

**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 ).

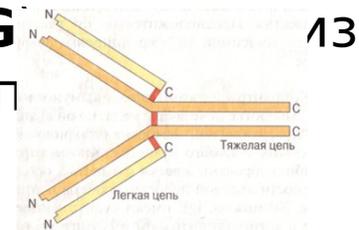
# Антигены

- **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

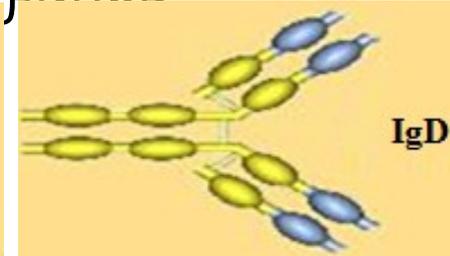
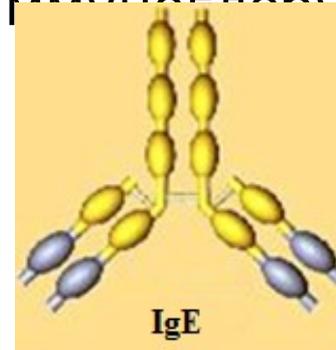
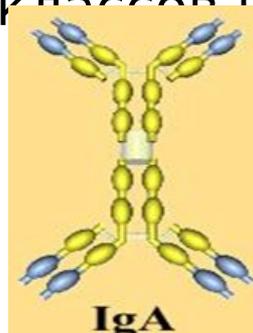
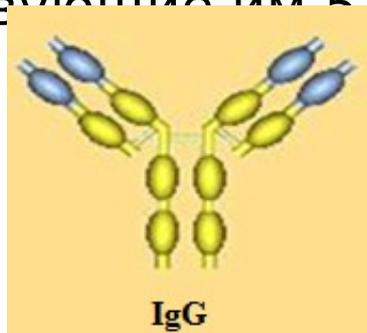
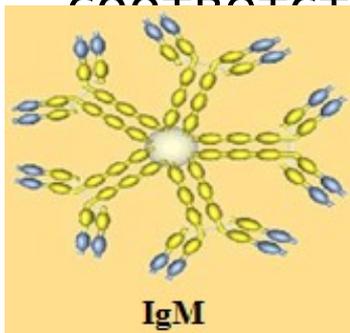
# Антитела

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

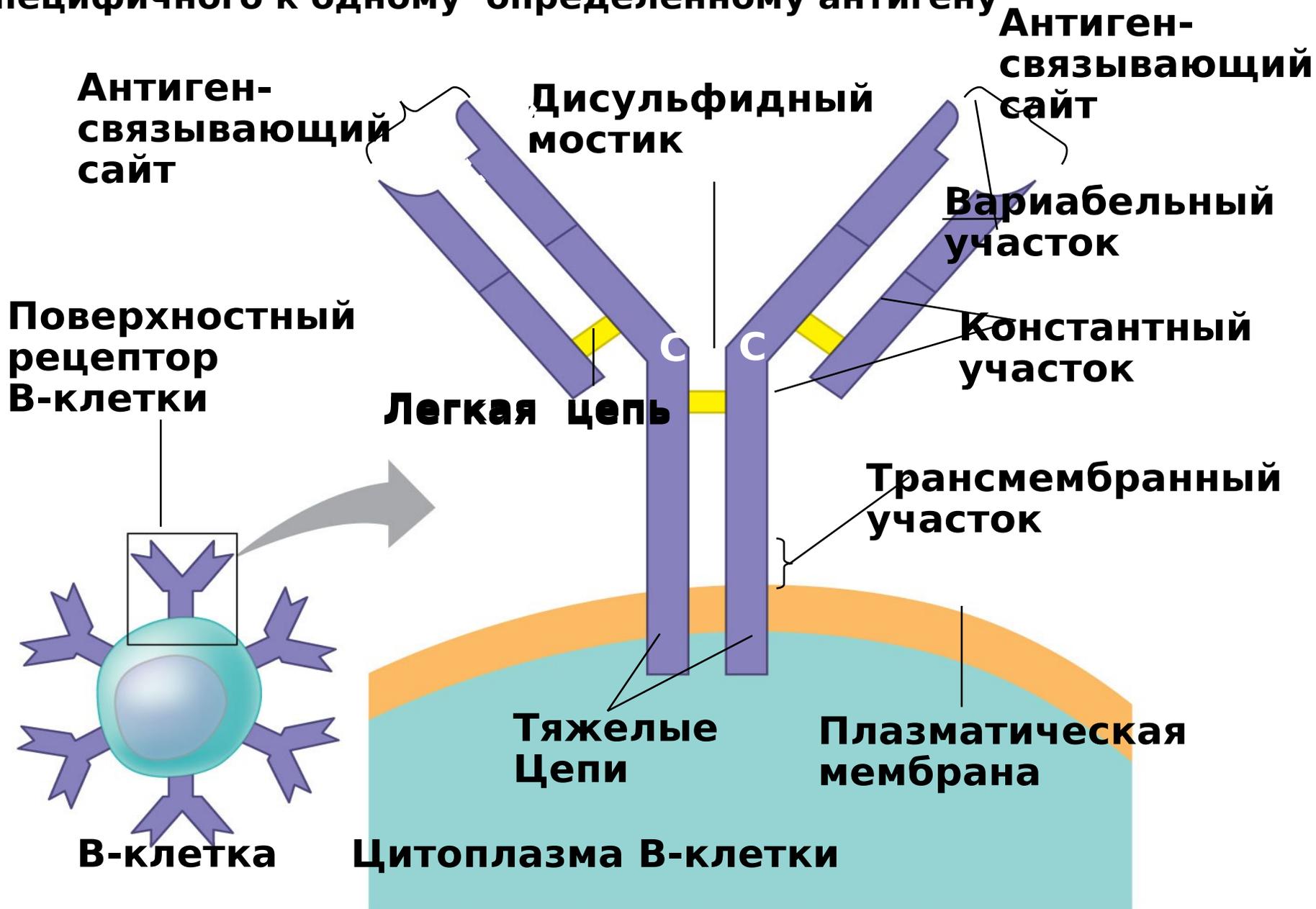
- Типичная молекула иммуноглобулина (**IgG**) состоит из двух легких L-цепей и двух тяжелых H-цепей



- 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**

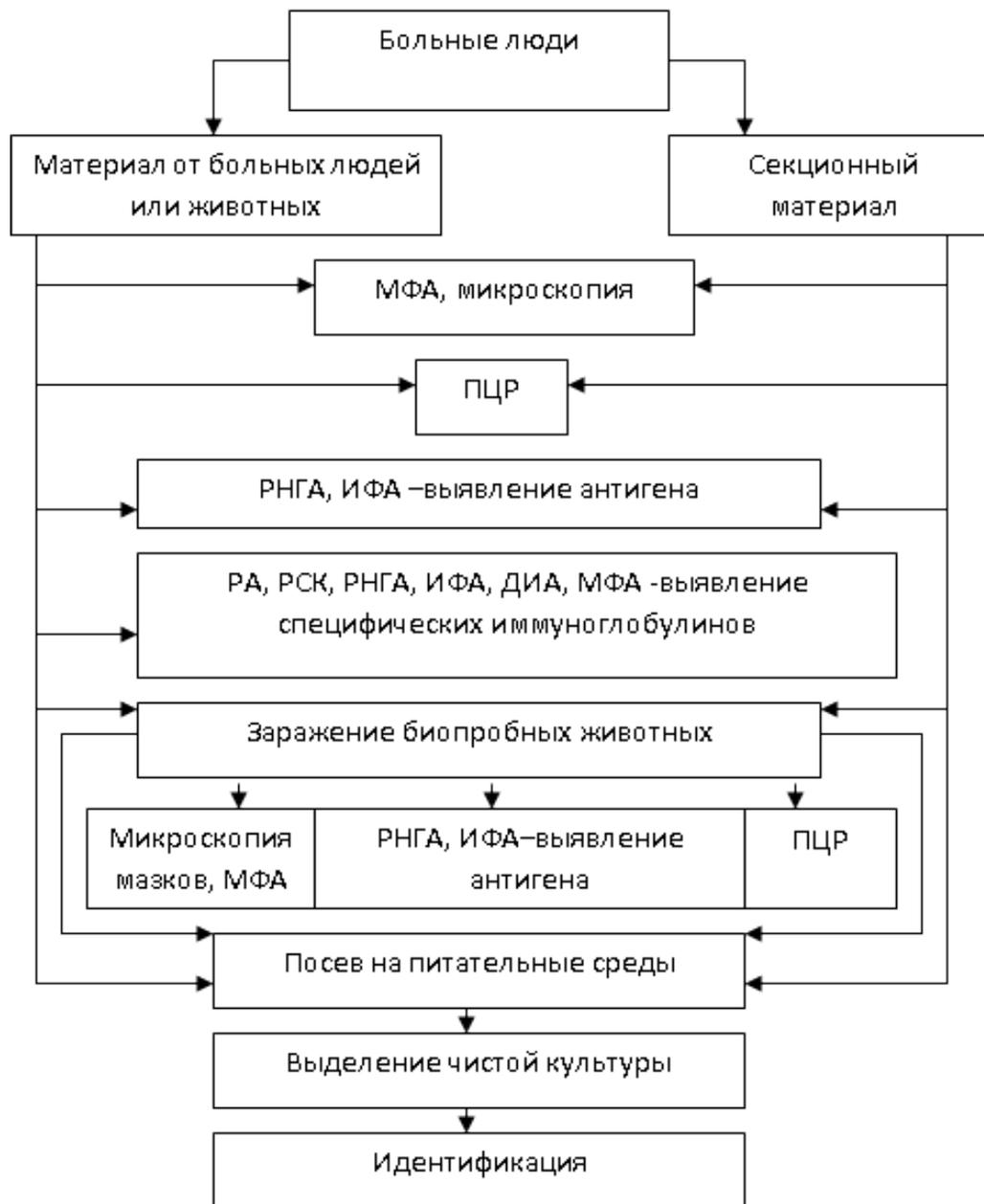
*(продолжение)*

- **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*

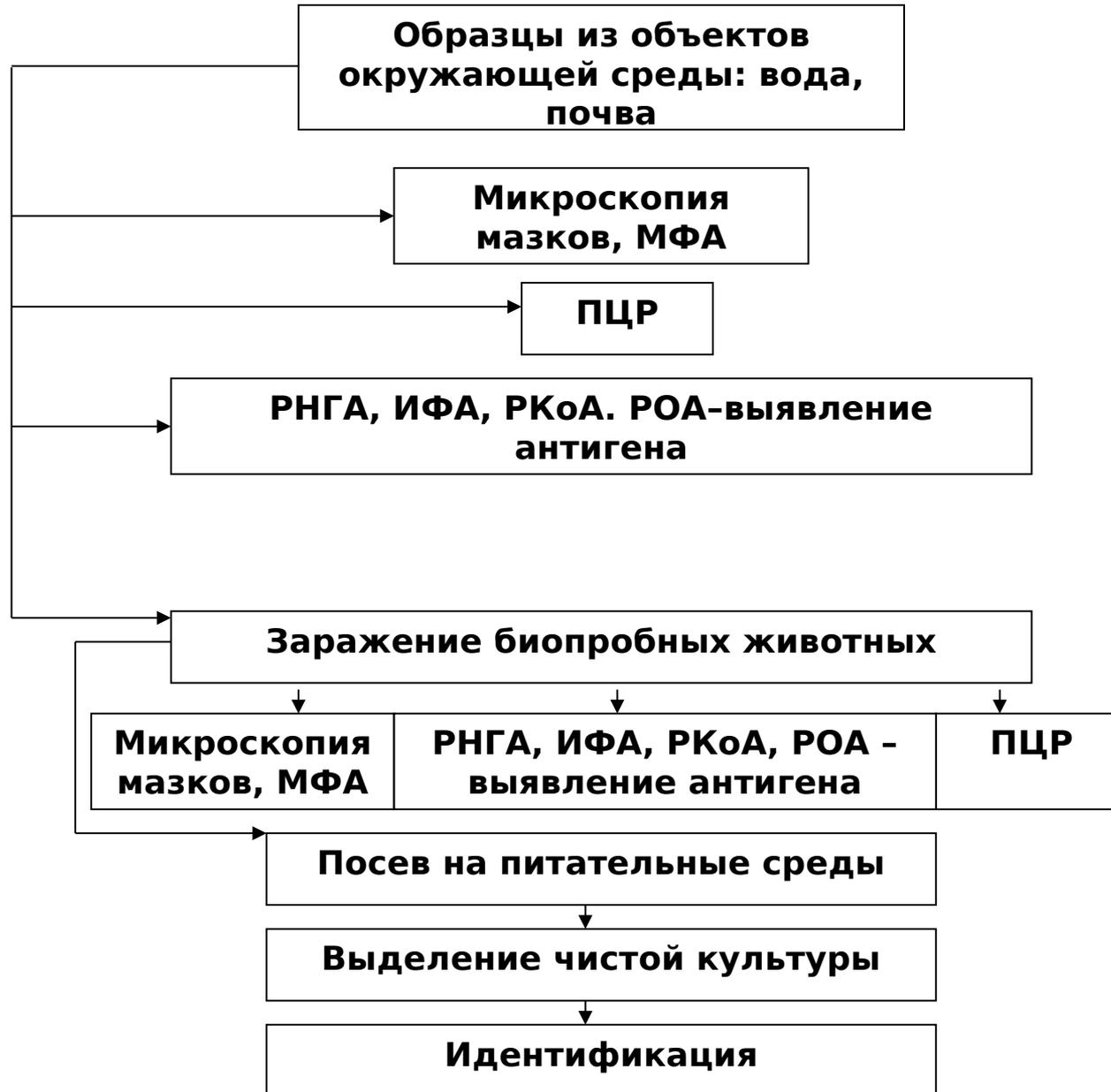
# Примерная номенклатура исследований в лабораториях территориального и регионального уровней

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

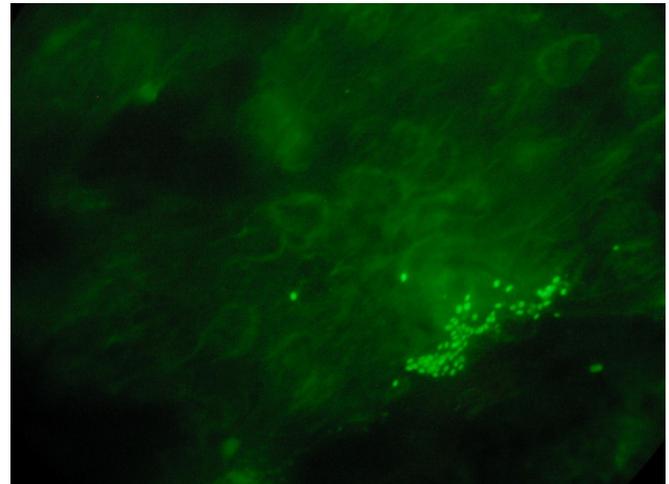
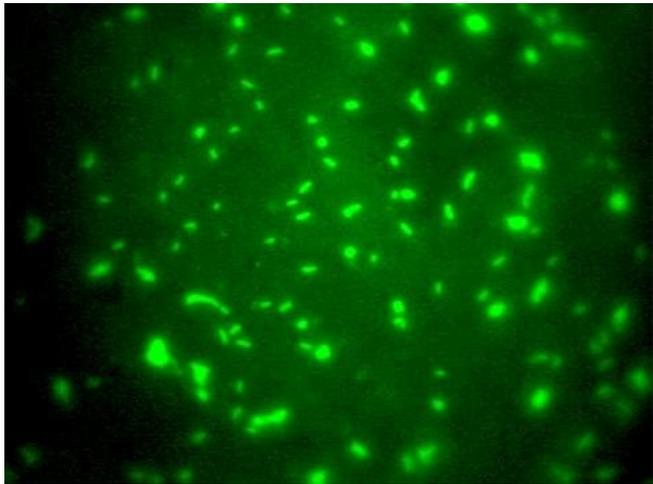
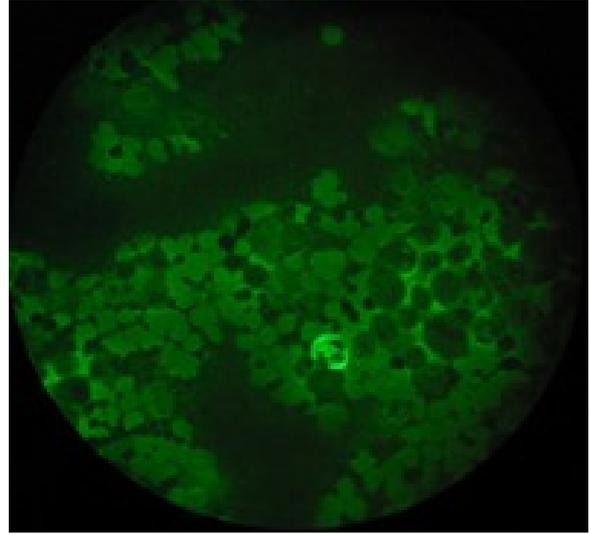
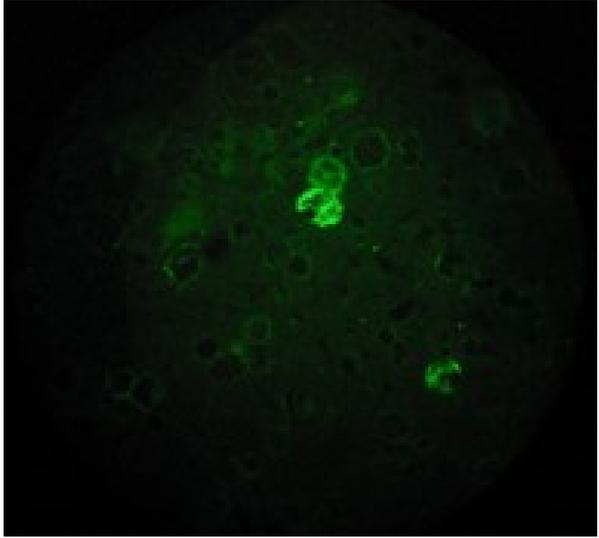
# **Реакции, применяемые для обнаружения антигена**

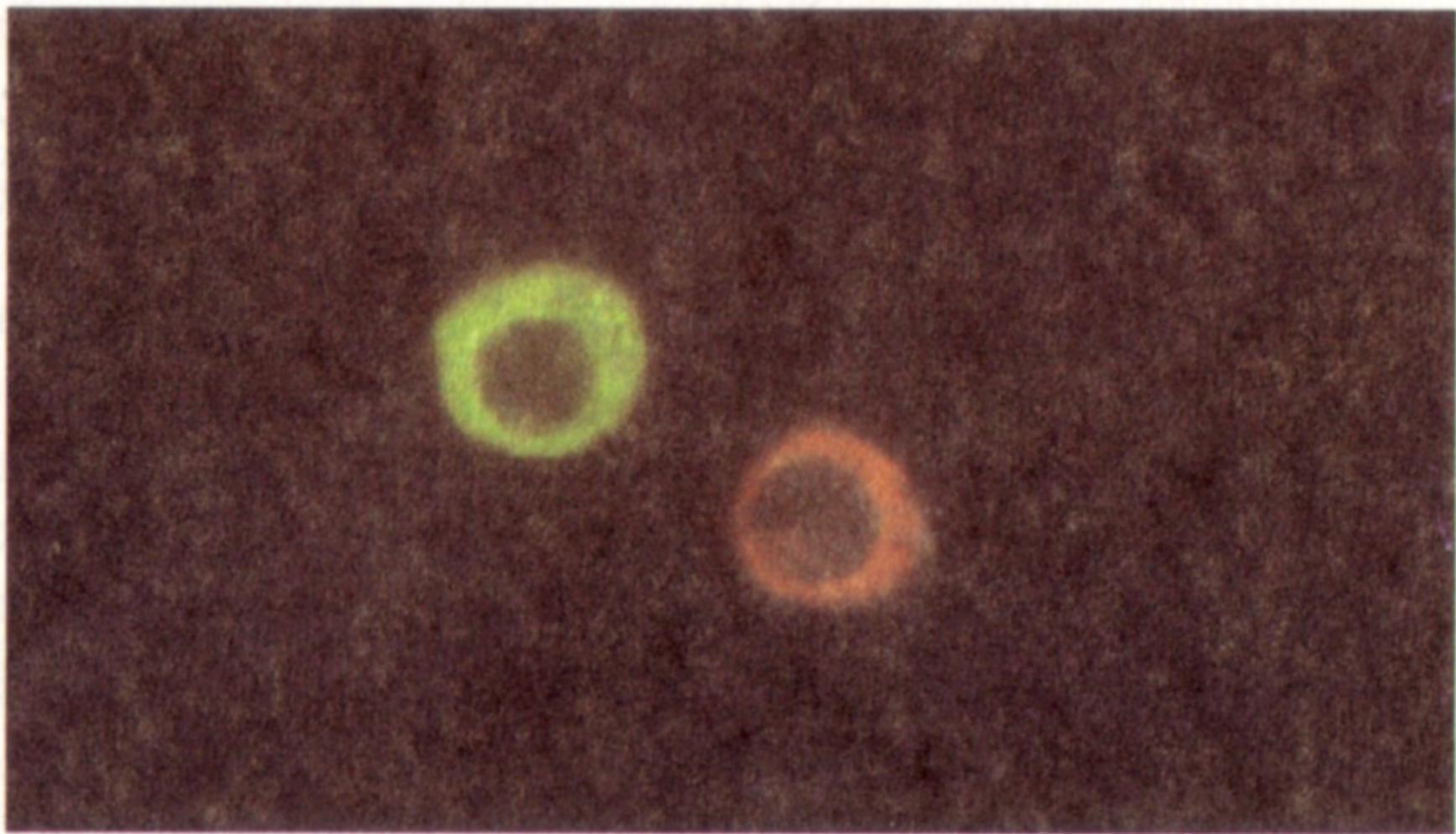
**МФА** (прямой вариант) - двухкомпонентная реакция  $Ag + At^*$ , в которой принимают участие неизвестный антиген и коммерческий диагностический препарат «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие», специфически взаимодействующие с антигенными детерминантами предполагаемого патогенного микроорганизма,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

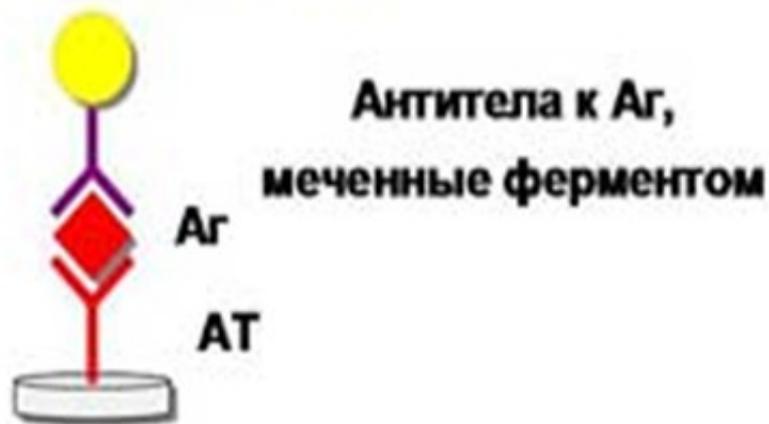






# ***Твердофазный иммуноферментный метод***

## **Иммуноферментный анализ (ИФА)**



**Выявление антигена**

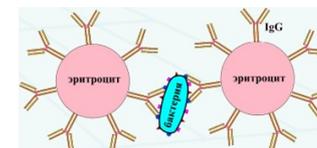
**Сендвич-вариант метода**

### **Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)**

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

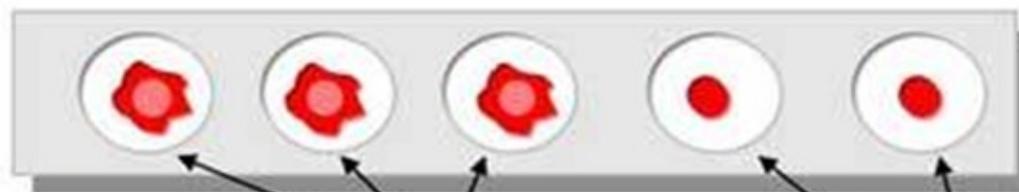
Наиболее доступным гемагглютинационным тестом является РНГА с диагностикумом эритроцитарным иммуноглобулиновым (ЭД).

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



**ЭД**

### **Учет результата РНГА**



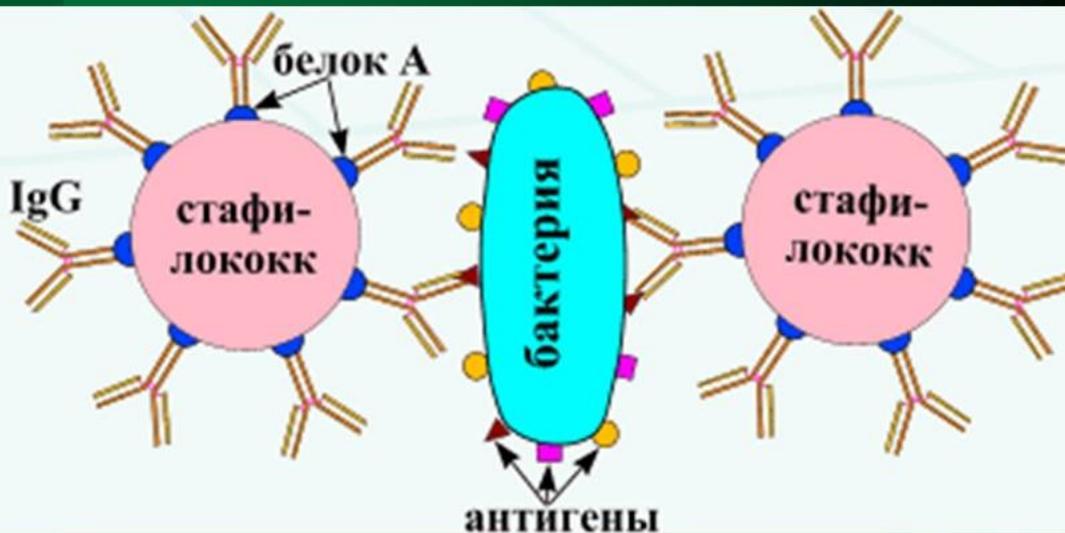
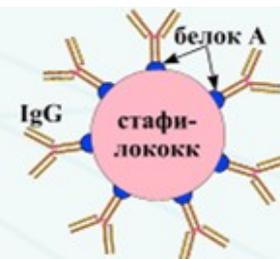
**Положительный («зонтик»)**

**Отрицательный («пуговка»)**

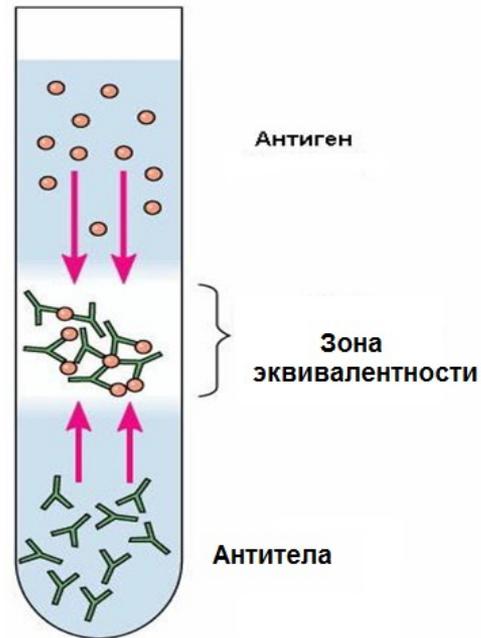
# Реакция Ко-агглютинации



## Реакция ко-агглютинации



РЛА



## ***СЕРОДИАГНОСТИКА***

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

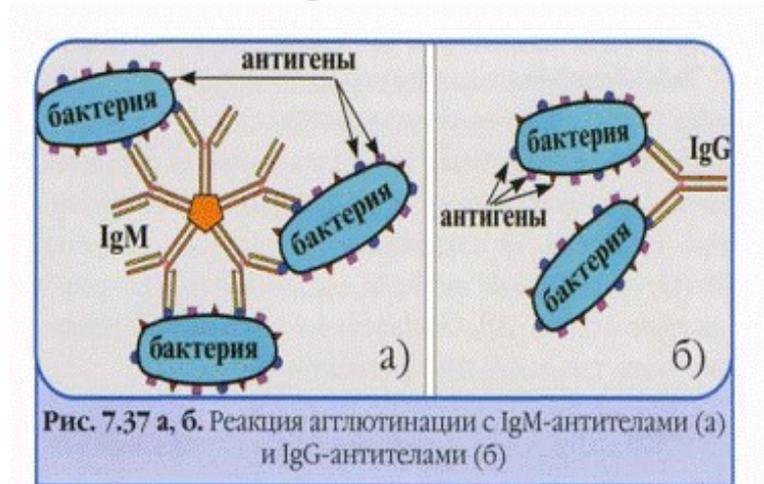
# Реакция агглютинации

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).

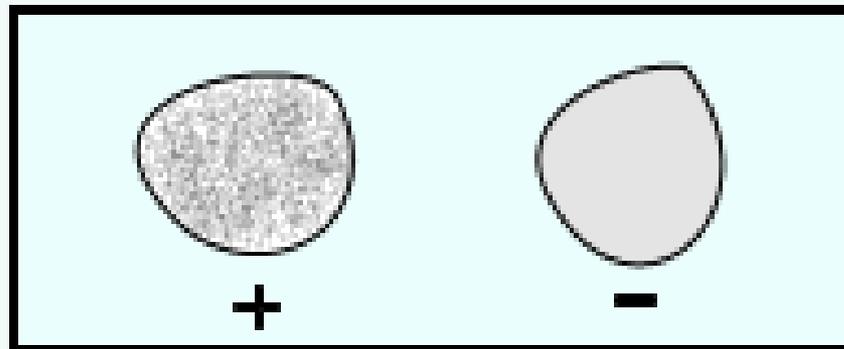


# Реакция агглютинации на стекле

## Схема реакции агглютинации на стекле



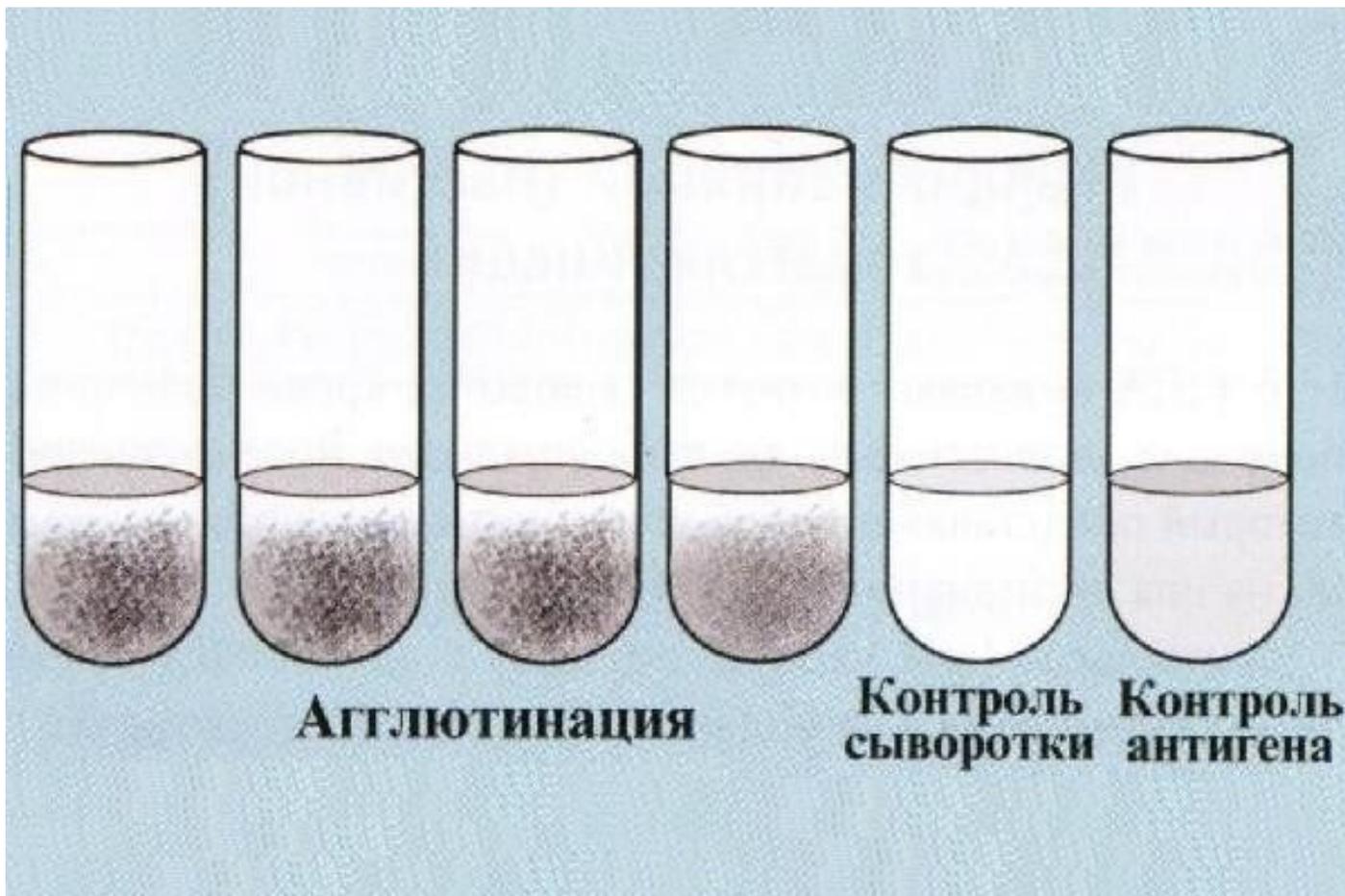
1 - контроль; 2 – агглютинат (хлопья) положительная реакция.



Агглютинация  
положительная

Контроль  
(нет агглютинации)

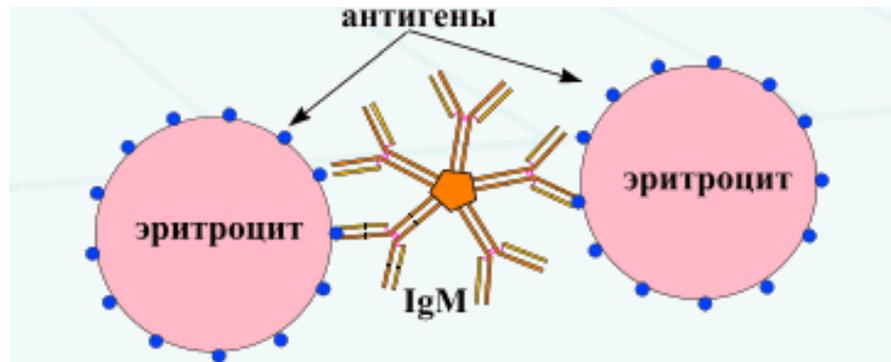
## *Реакция агглютинации развернутая*



# **Реакция непрямой гемагглютинации для определения антител**



**Учет результата реакции**

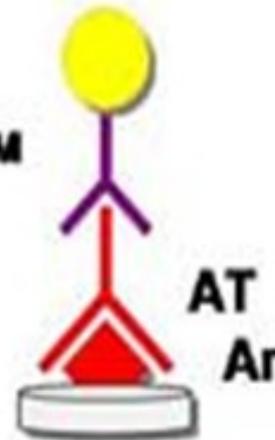


**Диагностикум эритроцитарный антигенный**

# ***Твердофазный иммуноферментный метод***

## **Иммуноферментный анализ (ИФА)**

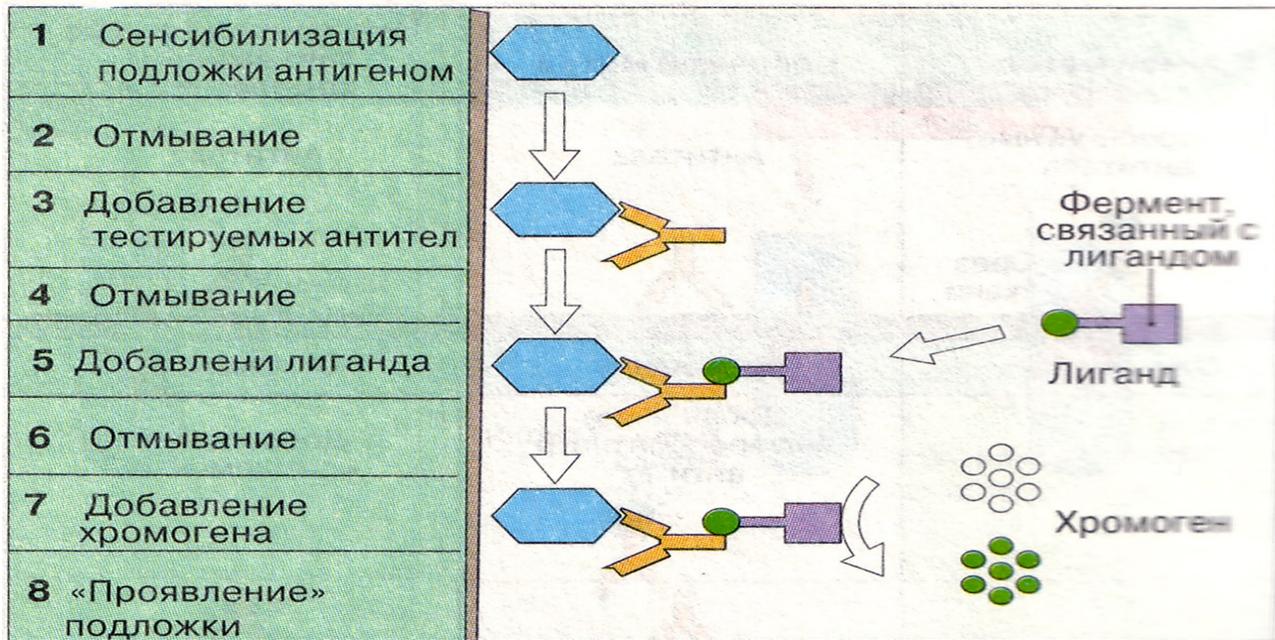
**Антитела к АТ,  
меченные ферментом**



**Выявление антител**

**Непрямой вариант метода**

# Ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA)



## РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

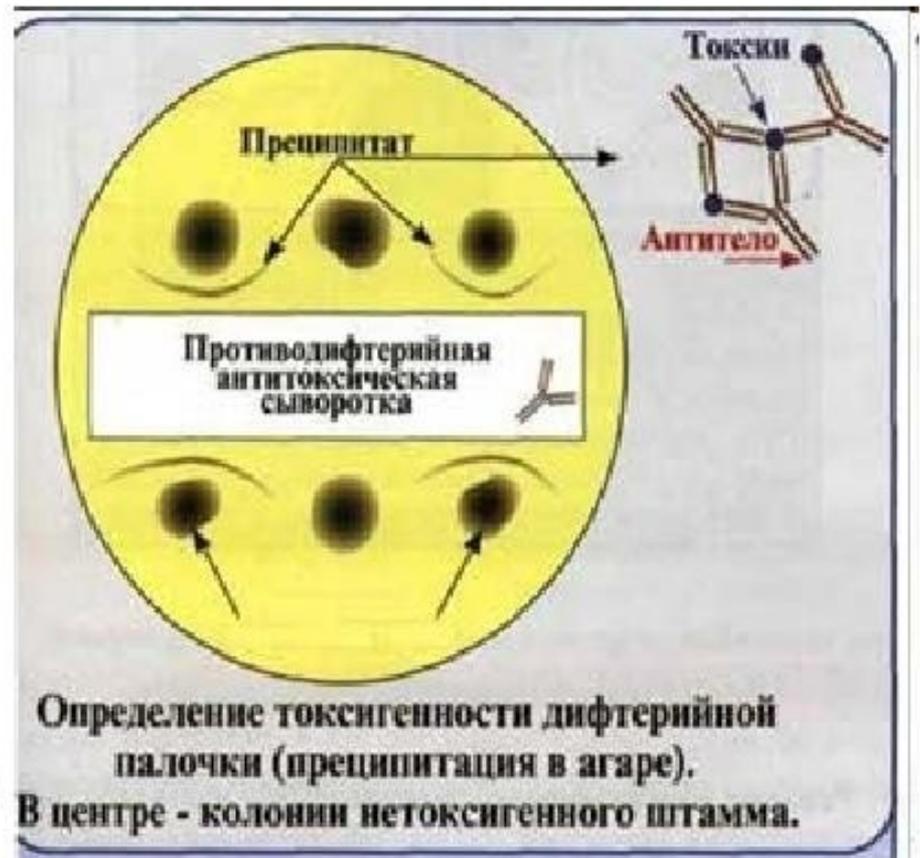
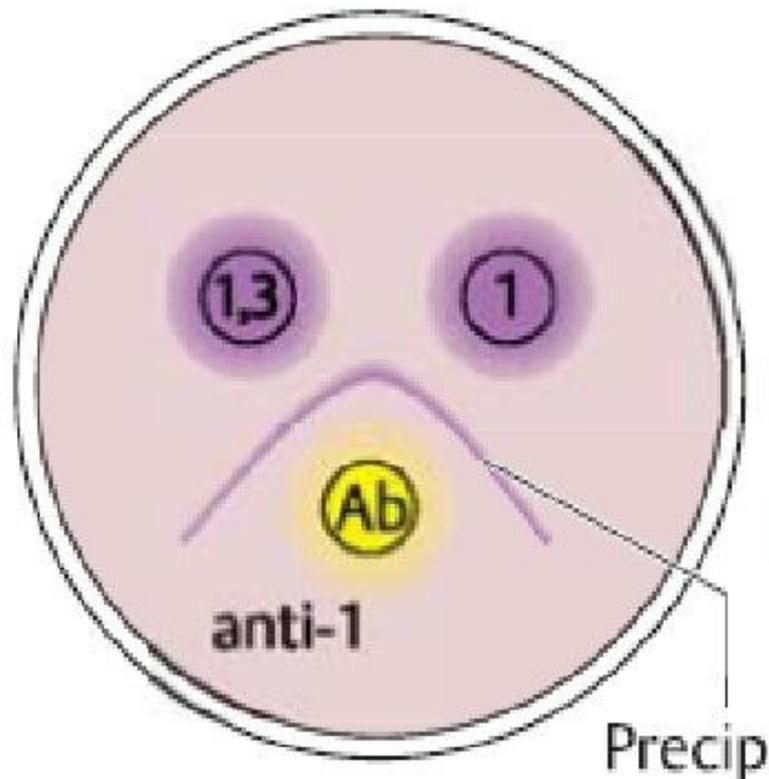
**РА** — склеивание антителами антигенов (бактерии, эритроциты) в присутствии электролита (изотонического раствора натрия хлорида). При положительной РА образуются хлопья (на предметном стекле) или осадок (в пробирке).

**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)

