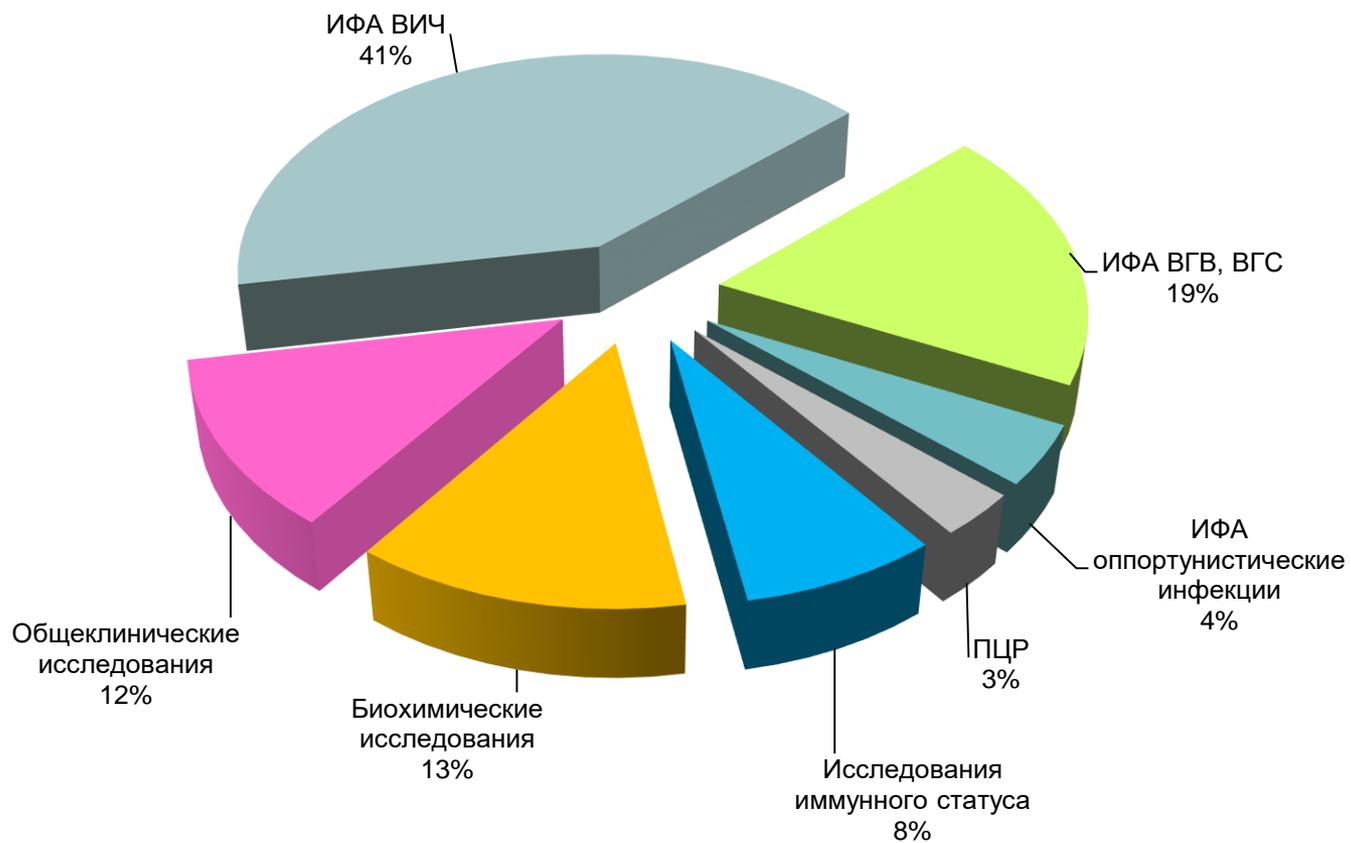


# ЗАДАЧИ ЛАБОРАТОРИИ

- Исследования иммунного статуса с целью оценки клеточного (проточная лазерная цитометрия) и гуморального иммунитета при иммунодефицитных состояниях инфекционной этиологии.
- Прогнозирование риска развития инфекционного заболевания, характера течения и исхода болезни, оценка эффективности проводимой терапии и ее контроль методом ПЦР, проточной цитометрии и клинико-диагностических показателей.
- Выполнение общеклинических и биохимических исследований.



# СТРУКТУРА ИССЛЕДОВАНИЙ



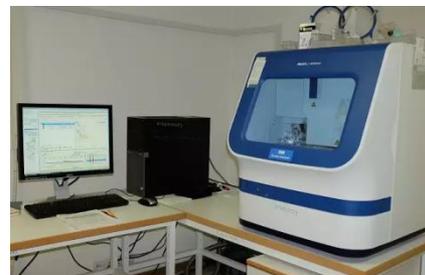
# ОСНОВНОЕ ТЕХНИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ

- Автоматический ИФА анализатор Freedom EVOlyser 150/8
- Автоматический анализатор Freedom EVO
- Проточный цитометр FACS Canto II BD
- Биохимический анализатор FURUNO CA 400



# ОСНОВНОЕ ТЕХНИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ

- Гематологический анализатор PENTRA 60
- Биологический микроскоп MT5300
- Амплификаторы Real Time ПЦР: Rotor Gene, IQ5, CFX
- Секвенатор Applied Biosystems 3500

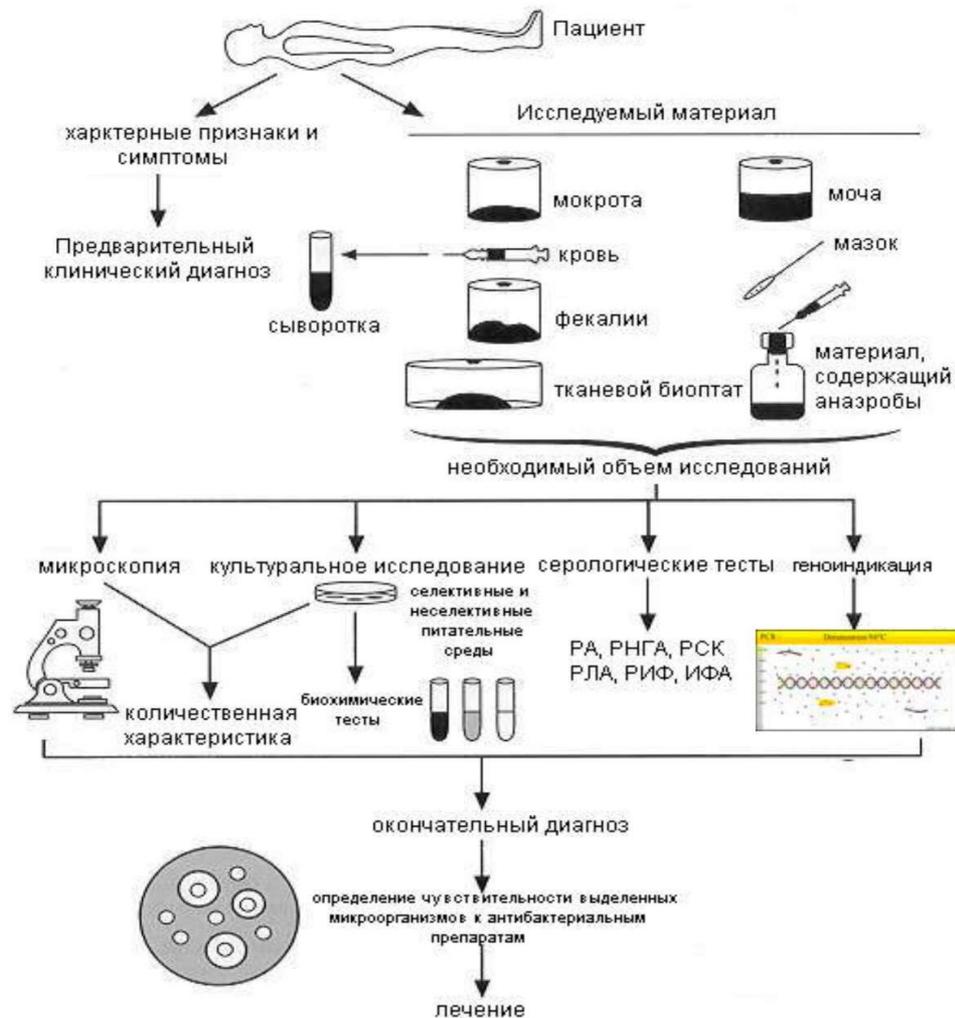


# СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ

- Этиологическая диагностика.
- Ускорение лабораторного цикла обследования пациентов.
- Изучение резистентности возбудителей к антивирусным препаратам.
- Молекулярный мониторинг распространения возбудителей.



# ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА



# ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ ПРИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

- Активный процесс или анамнестическая инфекция?
- Реинфекция или рецидив?
- Контроль излеченности?
- Целесообразность вакцинации?
- Эффективность поствакцинального иммунитета?
- Нейроинфекция?
- Врожденная инфицированность?

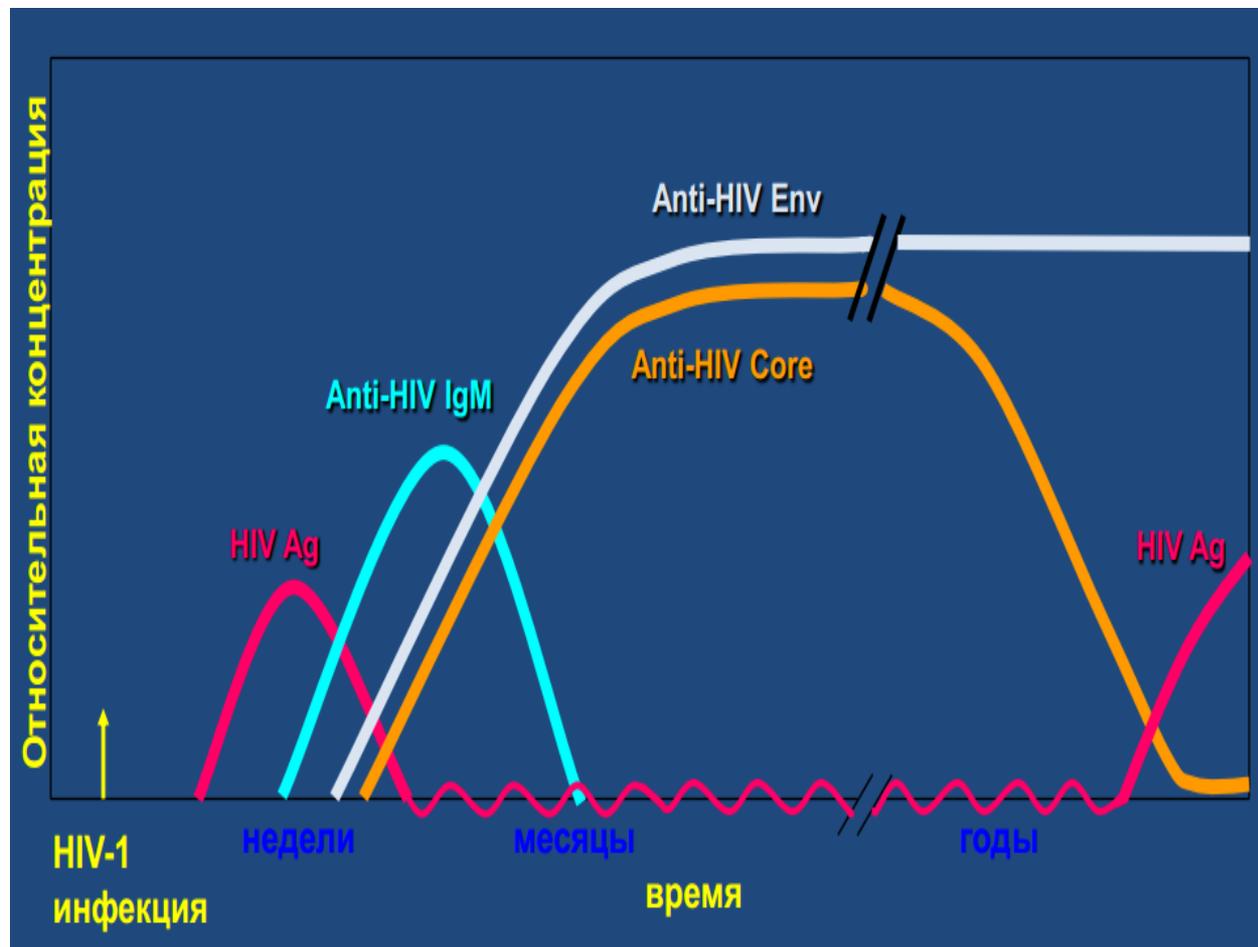


# ПОВЫШЕНИЕ ИНФОРМАТИВНОСТИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

- Использование диагностических препаратов с искусственными аналогами микробных антигенов
- Раздельное выявление классов и подклассов специфических иммуноглобулинов (IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)
- Изменение трактовки результатов серологического тестирования



# СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ HIV-1 ИНФЕКЦИИ ПРИМЕР ИНФОРМАТИВНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕКТРА АНТИТЕЛ



# ПРИМЕР РАСПОЛОЖЕНИЯ АНТИГЕНОВ В ИММУНОБЛОТИНГЕ

## НЬЮ ЛАВ-БЛОТ I и II

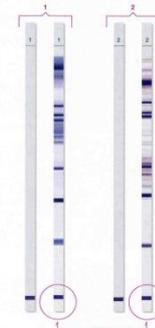
Наборы, предназначенные для выявления полного спектра анти-ВИЧ1 и анти-ВИЧ2 антител человека в сыворотке или плазме методом Вестерн-блота с целью подтверждения положительного скрининг-го ответа на наличие анти-ВИЧ антител и характеристики антигенной специфичности при диагностике СПИДа.

Учитывая серьезность диагноза, необходимо подтверждение или опровержение результатов скрининга другим методом.

Эксперты ВОЗ рекомендуют использовать иммуноблот – Вестерн Блот (Western Blot).

Этот метод позволяет охарактеризовывать антитела против каждого белка вируса, и, следовательно, подтвердить серопозитивность или выявить возможные неспецифические реакции.

Наборы НЬЮ ЛАВ-БЛОТ1 и НЬЮ ЛАВ-БЛОТ2 содержат полный комплект реагентов необходимых для выполнения теста



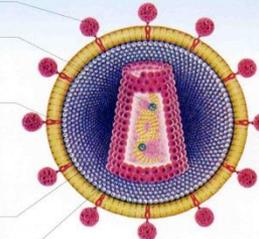
НЬЮ ЛАВ-БЛОТ – полоса внутреннего контроля

Для изготовления блота используется лизат вирусной культуры

<b>ENV</b>	Предшественник GP120 и GP160
<b>ENV</b>	Гликопротеин оболочки
<b>POL</b>	Обратная транскриптаза
<b>GAG</b>	Предшественник ядерных белков
<b>POL</b>	Протеаза
<b>ENV</b>	Трансмембранный гликопротеин
<b>GAG</b>	Предшественник ядерных белков
<b>POL</b>	Эндонуклеаза
<b>GAG</b>	Ядерный белок
<b>GAG</b>	Ядерный белок

GP160  
GP120  
P68  
P55  
P52  
GP41  
P40  
P34  
P24  
P18

Представлены **все** антигены вируса  
Характеризует присутствие антител против **каждого** белка вируса



# УСКОРЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО ЦИКЛА ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ

- Рациональная организация лабораторного диагностического процесса
- Использование методов экспресс диагностики
- Компьютеризация



# ИЗУЧЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ К АНТИВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ

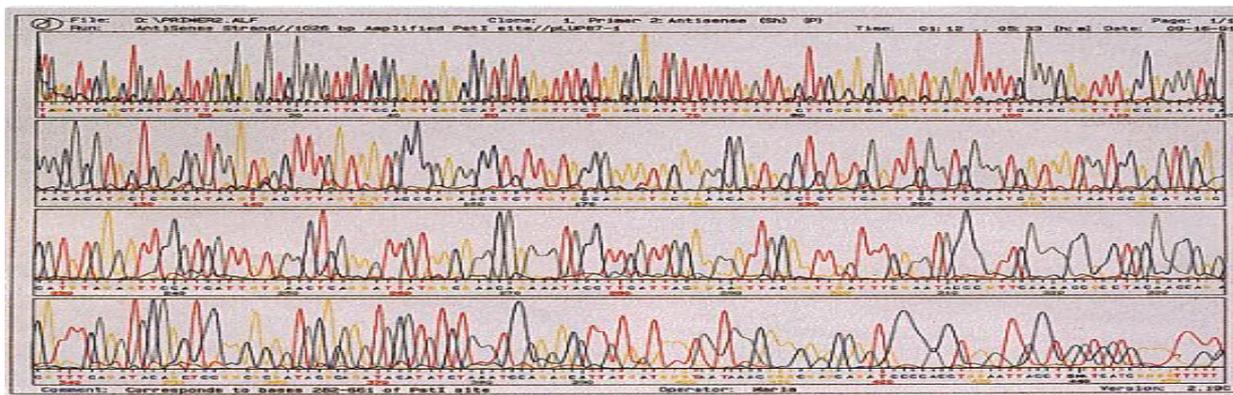
Виды резистентности:

- Фенотипическая резистентность - способность реплицироваться при высоких концентрациях противовирусных препаратов.
- Генотипическая резистентность – наличие в геноме мутаций, вызывающих устойчивость к препаратам. Она выражается в изменении нуклеотидной последовательности гена, кодирующего вирусный белок, являющийся мишенью действия препаратов.



# МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ, ПРИВОДЯЩИХ К РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Секвенирование - общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК. В основе этих технологий находятся различные стратегии, основанные на уникальных комбинациях приготовления ДНК-матриц, секвенирования, визуализации, а также выравнивания и составления последовательностей (sequences или "сиквенсов") ДНК. Секвенирование ДНК позволяет получить информацию о всех нуклеотидных заменах в выбранном фрагменте генома ВИЧ.



# МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МОНИТОРИНГ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

- Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) хромосомной и плазмидной ДНК
- Саузерн-блоттинг
- Пульс-электрофорез
- ДНК- секвенирование

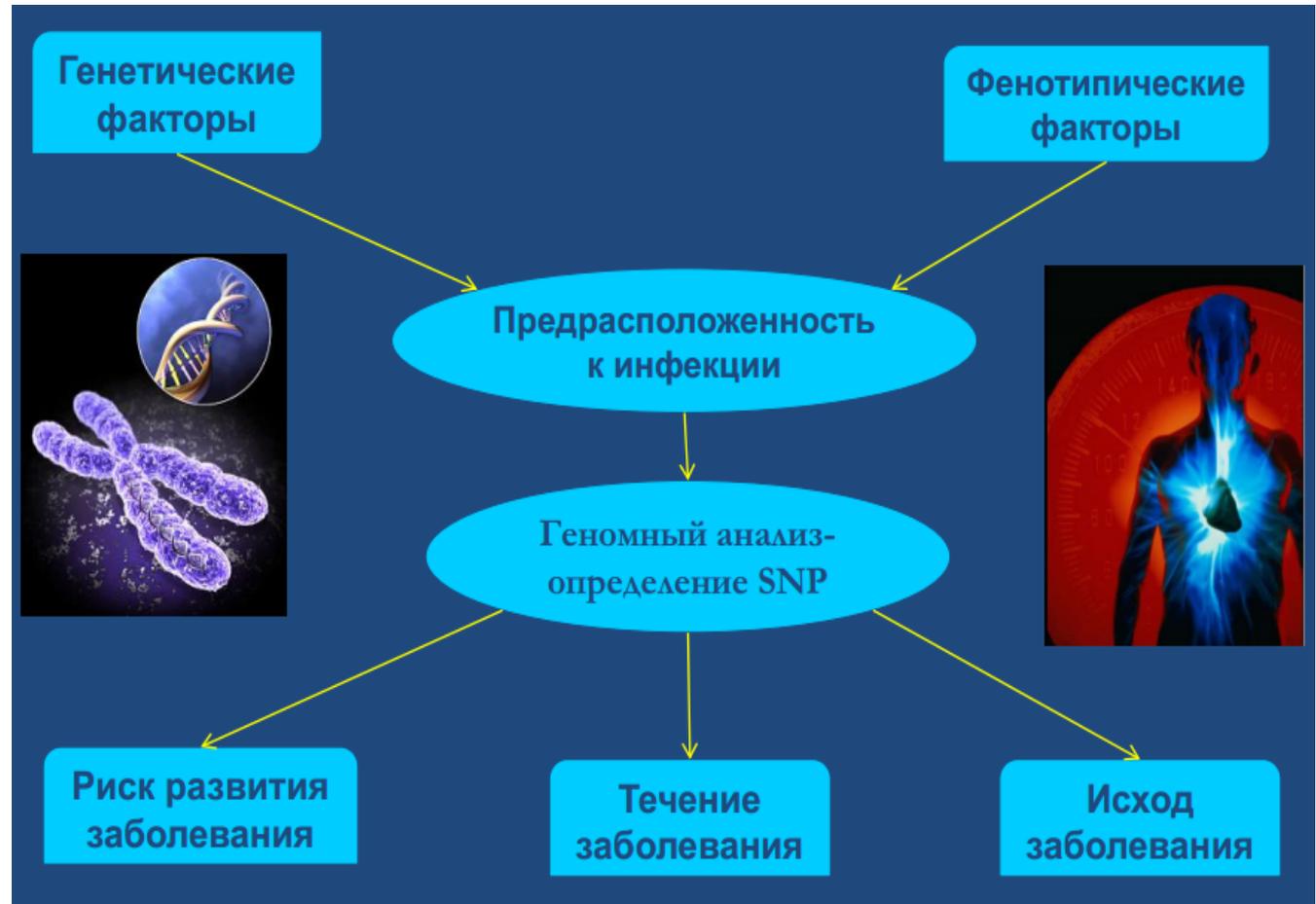


## ПЕРСПЕКТИВЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕТОДОВ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

- Использование аптамерных и пептидных лигандов. Аптамеры-небольшие молекулы нуклеиновых кислот, которые могут выполнять функции высокоспецифических рецепторов низкомолекулярных соединений. Могут заменить моноклональные АТ в ИФА, Вестерн-Блоте, при флюоресцентной гибридизации. Создание чипов со множеством аптамеров с одновременной детекцией множества белков.



# АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА В ПРОФИЛАКТИКЕ И ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ



# ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

- Клеточно-опосредованная детекция
- Химическая детекция
- Физическая детекция (поверхностные плазмон резонансные биосенсоры). При контакте с биообъектами(вирусы, ДНК, АТ) плазмонные эффекты на порядок увеличивают сигналы флюоресценции  
Плазмон-квант колебания плотности плазмы и плазмы твердого тела , сопровождающиеся продольными колебаниями электрического поля

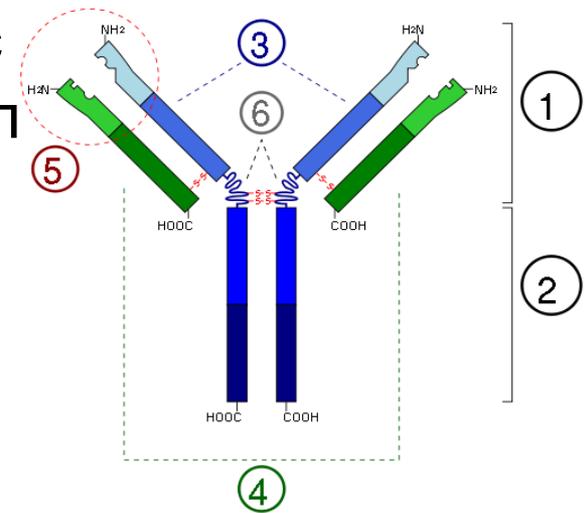


# ПЕРСПЕКТИВЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕТОДОВ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

- Использование наборов с Fab-фрагментами антител при конструировании биосенсоров(биочипов).

Схема биосенсора:

биоселектирующая мембрана (ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты)- преобразователь сигнала в электрический сигнал.



- 1-Fab-участок,
- 2-Fc-участок,
- 3-тяжелая цепь,
- 4- легкая цепь,
- 5- антиген-связывающийся участок,
- 6-шарнир.



## ПЕРСПЕКТИВЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕТОДОВ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Протеомные (биоаналитические) технологии - изучение белков и их взаимодействия в живых организмах. Протеомика позволяет разделить и визуализировать большую часть клеточных белков с количественными характеристиками. Методы протеомного анализа - хроматография, электрофорез в комбинации с масс-спектрометрическими методами. Детекцию проводят с использованием биомолекулярных детекторов (атомно-силовые микроскопы, нанопроводные детекторы, нанопоры...)



