

Современные методы лабораторной иммунодиагностики фитопатогенов картофеля

Владимир Карандашов

ООО «Независимая диагностическая лаборатория»

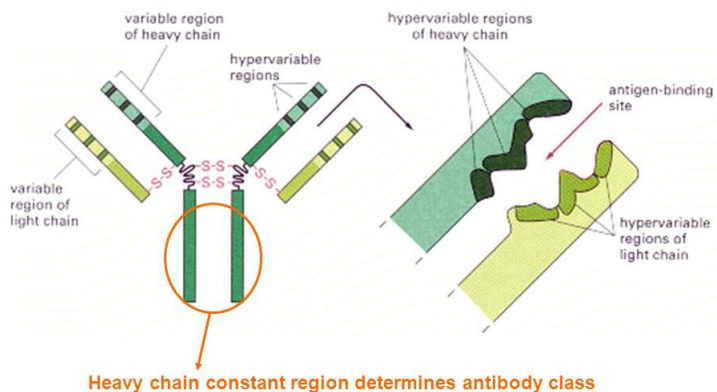
Иммуноферментный анализ

В основе анализа лежит иммунологическая высокоспецифичная реакция антиген-антитело

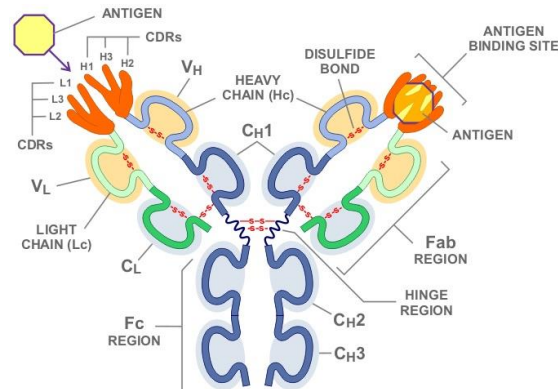
Антитела вырабатываются в организме на внедрение любого чужеродного объекта - антигена

Антигенами могут быть молекулы, вирусы, бактерии и проч. микроорганизмы, механические частицы и т.п.

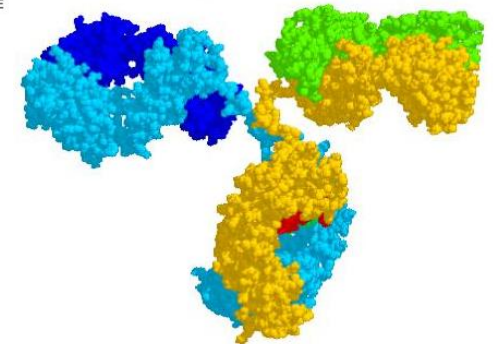
Антитело распознаёт уникальный участок (эпитоп) антигена



Molecular Biology of the Cell. 4th Edition

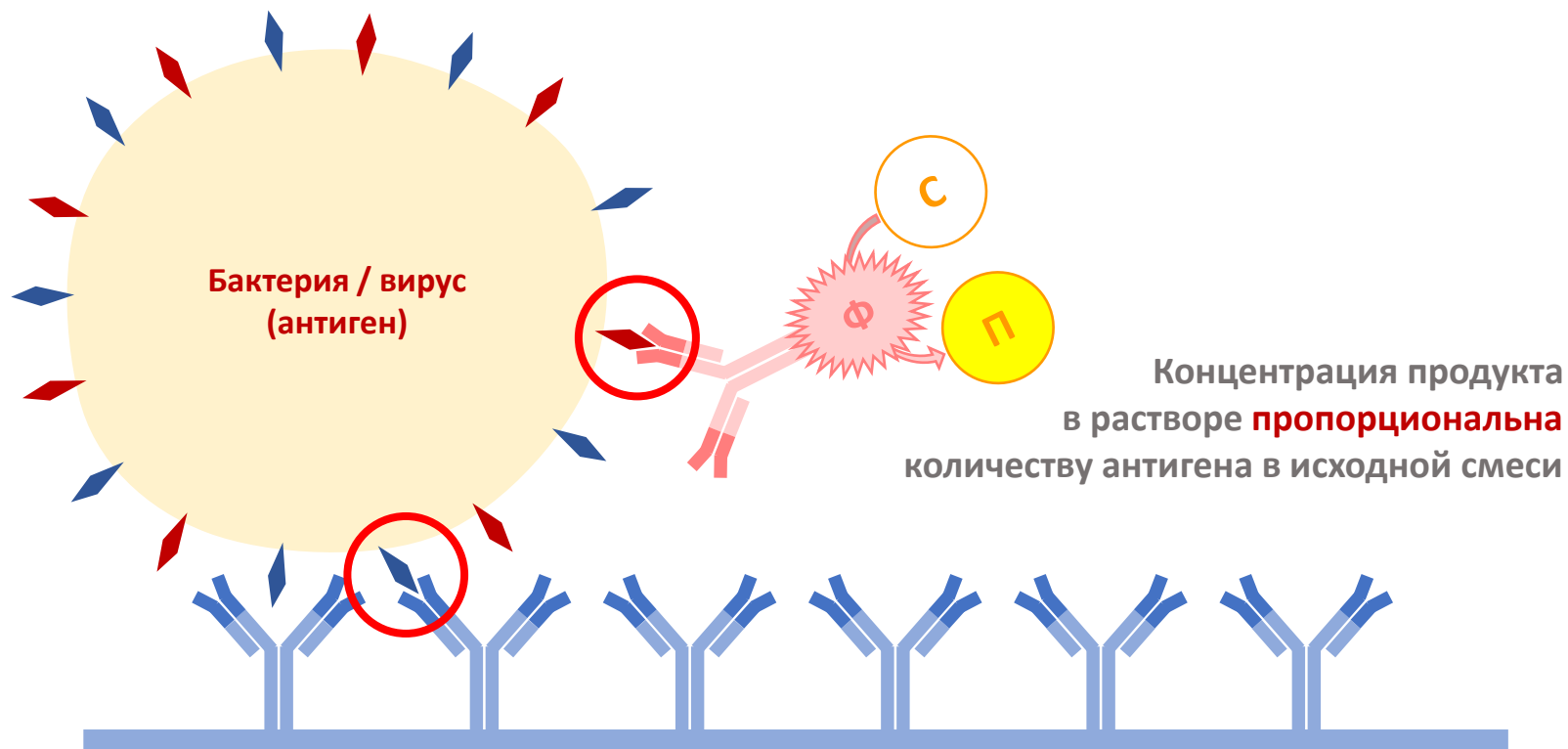


<https://teaching.ncl.ac.uk/bms/wiki/index.php/Antibody>



<http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idi nformationmodule=1081367867&topicorder=5&maxto=8>

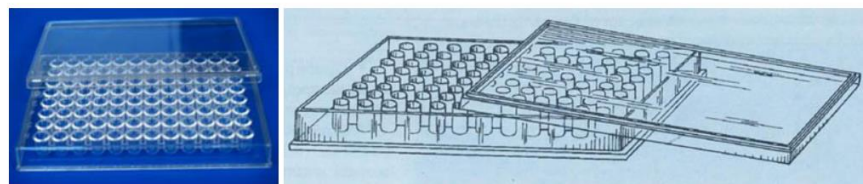
Схема проведения ИФА



ИФА. Влияние планшета



Планшет полистироловый с крышкой для иммуноферментного анализа однократного применения (96 лунок с плоским дном), нестерильный

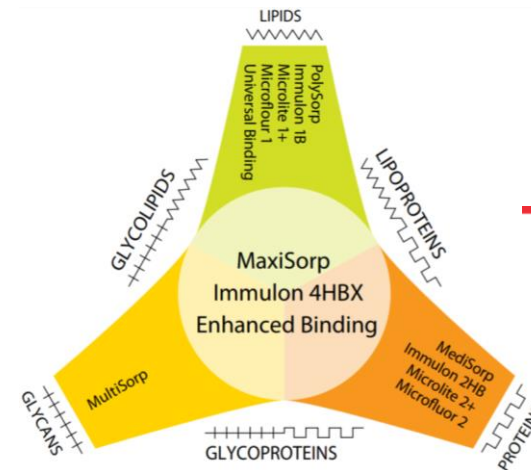


Назначение:

Предназначен для иммуноферментных анализов в клинично-диагностических лабораториях различных медицинских учреждений.

Техническое описание:

Планшет состоит из корпуса и крышки, изготовленных из прозрачного полимера, не выделяющего в исследуемую среду токсичных ингредиентов. Для удобства отсчета лунок на лицевой поверхности нанесены по горизонтали цифры, по вертикали латинские буквы.



ThermoFisher
SCIENTIFIC

Immuno Assay (Passive Adsorption)			
Surface	Hydrophilicity	Binding Preference	Applications
PolySorp	–	Lipids, lipoproteins, large proteins	ELISA
MediSorp	+	Medium to large proteins, immunoglobulins, albumins	ELISA
MaxiSorp	++	Small to large proteins, immunoglobulins, albumins, LPS, phosphoproteins, glycoproteins	ELISA
MultiSorp	+++	Glycoproteins, polar lipids, phospholipids, cardiolipids	ELISA

<http://www.medp.spb.ru/production/catalog/lab/immunof.htm>

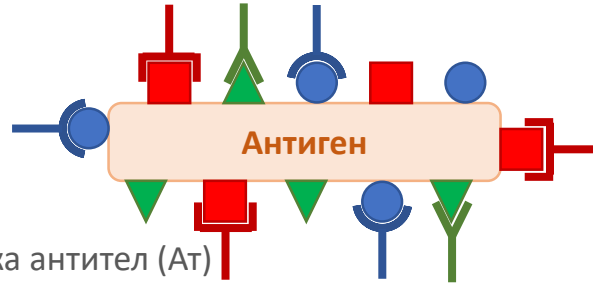
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D10948.pdf>

ИФА. Моно- и поликлональные антитела

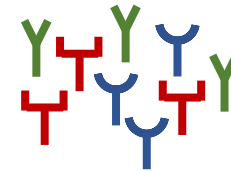
Введение в животное **очищенного** препарата антигена (Ag)

Мышь
Крыса
Кролик
Коза

Выработка антител (Ат) в ответ на инфекцию

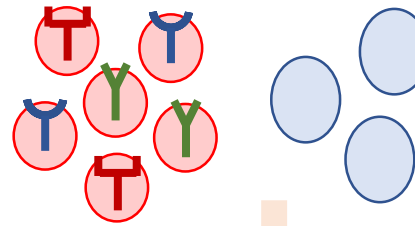


Отбор плазмы

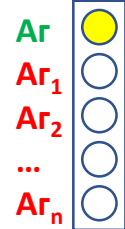


Выделение и очистка Ат
Проверка специфичности

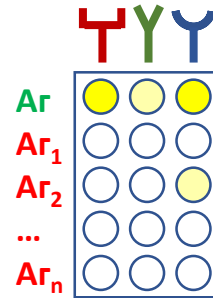
Выделение клеток селезёнки



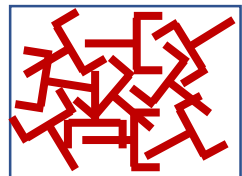
Слияние с раковыми клетками = гибридома



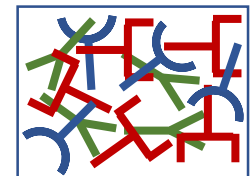
Производство Ат



Проверка специфичности



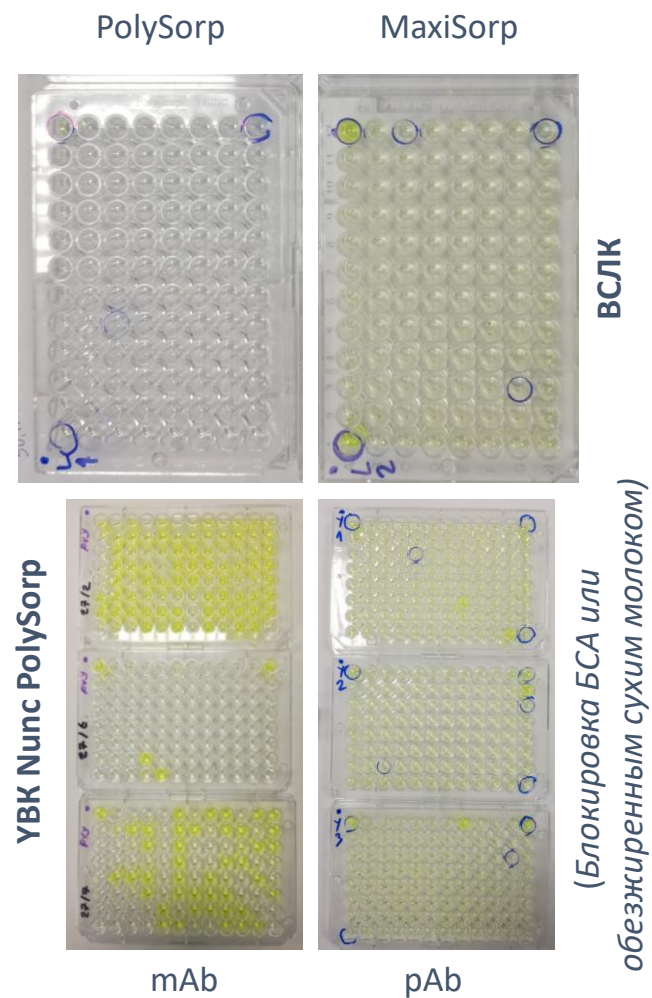
Моноклональные Ат



Поликлональные Ат

Поликлональные антитела	Моноклональные антитела
Проще, быстрее и дешевле в производстве	Сложнее, медленнее и дороже в производстве
Смесь разнородных антител	Смесь антител одного типа
Разница между партиями	Постоянное качество
Распознают множественные эпитопы одного антигена	Распознаёт один эпитоп антигена
Несколько антител на один антиген	Одно антитело на один антиген
Более толерантны к изменениям антигена	Более чувствительны к малейшим изменениям антигена
Возможны кросс-реактивность и неспецифичные антитела	Очень высокая специфичность
Повышенный фон	Нет или низкий фон

При анализе гетерогенной популяции антигенов используется коктейль моноклональных антител



Анализ патогенов картофеля: ИФА или ПЦР

Критерий	ИФА	ПЦР
ГОСТ 33996-2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества		
5.1.11	ИМ, ПП-1, ССЭ (ХВК, СВК, МВК, УВК, ВСЛК, чёрная ножка)	ИМ, ПП-1, ССЭ (ХВК, СВК, МВК, УВК, ВСЛК, чёрная ножка)
7.3.1.1		ИМ (ВВКК, УВК, ВСЛК, чёрная ножка, кольцевая гниль)
7.3.2.1	ПП-1, ССЭ, СЭ, Э (ХВК, СВК, МВК, УВК, ВСЛК, чёрная ножка)	
Чувствительность	Ниже	Выше
Специфичность	Специфичность антител	Специфичность праймеров и зондов
Целевая молекула	Любая молекула, в основном белок	ДНК
Целостность объекта	Разрушение объекта не требуется	Полное разрушение объекта
Сроки проведения на клубне	Требуется проращивание	Рекомендуется проращивание

ИФА в диагностике бактериальных патогенов

Метод упомянут в ГОСТ 33996-2016 Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества

Заболевание	Возбудитель	Bioreba	Loewe	SASA DSMZ	Agdia	Creative Diagnostics	Prime Diagnostics WUR
Кольцевая гниль	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>		+		+	+	+
Бурая гниль	<i>Ralstonia solanacearum</i>	+	+		+	+	+
Чёрная ножка	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>		+		+	+	+
	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>						
	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>						
	<i>P. wasabiae</i>						
	<i>Dickeya dianthicola</i>		D.chr.?			+	+
	<i>D. solani</i>						
	Прочие <i>Dickeya</i> и <i>Pectobacterium</i>						

Ни одна компания в мире не предлагает антитела, охватывающий весь спектр бактерий, вызывающих заболевания, вызывающие симптомы чёрной ножки.

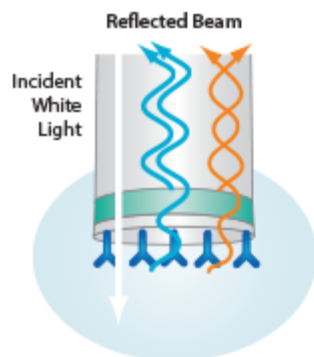
Как выполнить требования ГОСТ?

«ИФА» в режиме реального времени

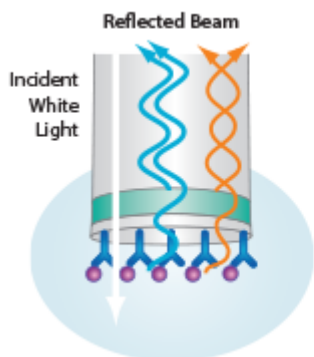
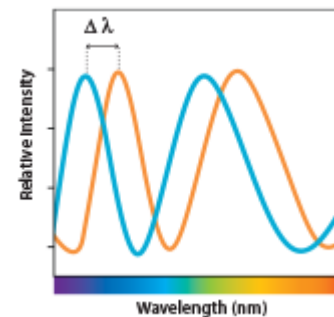
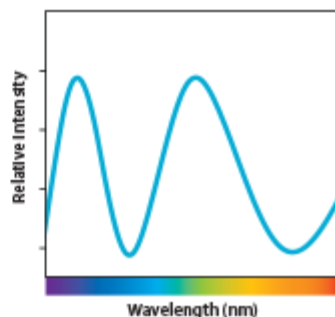


Octet® RED96 System

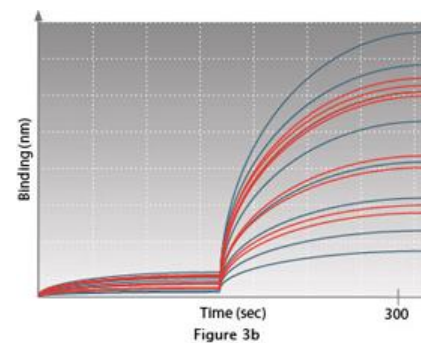
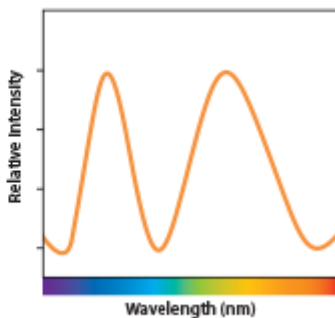
The Dip and Read™ ELISA Assay



BLI Signal Processing



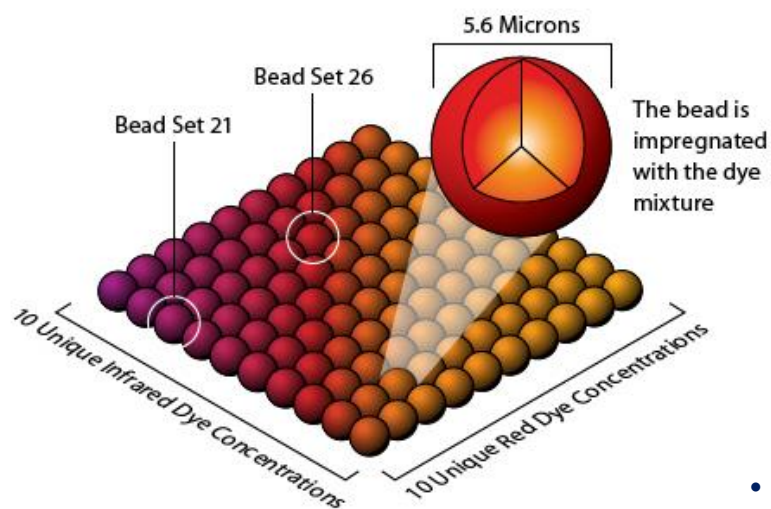
BLI Signal Processing



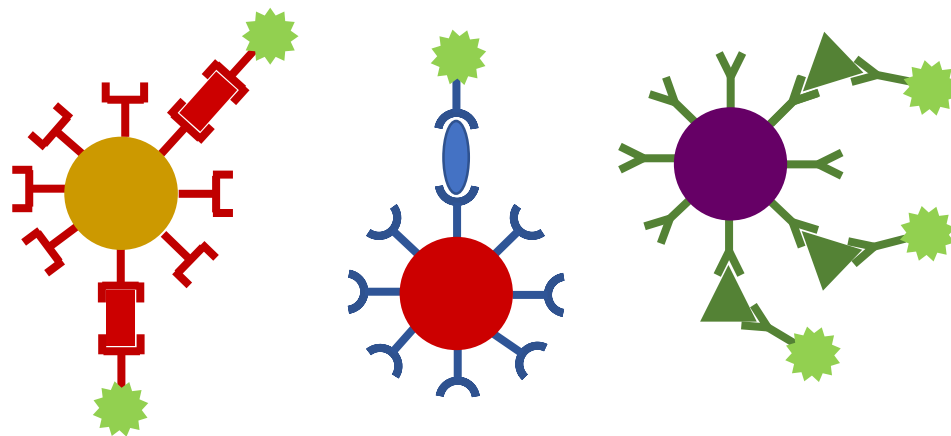
<https://www.fortebio.com/octet-elisa.html>

Мультиплексная технология xMAP

Luminex[®]
complexity simplified.



- 100 вариантов комбинаций красителей микросфер
- К каждому типу микросфер можно «пришить» свои антитела
- Определение до 100 антигенов в одном образце



- По флуоресценции красителя определяется наличие реакции
- Комбинация красителей микросферы показывает в какой паре антиген-антитело

<https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/luminex-multiplex-assays/procartaplex-immunoassays/procartaplex-custom-assays.html>

Иммунопреципитация с последующей ПЦР



Обогащение смеси антигеном

Удаление картофельного материала

Эффективность реакции определяется
качеством антител, праймеров и зондов

Спасибо за внимание!