

**Современная
иммунодиагностика
инфекционных заболеваний
Базовые
иммунодиагностические
методы для поиска
специфических антигенов и
антител**

**Лекция для студентов VI
курса МБФ 20_219 года**

**Лекция-
Храповой Н.П.**

Иммунодиагностические реакции - это реакции, основанные на феномене взаимодействия антител и антигенов, применяемые на этапах лабораторного анализа различных проб биологического материала и проб с объектов внешней среды.

Прочность связи между антителами и антигенами при образовании иммунного комплекса обусловлена пространственным соответствием активного центра антитела и эпитопа антигена (комплементарность антитела соответствующему антигену).

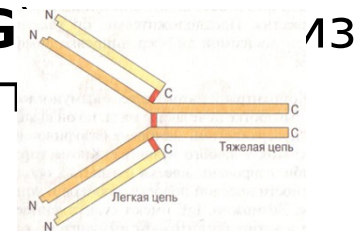
Антигены

- **Антиген** - вещество, стимулирующее любую форму адаптивного (приобретенного) иммунного ответа. Обычно в роли антигенов выступают чужеродные микроорганизмы или крупные молекулы (белки, полисахариды, ЛПС и др.) Антигенам присущи два важных свойства: антигенность и иммуногенность
- Основное условие антигенности – наличие поверхностных структур, генетически отличных от тканей организма-хозяина
- Иммуногенность – способность создавать защиту от инфицирующего микроорганизма

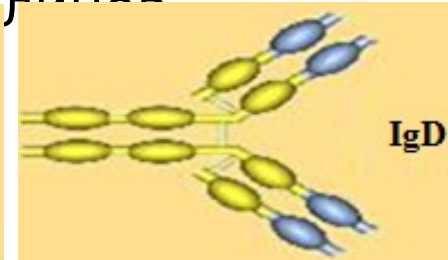
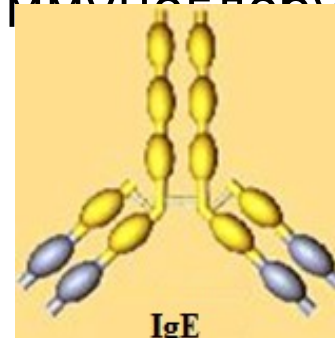
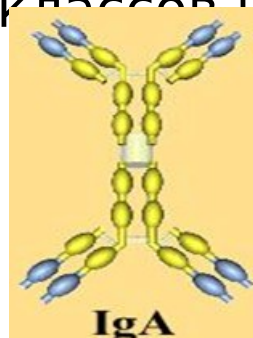
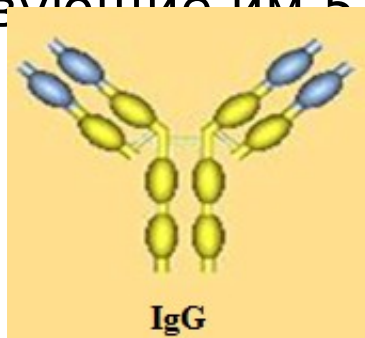
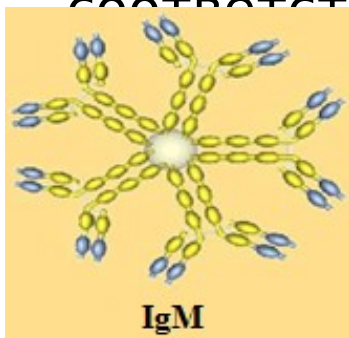
Антитела

- Иммуноглобулины (антитела) – глобулярные гликопротеиды сыворотки крови, обладающие защитными свойствами

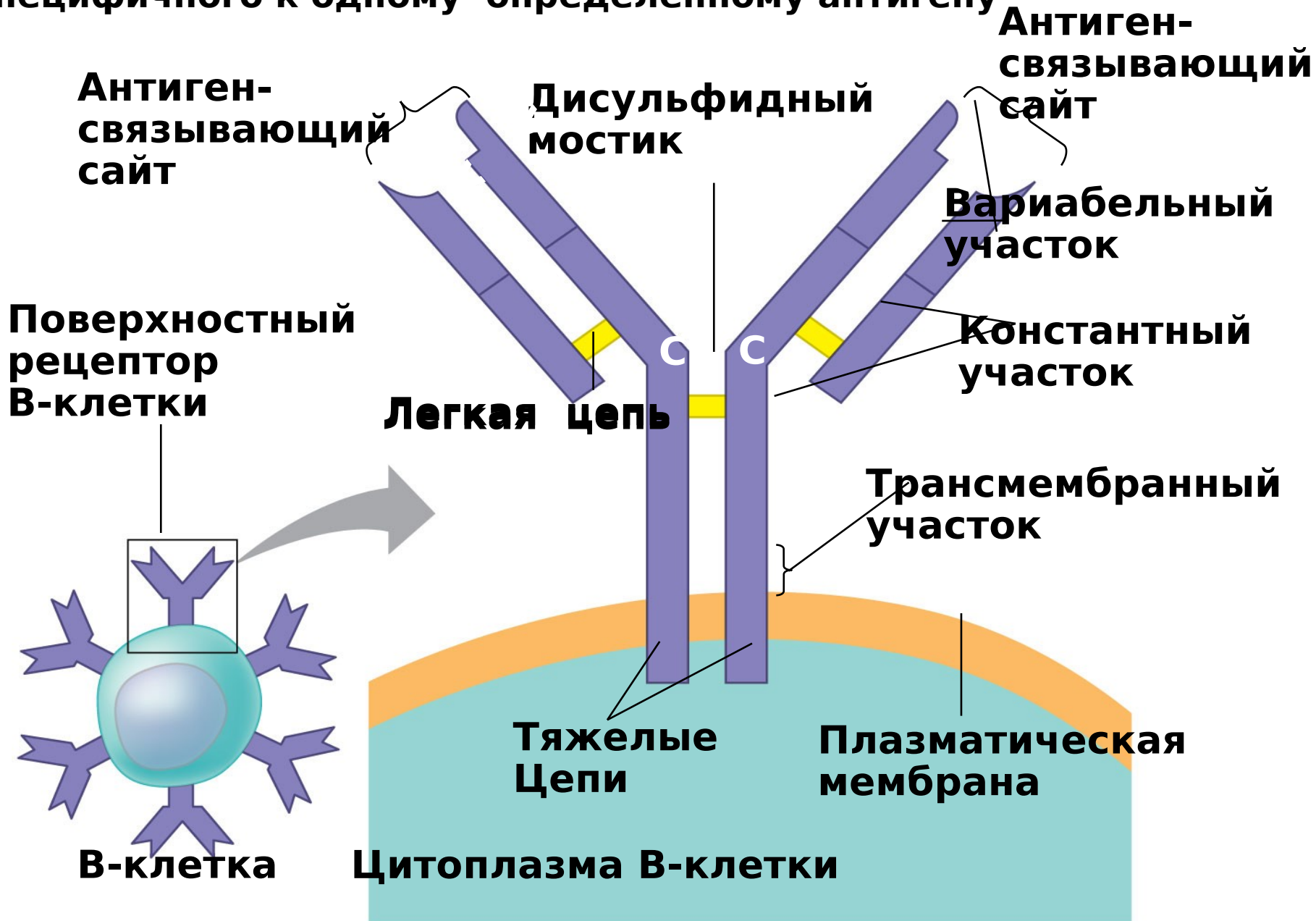
- Типичная молекула иммуноглобулина (**IgG**) двух легких L-цепей и двух тяжелых H-цепей



- Физические, антигенные и функциональные различия между константными областями определяют 5 основных классов тяжелых цепей (**M, G, A, E и D**) и соответствующие им 5 классов иммуноглобулинов



Структура поверхностного рецептора В-клетки, специфичного к одному определенному антигену



Иммунодиагностические реакции

Существует множество разновидностей иммунодиагностических реакций различного целевого назначения. Эти реакции высокоспецифичны и чувствительны, их широко используют в медицинской практике для решения следующих задач:

- ***поиска*** патогенного микроорганизма или его антигенов при наличии соответствующей диагностической сыворотки или антительного диагностикума в крови больного и других пробах биологического материала (мокрота, гной, моча, отделяемое респираторных путей, различные жидкости организма);
- ***обнаружения*** патогенных микроорганизмов в пробах из объектов внешней среды (вода, почва, воздух, смывы с различных поверхностей, останки павших животных и проч.);
- ***идентификации*** чистых культур микроорганизмов, выделенных из материала больного пациента и биопробного животного;
- ***определения*** в сыворотке крови больного пациента антител к возбудителю инфекции с помощью антигенного диагностикума с известными свойствами и подтверждения диагноза заболевания.

О целевом назначении иммунодиагностических тестов (продолжение)

- В соответствии с целевым назначением иммунодиагностические тесты разделены на две группы:
 - 1) реакции, предназначенные для поиска возбудителей опасных инфекционных заболеваний и их антигенов и
 - 2) реакции, предназначенные для поиска антител в сыворотках крови людей и животных
- Основные представители **первой группы** – **МФА** (прямой метод флуоресцирующих антител), **РНГА** (реакция непрямой гемагглютинации с антительным эритроцитарным диагностикумом, предназначенным для выявления антигенов в различных пробах), **ТИФМ** (твердофазный иммуноферментный метод), **РКоА** (реакция Ко-агглютинации), **РА** (реакция агглютинации) или **РЛА** (реакция латекс-агглютинации) и **ИХА** (иммунохроматографический анализ)
- Вторая группа представлена следующими основными иммунодиагностическими тестами для обнаружения антител: **РНГА** (реакция непрямой гемагглютинации с антигенным эритроцитарным диагностикумом), **ТИФМ** (непрямым вариантом твердофазного иммуноферментного метода), **Dot - вариант** иммуноферментного анализа и **РА** (реакция агглютинации)
- Помимо вышеназванных групп основных (базовых) иммунодиагностических реакций в ряде случаев используют дополнительные методы: различные варианты реакции иммунодиффузии в геле, иммуноэлектрофорез, иммуноблоттинг и проч. В большинстве случаев ими пользуются в хорошо оснащенных лабораториях

Роль иммунодиагностического тестирования в реализации тактики обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов

- В общей схеме лабораторного анализа различных проб, доставляемых в лабораторию, иммунодиагностическому тестированию отведена важная роль, особенно в первые часы от момента их поступления на исследование, которая еще больше возрастает, когда речь идет о возбудителях особо опасных инфекций.
- **Современная специфическая индикация** возбудителей особо опасных инфекций невозможна без иммунодиагностических средств и соответствующих им методов быстрого и достоверного обнаружения патогенов в различных объектах исследования.
- Тактика обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов предусматривает применение регламентированных иммунодиагностических методов и сертифицированных высокочувствительных и специфичных препаратов, тест-систем или диагностических иммуноглобулиновых реагентов высокой степени очистки. Общепринятые подходы к разработке и совершенствованию иммунодиагностических средств индикации патогенов базируются на использовании наиболее прогрессивных достижений биотехнологии, в частности на применении моноклональных антител заданной специфичности в качестве высокоэффективного сырья при изготовлении препаратов, применяемых для экспресс- и ускоренного обнаружения и последующей идентификации возбудителей опасных инфекционных заболеваний. В качестве наиболее перспективных направлений совершенствования лабораторной диагностики микроорганизмов I-II групп патогенности для человека в последние годы рассматривают

Принципы организации исследований в лабораториях различного уровня

- Проведение лабораторной диагностики особо опасных инфекционных заболеваний в учреждениях Роспотребнадзора строится на принципах:
 - *территориальной организации* обеспечения населения;
 - *многоуровневого строения*, взаимосвязи и взаимодействия учреждений Роспотребнадзора и аналогичных ведомств;
 - *дифференциации этапов, объема и методов исследования* материала в соответствии с уровнем организации лабораторного дела и соблюдением преемственности;
 - *единства и унификации методов* отбора и транспортирования материала, схем исследования и регламентированных методов диагностики;
 - *единства требований биологической безопасности* при отборе, хранении, транспортировании и исследовании материала, подозрительного на содержание патогенных микроорганизмов.
- На всей территории Российской Федерации действует **трехуровневая система лабораторной диагностики**

(продолжение)

- **На территориальном уровне** работу осуществляют лаборатории республиканских, краевых, областных, городских больниц, диагностических центров, центральных районных больниц, поликлиник, стационаров, а также лаборатории центров гигиены и эпидемиологии в городах и других территориях, их филиалов и обособленных структурных подразделений, в том числе на транспорте и лаборатории особо опасных инфекций центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации
- **На региональном уровне** – лаборатории Федерального центра гигиены и эпидемиологии, противочумных учреждений, НИИ эпидемиологического, микробиологического и вирусологического профиля Роспотребнадзора
- **На федеральном уровне** – лаборатории специализированных центров противочумных и других учреждений, выполняющих функции государственных коллекций микроорганизмов и головных учреждений Роспотребнадзора по инфекционным нозологиям.
- **Номенклатура и объем исследований определяются уровнем, оснащенностью, специализацией учреждения для работы с микроорганизмами I-IV групп патогенности.**
- *В Российской Федерации работа с патогенными для человека микроорганизмами регламентирована пакетом утвержденных Главным государственным санитарным врачом нормативных правовых актов*

Примерная номенклатура исследований в лабораториях территориального и регионального уровней

Нозологическая форма	ЛПУ		Филиалы ЦГиЭ		Центры гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ					Противочумные учреждения				
	Бактериологические	Иммуносерологические	Бактериологические	Иммуносерологические	Бактериологические	Микроскопические	Биологические	Иммуносерологические	Молекулярно-генетические	Бактериологические	Микроскопические	Биологические	Иммуносерологические	Молекулярно-генетические
Чума										+	+	+	+	+
Холера	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
Бруцеллез		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Туляремия		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сибирская язва					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лептоспироз					+	+		+		+	+		+	
Листериоз	+	+	+	+	+			+		+			+	
Ботулизм	+	+	+	+	+			+		+			+	
Легионеллез					+			+	+	+			+	+

Схема лабораторной диагностики

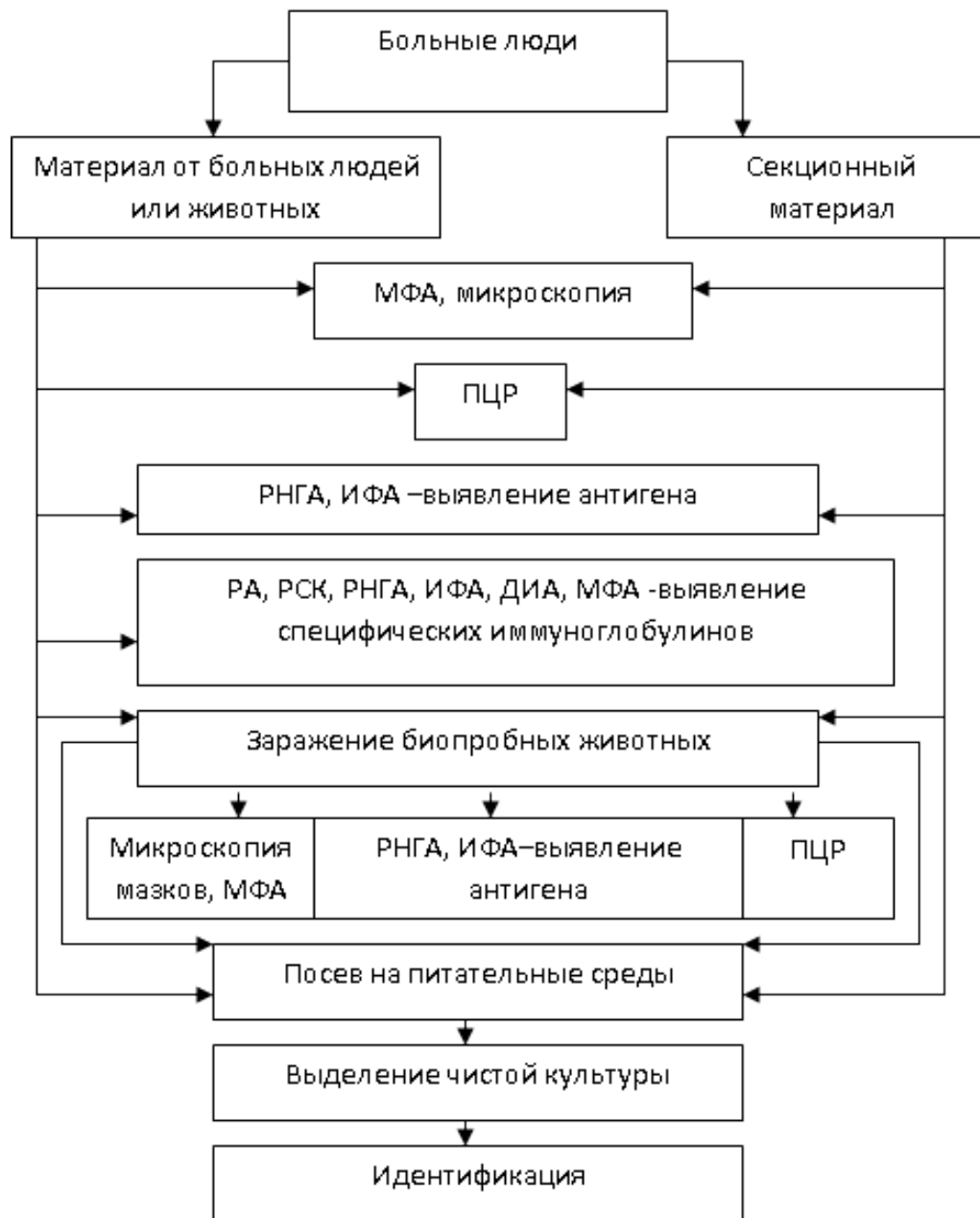
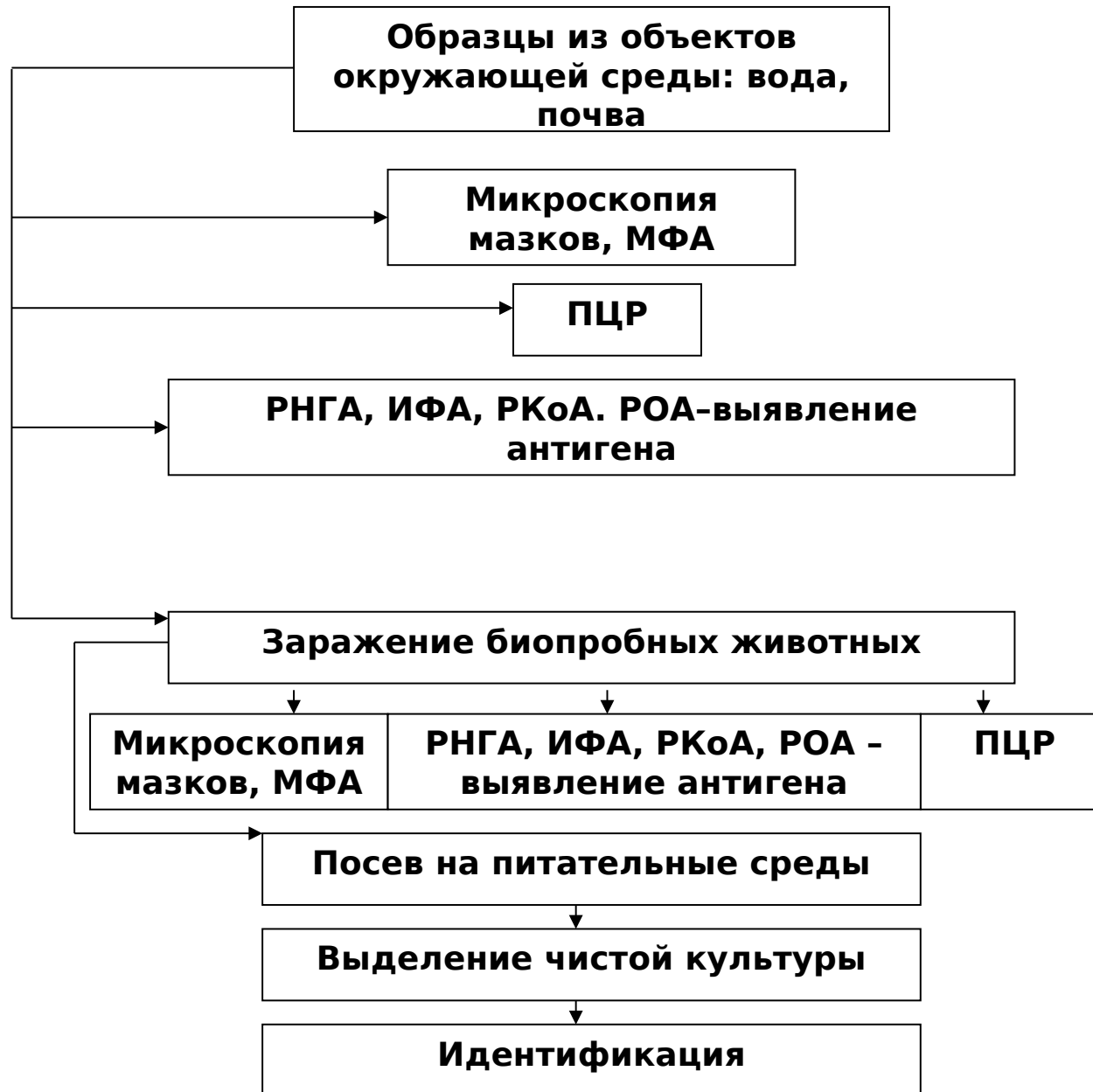


Схема лабораторной диагностики



Реакции, применяемые для обнаружения антигена

Объекты исследования: пробы

Требования, предъявляемые к иммунодиагностическим методам,
предназначенным для обнаружения антигена

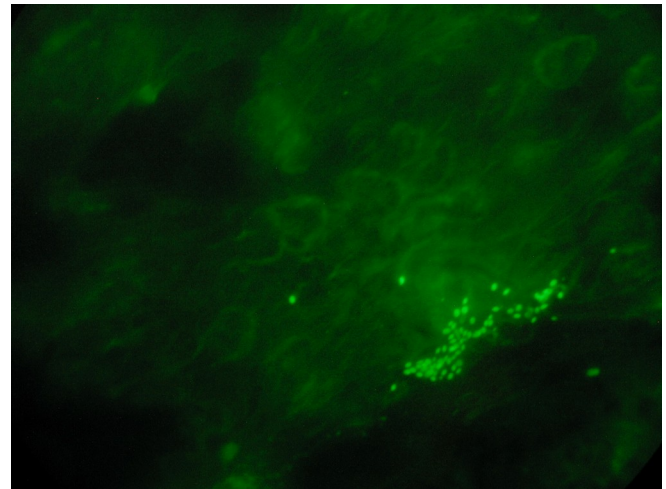
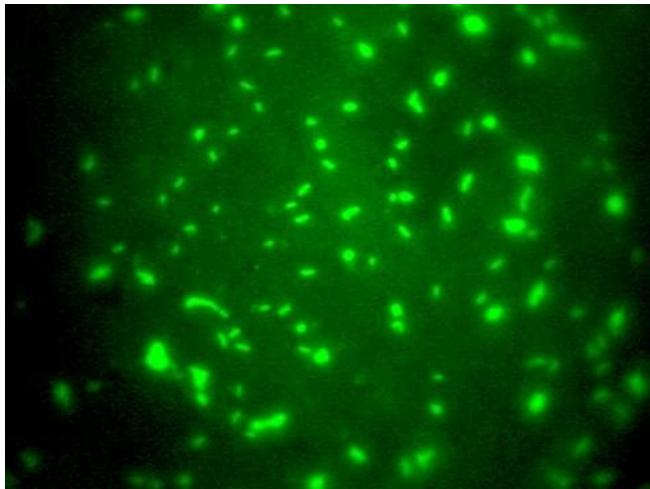
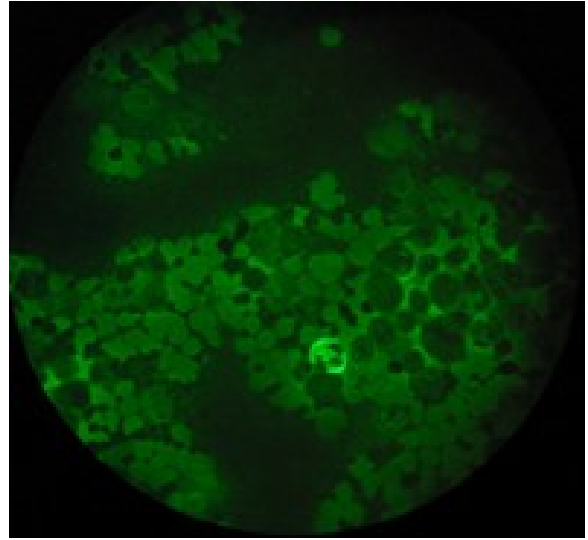
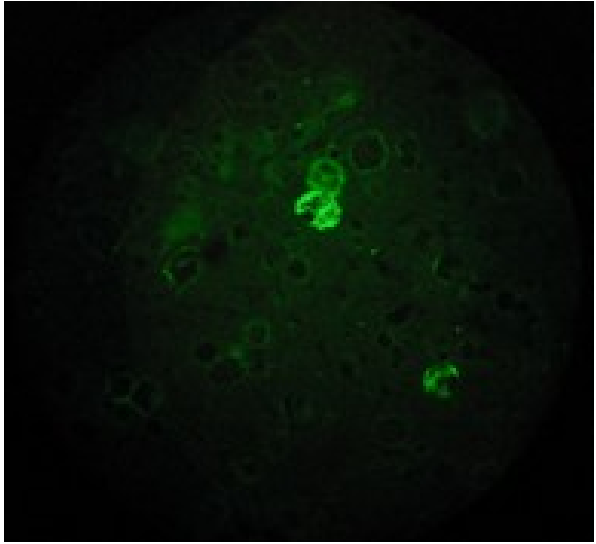
Реакции, применяемые для обнаружения антигена

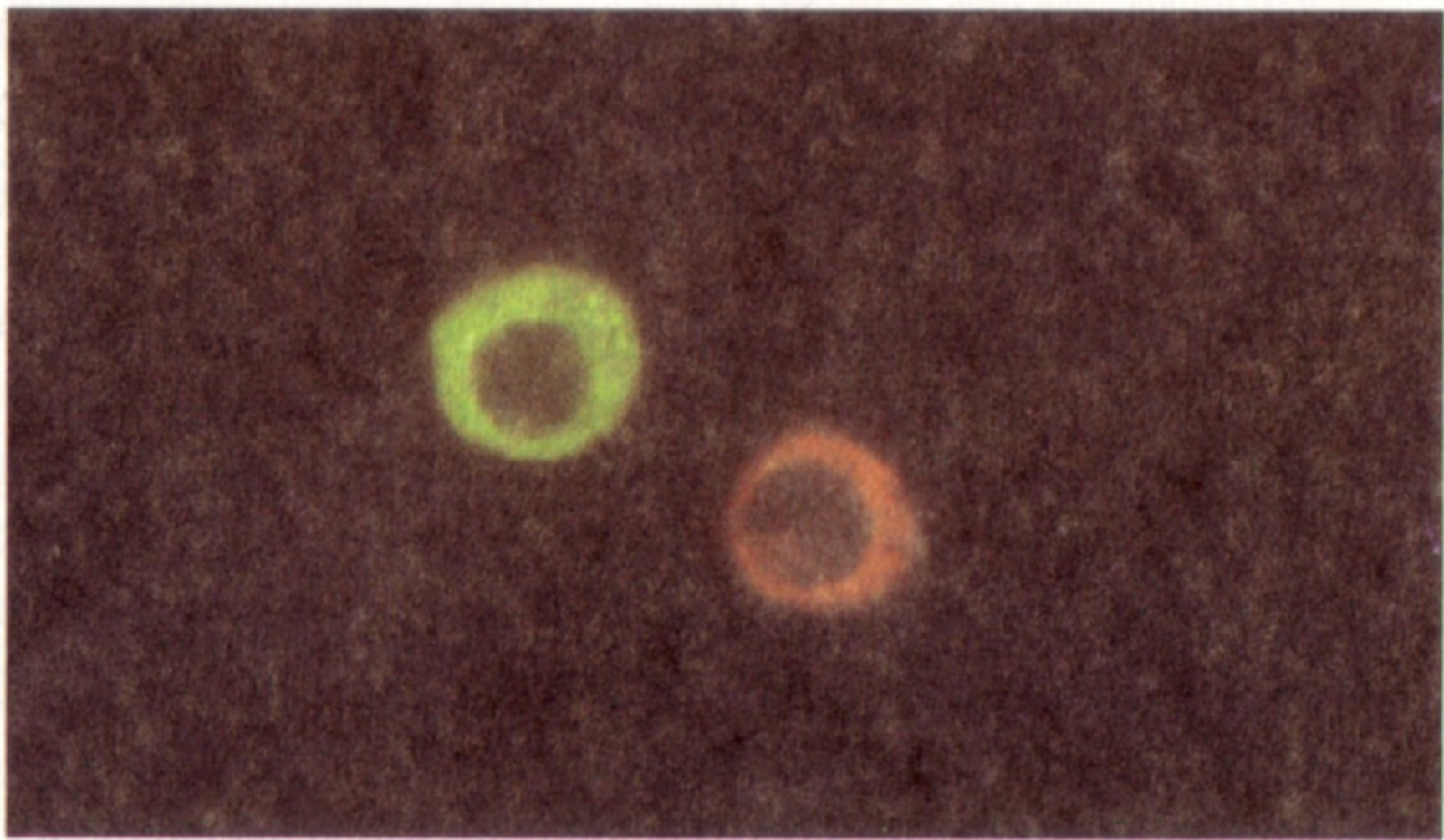
МФА (прямой вариант) - двухкомпонентная реакция $Ag + At^*$, в которой принимают участие неизвестный антиген и коммерческий диагностический препарат «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие», специфически взаимодействующие с антигенными детерминантами предполагаемого патогенного микроорганизма, экспонированными на поверхности микробной клетки.

Диагностический препарат представляет собой конъюгат высокоспецифичных антител, меченных флуорохромом, «узнающих» только гомологичные им детерминанты бактерий, но не гетерологичны виды микроорганизмов

МФА – экспресс-метод обнаружения







Твердофазный иммуноферментный метод

Иммуноферментный анализ (ИФА)



Выявление антигена

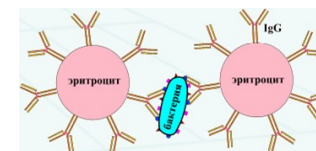
Сендвич-вариант метода

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Объекты исследования: пробы материала от больных и умерших людей и животных и с объектов внешней среды (взвеси, смывы с поверхностей)

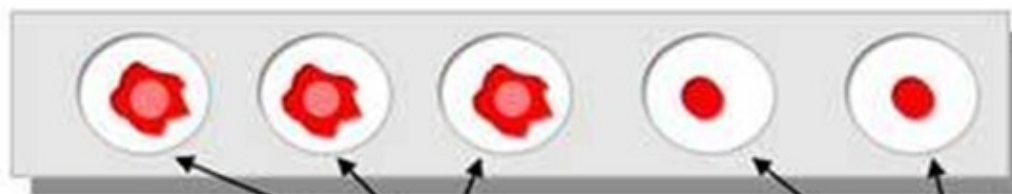
Наиболее доступным гемагглютинационным тестом является РНГА с диагностикумом эритроцитарным иммуноглобулиновым (ЭД).

Диагностикум эритроцитарный иммуноглобулиновый представляет собой формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные специфическими антителами (поли- или моноклональными).



ЭД

Учет результата РНГА



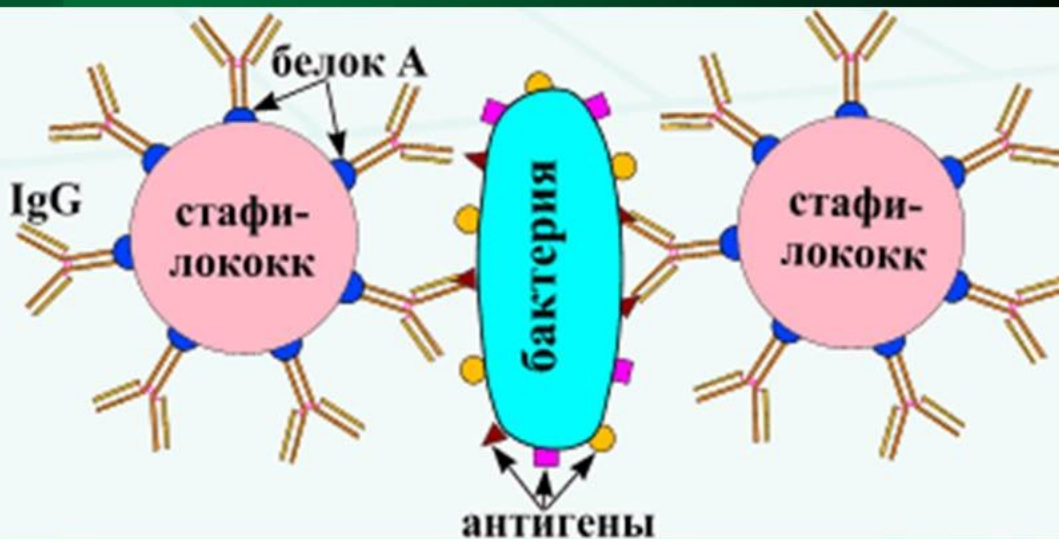
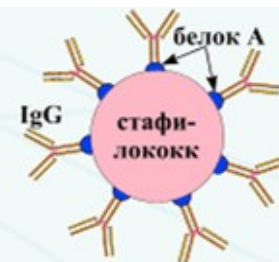
Положительный («зонтик»)

Отрицательный («пуговка»)

Реакция Ко-агглютинации



Реакция ко-агглютинации



РЛА

СЕРОДИАГНОСТИКА

Реакции, применяемые для выявления антител : РА, РНГА, ИФА,
Dot-иммуноанализ

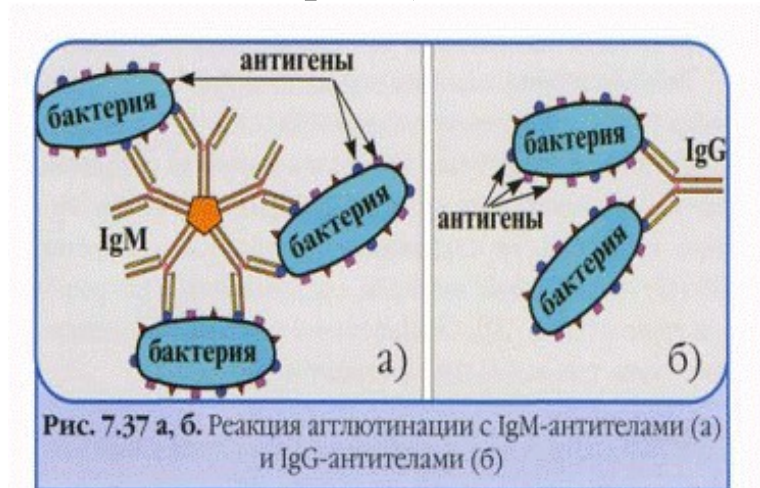
Реакция агглютинации

РА – серологическая реакция, основанная на феномене связывания специфическими би- и поливалентными антителами взвешенных в растворе электролита частиц, в результате чего образуется осадок в виде хлопьев.

Два метода постановки прямого варианта РА:

- реакция агглютинации на стекле (ориентировочная) и
- реакция агглютинации развернутая (в пробирках)

При выполнении прямого варианта реакции агглютинации агрегаты образуются при взаимодействии сывороточных антител с корпускулярными антигенами (бактериями и клетками крови).

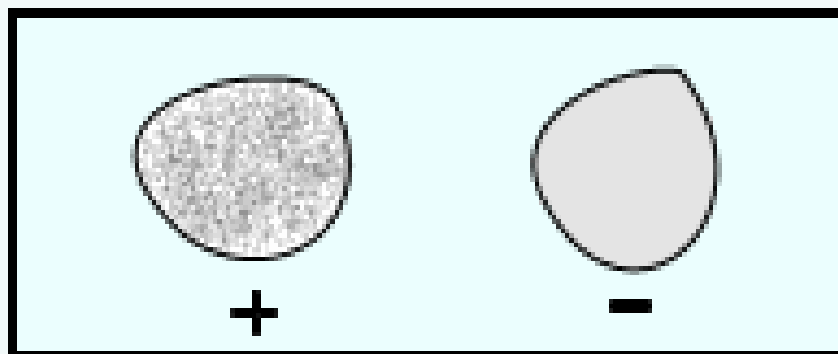


Реакция агглютинации на стекле

Схема реакции агглютинации на стекле



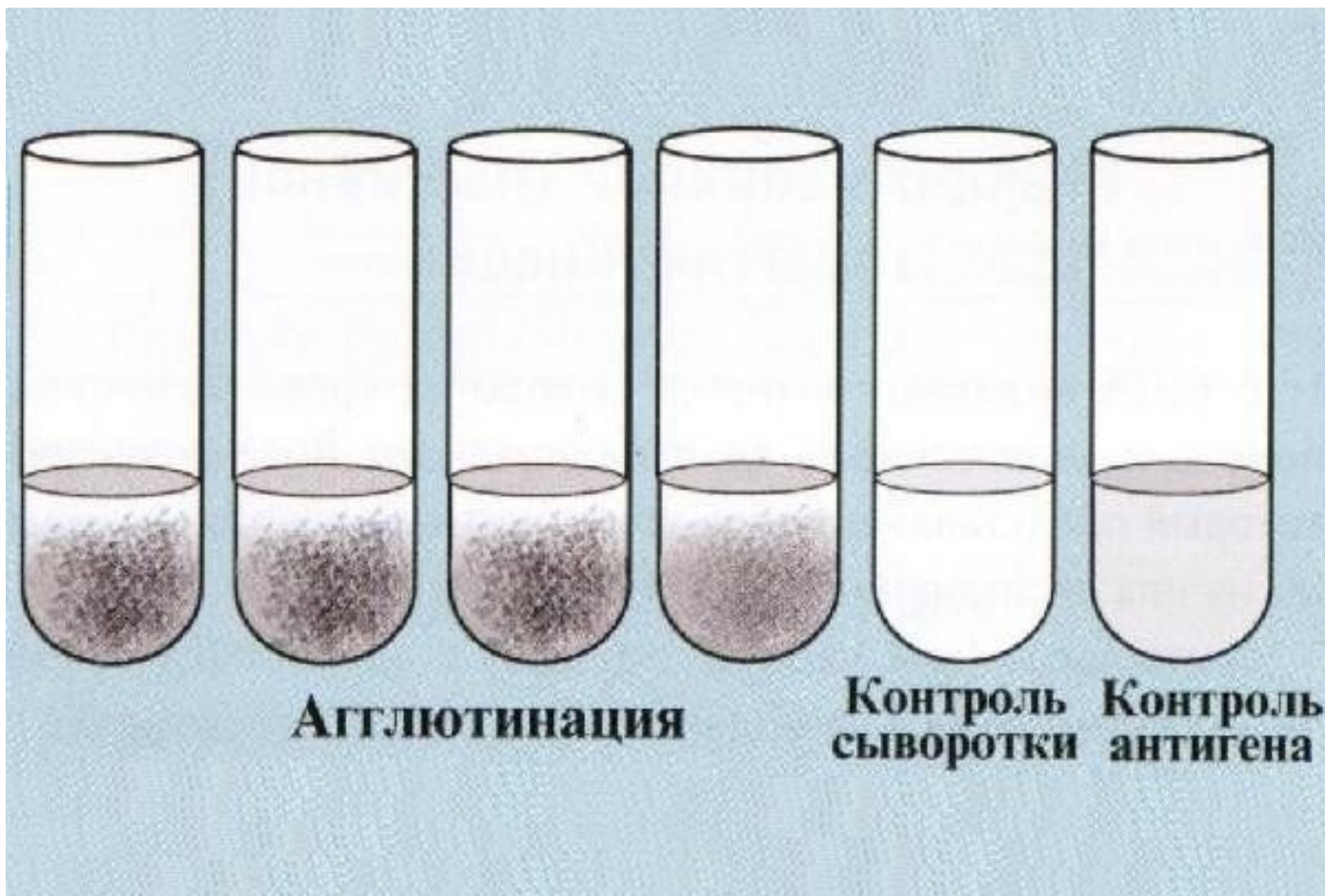
1 - контроль; 2 – агглютинат (хлопья) положительная реакция.



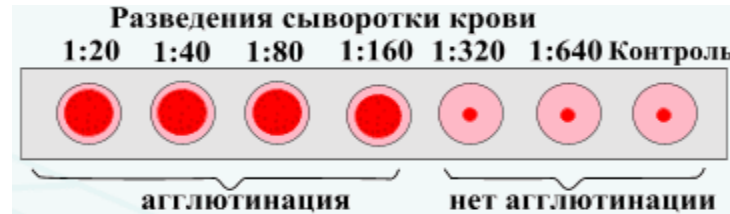
Агглютинация
положительная

Контроль
(нет агглютинации)

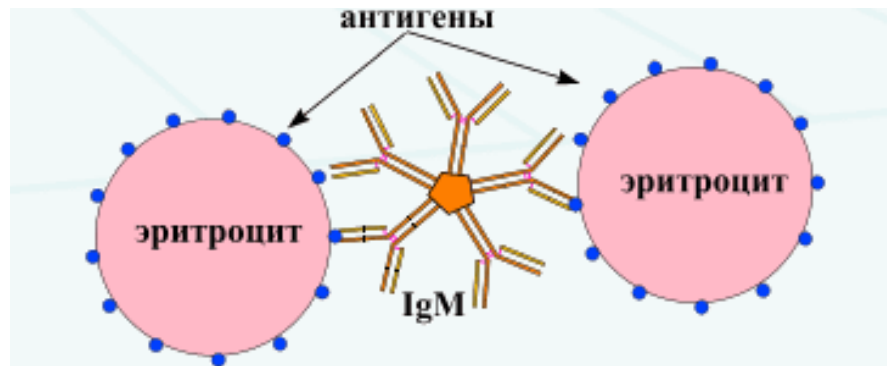
Реакция агглютинации развернутая



Реакция непрямой гемагглютинации для определения антител



Учет результата реакции

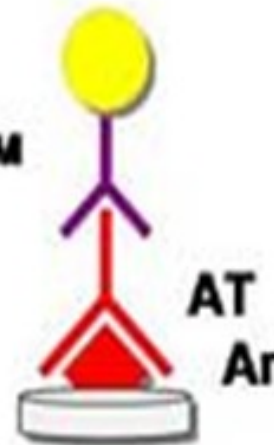


Диагностикум эритроцитарный антигенный

Твердофазный иммуноферментный метод

Иммуноферментный анализ (ИФА)

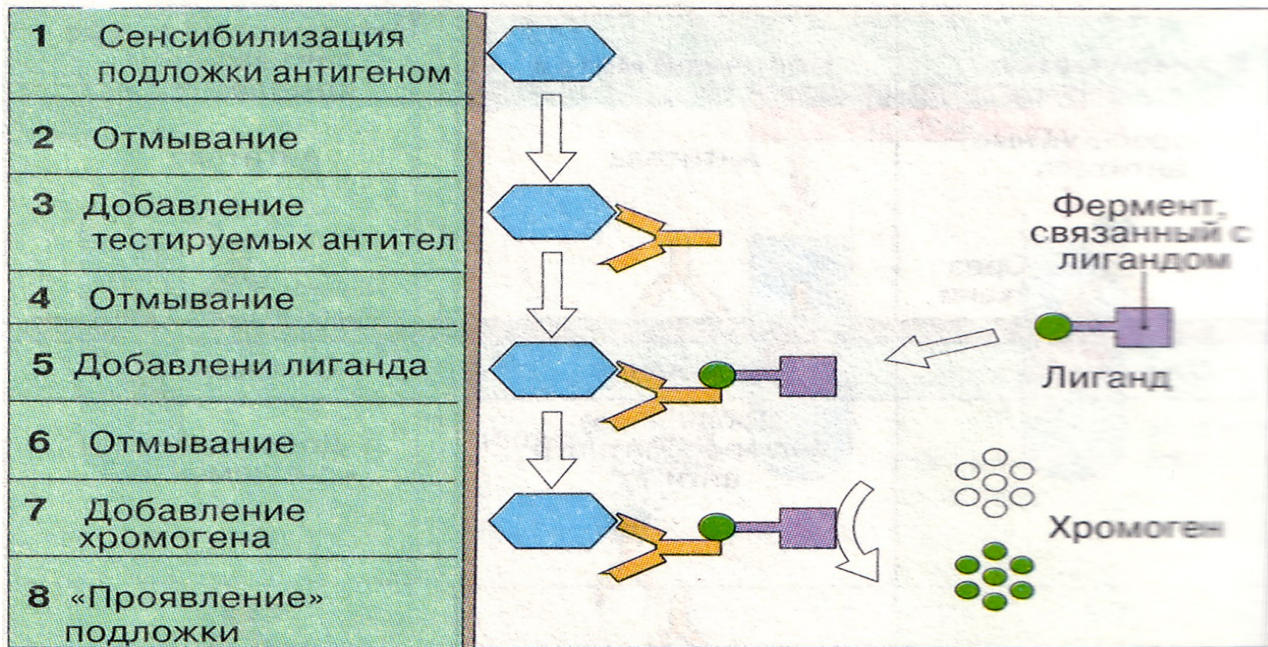
**Антитела к АТ,
меченные ферментом**



Выявление антител

Непрямой вариант метода

Ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA)



РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

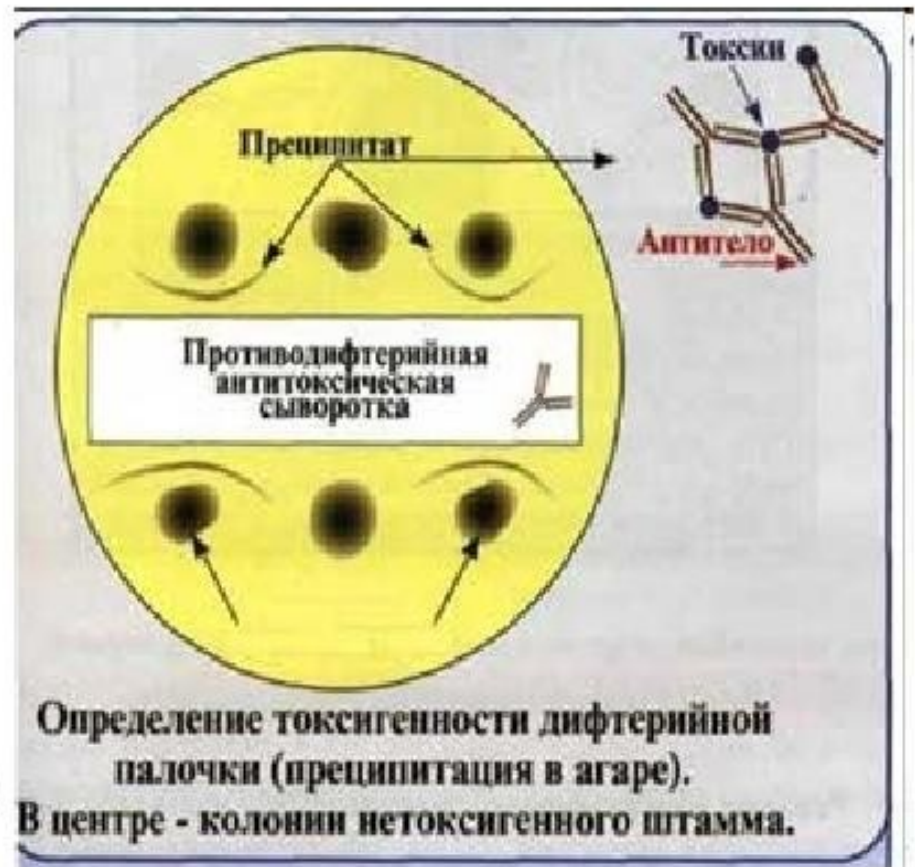
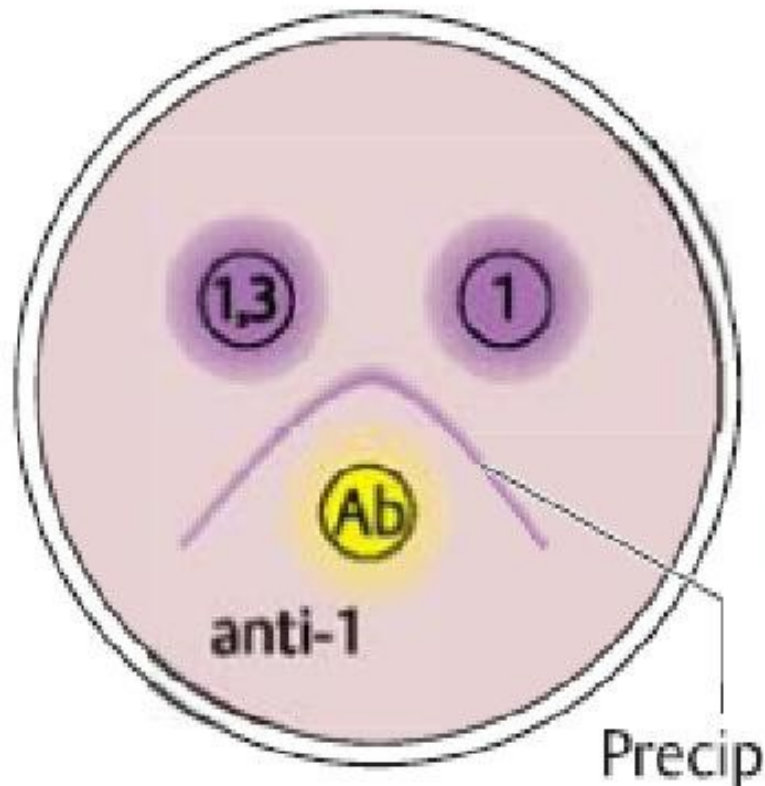
РА — склеивание антителами антигенов (бактерии, эритроциты) в присутствии электролита (изотонического раствора натрия хлорида). При положительной РА образуются хлопья (на предметном стекле) или осадок (в пробирке).

РА используют для серодиагностики брюшного тифа, бруцеллёза (реакция Райта).

Для идентификации кишечных инфекций, коклюша.

Два метода проведения РА: реакция агглютинации на стекле (ориентировочная) и развёрнутая (в пробирках).

Реакция преципитации в геле по Оухтерлони



Биопроба

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД



- Воспроизведение
- экспериментальной инфекции на модели мышей – является важным этапом схемы индикации возбудителей особо опасных инфекций в исследуемых пробах



Схема Реакции иммунофлюоресценции (РИФ) (Кунса)

