### Иммунохроматографический анализ

В современной медицинской практике с каждым годом возрастает роль лабораторной диагностики как основного инструмента постановки диагноза и мониторинга терапии. Одним из бурно развивающихся и востребованных методов лабораторной диагностики является иммунохроматографический анализ.

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ (ИХА) - это метод определения наличия определенных концентраций веществ в биологических материалах (моча, цельная кровь, сыворотка или плазма крови, слюна, кал и т.д.). Данный вид анализа осуществляется при помощи индикаторных полосок, палочек, панелей или тест-кассет, которые обеспечивают быстроту проведения тестирования. ИХА - сравнительно молодой метод анализа, он часто обозначается в литературе также как метод сухой иммунохимии, стрип-тест, QuikStrip cassette, QuikStrip dipstick, экспресс-тест или экспресс-анализ. Эти названия связаны с быстротой проведения этого метода анализа.

Принцип действия иммунохроматографического теста состоит в том, что при погружении теста в физиологическую жидкость она начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии. Подвижной фазой в данном случае является физиологическая жидкость. Вместе с жидкостью движутся и антитела с красителем. Если в этой жидкости присутствует исследуемый антиген (гормон, инфекционный или онкологический маркер), то происходит его связывание, как с первым, так и со вторым типом антител, что является уже иммунологическим методом анализа. При этом происходит накопление антител с красителем вокруг антител, жестко иммобилизованных в тест-зоне ИХА-полоски, что проявляется в виде яркой темной полосы. Несвязавшиеся антитела с красителем мигрируют далее вдоль полоски и неизбежно взаимодействуют со вторичными антителами в контрольной зоне, где и наблюдается вторая темная полоса. Взаимодействие (и темная полоса) в контрольной зоне должны проявляться всегда (если анализ проведен правильно), независимо от присутствия исследуемого антигена в физиологической жидкости (см.рис.1). Результаты определяются визуально или компьютерной обработкой отсканированного изображения.

Иммунологический метод анализа основан на реакции между антигеном и соответствующим ему антителом. Антиген - это вещество, которое чужеродное для организма человека и которое может запустить иммунную систему (защитную реакцию). Антитела - это белки, которые выделяются клетками нашего организма при внедрении в него антигена. Метод имунной хроматографии основан на особенном свойстве антител связываться с антигеном специфическим (то есть избирательным) образом. Это означает, что каждое антитело узнает и связывается только с определенным антигеном. На этой уникальной особенности антител и основаны все иммунологические методы анализа в том числе и ИХА. Причем определяемым “антигеном” в данном методе анализа может служить и определяемое в биоматериале антитело к инфекционному агенту или аутоантитело, тогда остальные используемые в тесте антитела будут являться антиантителами. В ИХА- тестах используется три типа антител.

1. Растворимые моноклональные антитела к исследуемому антигену или антителу, конъюгированные ("сшитые") с коллоидным золотом - красителем, который можно легко идентифицировать даже в самых малых концентрациях. Эти антитела нанесены вблизи участка погружения тест-полоски в физиологическую жидкость (мочу, кровь).
2. Поликлональные антитела к исследуемому антигену или антителу, жестко иммобилизованные в тест-зоне полоски.
3. Вторичные антитела к моноклональным антителам, жестко иммобилизованные в контрольной зоне тест-полоски.

Принцип работы тестов на наркотики несколько отличается от других тест-систем. Устройство ИХА-полоски отличается тем, что в тест-зоне иммобилизованы искусственные антигены, способные специфически связываться со свободными антителами. Если исследуемый антиген (наркотик) НЕ присутствует в физиологической жидкости, участки связывания антител (эпитопы) остаются свободными, и они способны связываться с искусственными антигенами в тест-зоне, образуя темную полосу за счет конъюгированного красителя. Соответственно если исследуемый антиген присутстствует в жидкости, то антитела, связавшись с ним, уже не могут взаимодействовать с антигенами в тест-зоне и образования темной полосы там не происходит. Но в обоих случаях (если анализ проведен правильно) происходит связывание "окрашенных" антител со вторичными антителами в контрольной зоне и образование там темной полосы. Возможные варианты при проведении анализа: одна полоса - положительный результат, две полосы - отрицательный результат, нет полос - анализ проведен неправильно.

Основными преимуществами использования иммунохроматографических тест полосок являются:

* 1. Простота и удобство - позволяет получить результат (анализ и первичное представление о причине заболевания) без оборудования и специальных навыков
  2. Надежность - достоверность тестов достигает 92-99,8%, при этом каждый тест имеет встроенный внутренний контроль
  3. Экономичность - минимальные затраты на приобретение теста и экономия времени на проведение обследования. В рознице стоимость одного ИФА-исследования в 5-10 раз дороже ИХА и получение результата минимум на следующий день
  4. Анонимность - что особенно важно при выявлении заболеваний, передаваемых половым путем, других инфекционных заболеваний, а также выявлении фактов употребления наркотических веществ
  5. Независимость - не требует предварительной медицинской консультации и рецепта врача

Являясь эффективным средством диагностирования, экспресс-тесты позволяют визуально в течение нескольких минут определить и оценить содержание антигенов, антител, гормонов и других диагностически важных веществ в организме человека. Экспресс-тесты отличаются высокой степенью чувствительности и точности, обнаруживая более 100 видов заболеваний, включающих такие распространённые болезни как туберкулёз, сифилис, гонорею, хламидиоз, различные виды вирусных гепатитов, и др., а также всю гамму применяемых наркотических веществ при высокой достоверности определения. Важным преимуществом данного вида тестов является их применение в диагностике in vitro, не требующей непосредственного присутствия обследуемого пациента.

Однако иммунохроматографические тест-полоски не лишены недостатков. Касается это надежности, чувствительности и экономичности тестов. Надежность и чувствительность зависит, во-первых, от качества используемых в тесте моноклональных антител и, во-вторых, от концентрации антигена в биоматериале. Качество моноклональных антител зависит от способов их получения, очистки и фиксации на носителе. Концентрация антигена – от стадии заболевания и количества биоматериала. Количество биоматериала особенно важно при использовании цельной крови. При этом существенную роль играет гематокрит, т.е. соотношение плазмы и форменных элементов. При высоком гематокрите снижается количество плазмы с антигеном, мигрирующей вдоль полоски. Температура, от которой зависит скорость взаимодействие антитела с антигеном, важна только для времени постановки теста. Понятно, что использовать полоски при температуре ниже точки замерзания воды, составляющей основную часть биоматериала, не имеет смысла.

Вызывает большие сомнения экономичность использования экспресс-тестов в бюджетных медицинских организациях, которые занимаются массовой диспансеризацией населения и которым как раз-то удобны и необходимы комплексные стрип-системы из тест-полосок для скринингового выявления различных заболеваний. Обусловлено это низкой стоимостью анализа по бюджетным расценкам. При этом себестоимость тест-полоски в некоторых случаях в 10 раз превосходит оплату анализа.

Список литературы.

1. Wennig R, Moeller MR, Haguenoer JM et al. (1998) Development and evaluation of immunochromatographic rapid tests for screening of cannabinoids, cocaine, and opiates in urine // J. Anal. Toxicol. - V.22 - P.148-155
2. Coons, S.J. A look at the purchase and use of home pregnancy-test kits. Am.Pharm. NS29:46-48, 1989.
3. Bastian, L.A., Nanda, K., Hasselblad, V., and Simel, D.L. Diagnostic efficiency of home pregnancy test kits. A meta-analysis. Arch.Fam.Med. 7:465-469, 1998.
4. Latman, N.S. and Bruot, B.C. Evaluation of home pregnancy test kits. Biomed.Instrum.Technol. 23:144-149, 1989.
5. Hicks, J.M. and Iosefsohn, M. Reliability of home pregnancy-test kits in the hands of laypersons [letter] [published erratum appears in N Engl J Med 1989 Jul 20;321(3):193] [see comments]. N.Engl.J.Med. 320:320-321, 1989.
6. Torlesse, H., Wurie, I.M., and Hodges, M. The use of immunochromatography test cards in the diagnosis of hepatitis B surface antigen among pregnant women in West Africa. Br.J.Biomed.Sci. 54:256-259, 1997.
7. Sato, K., Ichiyama, S., Iinuma, Y., Nada, T., Shimokata, K., and Nakashima, N. Evaluation of immunochromatographic assay systems for rapid detection of hepatitis B surface antigen and antibody, Dainascreen HBsAg and Dainascreen Ausab. J.Clin.Microbiol. 34:1420-1422, 1996.
8. Lein, M., Jung, K., Schnorr, D., Henke, W., Brux, B., and Loening, S.A. Rapid screening of PSA: evaluation of an immunochemical membrane strip test [letter]. Clin.Chem. 41:1545-1547, 1995.
9. Anderson, J.C., Cheng, E., Roeske, M., Marchildon, P., Peacock, J., and Shaw, R.D. Detection of serum antibodies to Helicobacter pylori by an immunochromatographic method. Am.J.Gastroenterol. 92:1135-1139, 1997.
10. Schrier, W.H., Schoengold, R.J., Baker, J.T., Norell, J.L., Jaseph, C.L., Okin, Y., Doe, J.Y., and Chandler, H. Development of FlexSure HP--an immunochromatographic method to detect antibodies against Helicobacter pylori. Clin.Chem. 44:293-298, 1998.
11. Cognein, P., Costa, A., and Giacosa, A. Serodiagnosis of Helicobacter pylori: evaluation of a rapid, miniaturized immunochromatographic test. Eur.J.Cancer.Prev. 3:457-463, 1994.
12. Shirin, H., Bruck, R., Kenet, G., Krepel, Z., Wardi, Y., Reif, S., Zaidel, L., Geva, D., Avni, Y., and Halpern, Z. Evaluation of a new immunochromatographic test for Helicobacter pylori IgG antibodies in elderly symptomatic patients [see comments]. J.Gastroenterol. 34:7-10, 1999.
13. Kagen, L. J. 1973 Myoglobin: Biochemical, physiological and clinical aspects. New York and London Colombian University Press.
14. Drexel, H. et al. 1983 Myoglobinaemia in the early diagnosis of acute myocradial infarction. Am. Heart J. 105: 642-651.
15. McComb, J. M. et al. 1983 Myoglobin in the very early phase of acute myocardial infaretion. Ann Clin. Biochem, 22:152-155.
16. Grenardier, E., Keidar, S., Kahana, L., Alpan, G., Marmur, A., Palant, A. 1983 The roles of serum myoclobin, total CPK, and CK-MB isoenzyme in the acute phase of myocardial infarction. Am. Heart J. 105:408-416.
17. Ellis A. K., Saran, B.R. 1989 Kinetics of myoolobin release and prediction of myocardial myoglobin depletion after coronary artery reperfusion. Circulation 80: 676-682.
18. McComb, J.M. et al. 1984 Myoglobin and creatine kinase in acute myocardial infarction. Br. Heart J. 51:189-194.
19. Struyf, F., Lemmens, A., Valadas, E., Verhaegen, J., and Van Ranst, M. Usefulness of immunochromatographic detection of antibodies to Mycobacterium tuberculosis as an adjunct to auramine staining for rapid diagnosis of tuberculosis in a low-prevalence setting. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 18:740-742, 1999.
20. Abe, C., Hirano, K., and Tomiyama, T. Simple and rapid identification of the Mycobacterium tuberculosis complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J.Clin.Microbiol. 37:3693-3697, 1999.
21. Edmund C. Tramont. Traponema pallidum (Syphilis). In Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of infectious Diseases. G.L. Mandell, J.E. Bennett, P. Dolin, eds. Churchill Livingston New York, 1995.
22. Steven J. Norris and Sandra A larsen, Traponema and Other Host-Associated Spirochemetes in Manual of Clinical Microbiology. P. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Yoken, eds, ASM Press , Washington D.C. 1995.
23. Larsen, S.A., E.F. Hunter, & S.J. Draus (ed.) 1990. A Manual of Tests for Syphilis, 8th ed. American Public Health Association, Washington D.C.