

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

**Камышный А.М., Топол И.А.,
Полищук Н.Н., Деген А.С., Букина Ю.В.**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ
ИНОСТРАННЫХ СТУДЕНТОВ ПРИ ПОДГОТОВКЕ К ПРАКТИЧЕСКИМ
ЗАНЯТИЯМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

Часть II

Модуль №1. Инфекция. Иммунитет.

Запорожье - 2019

Авторы: Камышный А.М. - профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗГМУ, доцент Полищук Н.Н., старший преподаватель Топол И.А., ассистент Деген А.С., ассистент Букина Ю.В.

Под редакцией заведующего кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожского государственного медицинского университета, профессора **Камышного А.М.**

Методические указания для самостоятельной работы студентов при подготовке к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии одобрены цикловой методической комиссией по медико-биологическим дисциплинам Запорожского государственного медицинского университета _____ 201__ года, протокол № _____.

Содержание:

8. ИНФЕКЦИЯ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ4
9. Неспецифические факторы защиты организма.....9
10. Серологические реакции (1 занятие).....13
11. Сыворотки и иммуноглобулины. Реакция флоккуляции (нейтрализации). Аллергические реакции в иммуно диагностике инфекционных заболеваний. Принципы использования антител как лечебно-профилактических и диагностических препаратов. Гиперчувствительность. Аутоиммунные феномены.....192533
12. Серологические реакции с метками.....	61
13. Вакцины и иммунные сыворотки.....	66

Практическое занятие № 8

Инфекции, инфекционный и эпидемиологический процессы. Факторы патогенности микроорганизмов. Механизмы патогенеза инфекционных болезней. Методы экспериментального заражения животных.

Освоение вопросов инфекции необходимо врачу для понимания патогенеза инфекционных заболеваний. Экспериментальный метод исследования в микробиологии применяется для изучения патогенности микроорганизмов, для выделения чистой культуры возбудителя из исследуемого материала, для испытания лечебного и профилактического действия химиотерапевтических и биологических препаратов.

Цель самоподготовки

После самостоятельного изучения темы студент должен знать:

- понятие об инфекции, формы инфекции;
- понятие о патогенности и вирулентности микроорганизмов, факторы вирулентности и способы их выявления;
- правила заражения и вскрытия животных.

Исходный уровень знаний

Для усвоения материала студенту необходимо знать:

- виды симбиоза макро– и микроорганизмов;
- основные группы микроорганизмов из разделов «Морфология микроорганизмов», «Физиология микроорганизмов»;
- приготовление препаратов–мазков, окраска их по Граму.

Цель занятия

1. Ознакомиться с методами выявления факторов патогенности микроорганизмов.
2. Изучить особенности и динамику развития инфекционного процесса, формы его проявления, пути передачи.
3. Познакомиться с основными методами экспериментального заражения и бактериологического исследования трупов животных.

План изучения темы

1. Инфекция и инфекционный процесс.
2. Патогенность и вирулентность микроорганизмов. Факторы патогенности.
3. Экспериментальное заражение животных. Определение вирулентности микробов и силы токсина.
4. Роль макроорганизма, внешней и социальной среды в возникновении и развитии инфекционного процесса.
5. Динамика развития инфекционного процесса. Виды инфекционного процесса.

Инфекция (лат. infectio – заражение) или **инфекционный процесс** – совокупность физиологических и патологических адапционных и репарационных (восстановительных) реакций восприимчивого макроорганизма,

возникающих в ответ на проникновение и размножение патогенного агента (вирус, бактерия, гриб) и направленных на поддержание гомеостаза.

Инфекционная болезнь – частный случай инфекционного процесса, определяемый клинически и с помощью лабораторных тестов, сопровождающийся нарушением гомеостаза.

В основе инфекционного процесса лежит **феномен паразитизма** – форма взаимоотношений различных видов, при которой один (паразит) использует другого (хозяин) в качестве источника питания и как место постоянного или временного обитания, причем оба организма находятся в антагонистических отношениях.

Популяционно-экологическая классификация паразитов:

1. Облигатные паразиты – на всех стадиях жизненного цикла связаны с хозяином, никогда не попадают во внешнюю среду.

2. Факультативные паразиты – могут помимо хозяина использовать внешнюю среду, но паразитическая стадия у них определяющая.

3. Случайные паразиты – внешняя среда для них является нормальным местом обитания. Сапрофитическая стадия обязательна и нормальна, а паразитическая – эпизодична.

Триада Генле-Коха (три условия, при которых микроорганизм может быть признан возбудителем заболевания):

1. Микроорганизм-возбудитель должен обнаруживаться во всех случаях при данной болезни и не встречаться ни у здоровых лиц, ни у больных другим заболеванием.

2. Микроорганизм-возбудитель должен быть выделен из организма больного в чистой культуре.

3. Чистая культура выделенного микроорганизма должна вызывать то же заболевание у восприимчивых животных.

Участники инфекционного процесса.

Факторы возникновения и исхода инфекционного процесса:

1. количественные и качественные характеристики микроорганизмов – определяют специфичность инфекционного процесса.

2. состояние макроорганизма, его восприимчивость к микроорганизму – определяет форму проявления, длительность, тяжесть и исход данного инфекционного процесса.

3. факторы внешней среды, где происходит встреча микроорганизма с хозяином – оказывает опосредованное воздействие, снижая или повышая восприимчивость хозяина или инфицирующую дозу и вирулентность возбудителя.

Стадии инфекционного процесса:

1. Проникновение микроорганизма в макроорганизм, его адаптация в месте входных ворот, адгезия и колонизация.
2. Образование ферментов, токсинов и др. продуктов в процессе жизнедеятельности и размножения микроорганизмов, что приводит к нарушению гомеостаза за счет местного и генерализованного воспаления.
3. Диссеминация за пределы первичного очага, а, следовательно, генерализация инфекции.
4. Формирование защитной реакции макроорганизма – направлено на нейтрализацию микроорганизма и его токсинов, восстановление гомеостаза.
5. Восстановление гомеостаза – выздоровление и приобретение невосприимчивости к микроорганизму – иммунитета.

Патогенность (греч. pathos – страдание, болезнь, genos – рождение) – видовой многофакторный признак – потенциальная способность микроорганизма вызывать инфекционный процесс. Проявляется лишь в восприимчивом организме, характеризуется специфичностью (способностью вызывать определенное инфекционное заболевание).

Многие микроорганизмы приобрели возможность поражать клетки тканей и органов с определенными биохимическими особенностями (*Bordetella pertusis* – трахея и бронхи, *Vibrio cholerae* – тонкий кишечник) – **органопротропность**.

Для того, чтобы вызвать инфекционный процесс микроорганизмы должны проникнуть в макроорганизм в определенной критической дозе – **инфицирующей дозе (ID)** – минимальная доза, которая вызывает стойкую адгезию, колонизацию, проникновение в ткани и дальнейшее развитие инфекции.

В естественных условиях для возникновения инфекционного процесса микроорганизмы должны проникать через **входные ворота** – ткани и органы, через которые проникает микроорганизм. Существуют патогенные микроорганизмы, способные проникать через различные входные ворота – **пантропные** (поражают многие ткани и органы) – напр., возбудители зоонозов.

Вирулентность (лат. virulentus – ядовитый) – динамическое индивидуальное свойство данного штамма, вызывать инфекционный процесс, качественная характеристика патогенности, фенотипическое проявление генотипа.

Штаммы подразделяют на: высоко-, умеренно-, слабо-, авирулентные.

О вирулентности в лабораторных условиях судят по величине летальной (LD) и инфицирующей (ID) дозы для экспериментальных животных.

Летальная доза (LD) – наименьшее кол-во возбудителя или токсина, вызывающее в определенный срок гибель конкретного числа (%) животных:

DCL (Dosis certe letalis) – гибель 100% животных

DLM (Dosis letalis minima) – 95%

LD₉₀ (Letalis dosis 90) – 90%

LD₅₀ (Letalis dosis 50) – 50% и т.д.

Инфицирующая доза (ID) – минимальное кол-во микроорганизмов, способное вызвать заболевание у определенного кол-ва (%) экспериментальных животных.

ID₁₀₀ – 100% заболеваемость

ID₅₀ – 50% заболеваемость и т.д.

Снижение вирулентности (аттенуация) – может происходить при длительном пассировании культуры на питательных средах, через организм маловосприимчивых животных и т.д.

Полная утрата вирулентности – следствие изменения генотипа.

Повышение вирулентности – при пассировании культуры через организм высоковосприимчивого животного, при лизогении, мутациях и рекомбинациях.

Факторы патогенности и вирулентности.

Факторы патогенности – материальные носители, выполняющие функции адгезии, колонизации, инвазивности и агрессивности, оказывающие повреждающее действие на ткани и органы.

Адгезия – комплементарное взаимодействие макромолекул поверхности микроорганизма и рецепторов эукариотической клетки. Обуславливает чувствительность к микроорганизму и органотропность. Структуры, ответственные за адгезию – **адгезины**.

Адгезины:

Грамотрицательные – фимбрии, пили, основные белки наружной мембраны; Грамположительные – белки и тейхоевые кислоты клеточной стенки; микоплазмы – макромолекулы выростов WGV/

Инвазивность (лат. *invassio* – нападение) – способность микроорганизма проникать через кожные покровы и слизистые оболочки во внутреннюю среду и распространяться по тканям и органам.

Агрессивность – способность противостоять защитным факторам организма и размножаться в нем.

Ферменты агрессивности и инвазии.

1. Гиалуронидаза – ферментирует гиалуроновую кислоту (основное межклеточное вещество соединительной ткани), способствует проникновению микроорганизма внутрь.

2. Нейраминидаза (сиалидаза) – ферментирует нейраминную (сиаловую) кислоту (в составе поверхностных рецепторов клеток слизистых оболочек) и обеспечивает доступность слизистых для взаимодействия с микроорганизмом.

3. Фибринолизин – растворяет сгусток фибрина, образующийся при воспалении, препятствующий проникновению микроорганизма внутрь тканей.

4. Коллагеназа – ферментирует коллаген мышечных волокон, вызывая их расплавление.

5. Лецитиназа С – ферментирует лецитин мембран мышечных волокон, эритроцитов и др. клеток.
6. Коагулаза – свертывает плазму крови.
7. Дезоксирибонуклеаза (ДНКаза) – вызывает деполимеризацию ДНК.
8. Протеазы – разрушают протеины (в том числе IgG и др.).

Вещества с антифагоцитарной активностью.

1. Капсульные полисахариды и полипептиды микроорганизмов: К- и Vi-Аг микрокапсул энтеробактерий, корд-фактор, слизистое вещество *Pseudomonas aeruginosa*, М-протеин β -гемолитических стрептококков А, А-протеин стафилококков.
2. Образование микроорганизмами веществ, способных противостоять внутриклеточному перевариванию; препятствующих слиянию фаго- и лизосом; способных вызывать лизис фагоцитов (лейкоцидины).

Антигенная мимикрия – сходство Аг-детерминант у микроорганизма и макроорганизма-хозяина, в результате микроорганизм не распознается иммунной системой, что способствует его *персистенции* в макроорганизме.

Токсины.

Важную роль в развитии инфекционного процесса играют токсины. По биологическим свойствам бактериальные токсины делятся на экзотоксины и эндотоксины. Экзотоксины продуцируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. По своей химической структуре это белки.

По механизму действия экзотоксина на клетку различают несколько типов: цитотоксины, мембранотоксины, функциональные блокаторы, эксфолианты и эритрогемины. Механизм действия белковых токсинов сводится к повреждению жизненно важных процессов в клетке: повышение проницаемости мембран, блокады синтеза белка и других биохимических процессов в клетке или нарушении взаимодействия и взаимокоординации между клетками. Экзотоксины являются сильными антигенами, которые и продуцируют образование в организме антитоксинов.

По молекулярной организации экзотоксины делятся на две группы:

- экзотоксины, состоящие из двух фрагментов;
- экзотоксины, составляющие единую полипептидную цепь.

По степени связи с бактериальной клеткой экзотоксины делятся условно на три класса.

- Класс А - токсины, секретируемые во внешнюю среду;
- Класс В - токсины частично секретируемые и частично связанные с микробной клеткой;
- Класс С - токсины, связанные и с микробной клеткой и попадающие в окружающую среду при разрушении клетки.

Экзотоксины обладают высокой токсичностью. Под воздействием формалина и температуры экзотоксины утрачивают свою токсичность, но сохраняют иммуногенное свойство. Такие токсины получили название

анатоксины и применяются для профилактики заболевания столбняка, гангрены, ботулизма, дифтерии, а также используются в виде антигенов для иммунизации животных с целью получения анатоксических сывороток.

Эндотоксины по своей химической структуре являются липополисахаридами (ЛПС), которые содержатся в клеточной стенке грамотрицательных бактерий и выделяются в окружающую среду при лизисе бактерий. Эндотоксины не обладают специфичностью, термостабильны, менее токсичны, обладают слабой иммуногенностью. При поступлении в организм больших доз эндотоксины угнетают фагоцитоз, гранулоцитоз, моноцитоз, увеличивают проницаемость капилляров, оказывают разрушающее действие на клетки. Микробные липополисахариды разрушают лейкоциты крови, вызывают дегрануляцию тучных клеток с выделением вазодилататоров, активируют фактор Хагемана (фактор свёртывания крови XII), что приводит к лейкопении, гипертермии, гипотонии, ацидозу, дессиминированной внутрисосудистой коагуляции (ДВК). Эндотоксины стимулируют синтез интерферонов, активируют систему комплемента по классическому пути, обладают аллергическими свойствами. При введении небольших доз эндотоксина повышается резистентность организма, усиливается фагоцитоз, стимулируются В-лимфоциты. Сыворотка животного иммунизированного эндотоксином обладает слабой антитоксической активностью и не нейтрализует эндотоксин.

Патогенность бактерий контролируется тремя типами генов: гены - собственной хромосомами, гены привнесенные плазмидами и умеренными фагами.

Периоды инфекционной болезни.

1. Инкубационный – с момента внедрения инфекционного агента в организм и до начала клинических проявлений.
2. Продромальный – с первых клинических проявлений (субфебрильная температура, недомогание, слабость, головная боль и т.д.).
3. Период основных (выраженных) клинических проявлений (разгар болезни) – наиболее существенные для диагностики специфические клинические и лабораторные симптомы и синдромы.
4. Период угасания клинических проявлений.

Период реконвалесценции – прекращение размножения возбудителя в организме больного, гибель возбудителя и полное восстановление гомеостаза.

Иногда на фоне клинического выздоровления начинает формироваться носительство – острое (до 3 мес), затяжное (до 6 мес), хроническое (более 6 мес).

Формы инфекционного процесса.

По происхождению:

1. Экзогенная инфекция – после заражения микроорганизмом извне
2. Эндогенная инфекция – вызвана микроорганизмами, находящимися в самом организме.

По локализации возбудителя:

1. Очаговая - возбудитель остается в месте входных ворот и не распространяется по организму.

2. Генерализованная – возбудитель распространяется по организму лимфогенно, гематогенно, периневрально.

Бактериemia – микроорганизм некоторое время находится в крови, не размножаясь в ней.

Септиcемия (сепсис) – кровь является постоянным местом обитания микроорганизмов и местом их размножения.

Токсинемия (антигенемия) – поступление в кровь антигенов и токсинов бактерий.

По числу видов возбудителей:

1. Моноинфекция – вызывается одним видом микроорганизмов.

2. Смешанная (mixt) – несколько видов одновременно вызывают заболевание.

По повторным появлениям заболевания, вызванного теми же или другими возбудителями:

1. Вторичная инфекция – к уже развившемуся заболеванию, вызванному одним видом микроорганизмов, присоединяется новый инфекционный процесс, вызванный другим видом микроорганизма (-ов).

2. Суперинфекция – повторное заражение больного тем же микроорганизмом с усилением клинической картины данного периода болезни.

3. Реинфекция – повторное заражение тем же видом микроорганизма после выздоровления.

Эпидемический процесс – процесс возникновения и распространения специфических инфекционных состояний, вызванных циркулирующим в коллективе возбудителем.

Звенья эпидемического процесса:

1. Источник инфекции

2. Механизм и пути передачи

3. Восприимчивый коллектив

Классификация по источнику инфекции:

1. Антропонозные инфекции – источником инфекции служит только человек.

2. Зоонозные инфекции – источником являются больные животные, но может болеть и человек.

3. Сапронозные инфекции – источником инфекции являются объекты окружающей среды.

Механизм передачи – способ перемещения возбудителя из зараженного организма в восприимчивый организм.

Осуществляется в 3 фазы:

1. Выведение возбудителя из организма хозяина
2. Пребывание в объектах окружающей среды
3. Внедрение возбудителя в восприимчивый организм.

Различают: фекально-оральный, аэрогенный (респираторный), кровяной (трансмиссивный), контактный, вертикальный (от матери к плоду).

Пути передачи – элементы внешней среды или их сочетание, обеспечивающее попадание микроорганизма из одного макроорганизма в другой.

Локализация возбудителей в организме	Механизм передачи	Пути передачи	Факторы передачи
ЖКТ	Фекально-оральный	Алиментарный Водный Контактно-бытовой	Пища Вода Грязные руки, посуда
Респираторный тракт	Аэрогенный (респираторный)	Воздушно-капельный Воздушно-пылевой	Воздух Пыль
Кровь	Кровяной	Через укусы кровососущих насекомых и др. Парентеральный Половой	Эктопаразиты Кровь Шприцы, хирургический инструментарий, инфузионные растворы и т.д.
Наружные покровы	Контактный	Раневой Контактно-половой	Режущие предметы, пули и т.д.
Зародышевые клетки	Вертикальный	Вертикальный	

Классификация по степени интенсивности эпидемического процесса.

1. **Спорадическая заболеваемость** – обычный уровень заболеваемости данной нозологической формой на данной территории в данный исторический отрезок времени.

2. **Эпидемия** – уровень заболеваемости данной нозологической формой на данной территории в конкретный отрезок времени, резко превышающий уровень спорадической заболеваемости.

3. **Пандемия** – уровень заболеваемости данной нозологической формой на данной территории в конкретный отрезок времени, резко превышающий уровень эпидемии.

Классификация эпидемий:

1. **Природно-очаговая** – связана с природными условиями и ареалом распространения резервуаров и переносчиков инфекции (напр., чума).
2. **Статистическая** – обусловлена комплексом климато-географических и социально-экономических факторов (напр., холера в Индии и Бангладеш).

Практическое занятие №9

Иммунитет. Виды и формы проявления иммунитета. Типа иммунного ответа. Врожденный иммунитет. Врожденные факторы защиты организма. Клетки и рецепторы врожденного иммунитета.

Для врача очень важно иметь представление об иммунитете как о способе защиты постоянства внутренней среды организма от генетически чужеродных агентов, в том числе от патогенных микроорганизмов. Иммунология внесла значительный вклад в такие области современной медицины, как переливание крови, вакцинация, трансплантация органов, лечение аллергии, аутоиммунных болезней и рака. Мощным фактором защиты организма от микроорганизмов является врождённый (видовой) иммунитет, который представляет собой совокупность анатомо–физиологических приспособлений организма. Приобретённый (адаптивный) иммунитет формируется в результате попадания или введения в организм антигена.

Цель самоподготовки

После самостоятельного изучения темы студент должен знать:

- определение понятия иммунитет, виды иммунитета;
- клеточные и гуморальные факторы врождённого (видового) иммунитета;
- антигены, способы их получения и практическое применение.

Исходный уровень знаний

Из курса биологии и гистологии вспомнить клетки крови, их морфологию; приготовление мазка из крови, фиксацию, окраску.

Цель занятия

1. Познакомиться с клеточными и гуморальными механизмами врождённого иммунитета (фагоцитоз, лизоцим, комплемент, интерфероны).
2. Освоить методы оценки факторов врождённого иммунитета организма человека.
3. Выработать чёткое представление об антигенах, их разнообразии, свойствах.

План изучения темы

1. Иммунитет, виды иммунитета.

2. Факторы врождённого иммунитета.

3. Антигены, свойства антигенов, методы получения.

В процессе самоподготовки используйте конспект лекций, учебник, руководство к практическим занятиям. Просмотрите дополнительный материал в пособии, ответьте на контрольные вопросы и решите задачи.

После изучения темы студент должен уметь

1. Оценить факторы врождённого иммунитета организма (гуморальные и клеточные).

Актуальность темы:

В организме человека постоянно происходят сложные процессы и явления, которые поддерживают функциональную целостность организма, постоянство химического и клеточного состава внутренней среды, то есть, гомеостаз. Защита организма от чужеродных агентов происходит на двух уровнях: неспецифической резистентности и специфического иммунитета. Первый, филогенетический более ранний уровень, - это неспецифические факторы защиты (НФЗ), действующие против любого чужеродного агента.

К НФЗ относятся защитные функции кожи, слизистых оболочек, лимфатических узлов, желудочный сок, гидролитические ферменты; продукция ингибиторов, лизоцима, интерферона и другие; антагонистичные свойства микрофлоры человека; бактерицидные свойства крови: комплемент, бета-лизины, лейкины, нормальные антитела и другие вещества, имеющие бактерицидное действие; фагоцитоз.

Механизмы неспецифической резистентности функционируют в организме постоянно и обуславливают в случаях микробной инвазии и (или) другого дестабилизирующего воздействия воспалительную реакцию, одинаковую для разных возбудителей.

Своевременное определение изменений количественного, качественного или функционального состояния различных факторов неспецифической защиты дает возможность оценить состояние иммунной системы человека, помочь в диагностике, профилактике и терапии инфекционных и неинфекционных заболеваний. Это обуславливает актуальность темы занятия и формирует позитивную мотивацию ее изучения.

Таблица 2. Основные факторы врождённого и приобретённого иммунитета

Система врождённого иммунитета	
Гуморальные факторы	Клеточные факторы
- Лизоцим; - лактоферрин; - комплемент; - пептиды-антибиотики; - острофазовые белки; - доиммунные цитокины (ИФН α/β , ФНО- α , ИЛ-1 β и др.); - калликреин-кининовая система; - фактор Хагемана; - эйкозаноиды; - тромбоцитарноактивирующий фактор и др.	- Дендритные клетки; - моноциты; - макрофаги; - нейтрофилы; - естественные киллеры; - эозинофилы; - базофилы крови; - тучные клетки; - тромбоциты; - эритроциты
Факторы, занимающие промежуточное положение	
Гуморальные факторы	Клеточные факторы
- Естественные антитела	- γ/δ Т-лимфоциты; - естественные киллерные Т-клетки
Система приобретённого иммунитета	
Гуморальные факторы:	Клеточные факторы
- Специфические антитела разных классов (M, G, A, E, D)	- Т-лимфоциты; - В-лимфоциты; - плазматические клетки

Базовые знания, умения, навыки, необходимые для изучения темы (междисциплинарная интеграция).

Названия предыдущих дисциплин	Полученные навыки
Анатомия человека	Анализировать информацию о телосложении человека, составляющих его систем, органов и тканей.
Гистология, цитология, эмбриология	Интерпретировать микроскопическую и субмикроскопическую структуру клеток.
Медицинская и биологическая физика	Трактовать общие физические и биофизические закономерности, которые лежат в основе биологических процессов.
Медицинская биология	Объяснять на молекулярно-биологическом и клеточном уровне закономерности биологических процессов.
Медицинская химия	Трактовать общие физико-химические закономерности, которые лежат в основе процессов развития клеток.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:

Термин	Определение
Иммунитет	Иммунитет - это совокупность процессов и механизмов, которые обеспечивают постоянство антигенного состава организма и его защиту от инфекционных и других чужеродных для него агентов.

Неспецифические факторы защиты (НФЗ)	К неспецифическим факторам защиты, которые эволюционно возникли раньше специфического иммунитета, принадлежат неспецифические механизмы, физико-химические, клеточные, гуморальные, а также физиологические защитные реакции, которые обеспечивают сохранение постоянства внутренней среды и возобновление нарушенных функций макроорганизма. НФЗ действуют постоянно, быстро, против любого чужеродного агента. К НФЗ относятся барьерная функция кожи, слизистых оболочек, лимфатических узлов, бактерицидные вещества жидкостей организма (слюны, сыворотки крови и др.), выделительная функция, температурная реакция, антагонистичные свойства нормальной микрофлоры и др.
Лизоцим	Лизоцим - это фермент (ацетилмураминидаза), который разрушает пептидополисахариды клеточной стенки бактерий, в первую очередь, грамположительных, в которых клеточная стенка на 90% состоит из муреина. Лизоцим синтезируется макрофагами и обеспечивает бактерицидные свойства крови, слюны, слез.
Комплемент	Комплемент - это сложный комплекс белков крови, который состоит из 9 фракций, каждая из которых имеет определенные свойства. Комплемент синтезируется клетками печени и выполняет ряд функций: 1) вызывает лизис микробов и других клеток; 2) участвует в специфических иммунологических реакциях, нейтрализации вирусов; 3) усиливает фагоцитоз, хемотаксис, воспаление.
Пропердин	Пропердин - это высокомолекулярный (230 тыс. дальтон) белок сыворотки крови, который принимает участие в альтернативном пути активации комплемента, обезвреживает некоторые бактерии и вирусы, стимулирует фагоцитоз.
Фагоцитоз	Фагоцитоз - это наиболее ранняя форма защиты, активное поглощение и переваривание специализированными клетками живых или убитых микроорганизмов или других посторонних частиц, попавших в него. Фагоцитарную функцию выполняют два типа клеток: 1) макрофаги (нейтрофилы, эозинофилы); 2) макрофаги подвижные (моноциты, гистиоциты) и неподвижные (клетки селезенки, лимфатической ткани, эндотелиоциты печени, эндотелий кровеносных сосудов и др.).
Незавершенный фагоцитоз	Незавершенный фагоцитоз - это фагоцитоз, при котором микроорганизмы поглощаются фагоцитами, но не погибают и не перевариваются, а иногда и размножаются, вызывая гибель фагоцитов.
Воспалительная реакция	Воспалительная реакция - это реакция, при которой из тканей высвобождаются различные вещества (лейкотоксины, лейкопенический фактор, гистамин, серотонин и др.), активирующие лейкоциты, которые не дают распространяться бактериям в ткани, крови и органах. Воспаление приводит к

	повышению температуры тела, возникновению ацидоза и гипоксии, губительно действующих на микроорганизмы.
интерференции вирусов	интерференции вирусов – явления, когда животные или культуры клеток, инфицированные одним вирусом, становились нечувствительными к заражению другим вирусом. Оказалось, что интерференция обусловлена образующимся при этом белком, обладающим защитным противовирусным свойством. Этот белок назвали интерфероном.
Интерфероны	Интерфероны - это группа индуцибельных низкомолекулярных белков, которые осуществляют контрольно-регуляторные функции, направленные на сохранение клеточного гомеостаза. Важнейшие из этих функций: противовирусная, противоопухолевая, иммуномодулирующая, антибактериальная и радиопротективная. Интерфероны синтезируются лимфоцитами, лейкоцитами, фибробластами, клетками лимфатических узлов и делятся на три типа: α - (лейкоцитарный), β - (фибробластный) и γ -интерферон (лимфоцитарный, или иммунный). Индукторами синтеза интерферона могут быть вирусы, бактерии, грибы, экстракты растений, синтетические соединения, разные лекарственные средства, излучения и другие.
Белки острой фазы (БОФ)	Белки острой фазы - это большая группа белков, которые усиленно продуцируются в организме во время возникновения воспалительных реакций после инфицирования или повреждения, при онтогенезе, беременности и имеют антимикробное действие, способствуют фагоцитозу, активации комплемента, формированию и ликвидации воспалительного очага. Основную массу БОФ составляет С-реактивный белок, сывороточные амилоиды А и Р. Другие БОФ - это факторы свертывания крови, металлосвязывающие белки, ингибиторы протеаз и некоторые компоненты комплемента.
Бета-лизины	Бета-лизины - это термостабильные (разрушаются при температуре 65-70 ⁰ С) бактерицидные факторы, которые проявляют наибольшую активность по отношению к анаэробам и спорообразующим аэробам.
Ингибиторы вирусной активности	Ингибиторы вирусной активности - это первый гуморальный барьер, который препятствует контакту вируса с чувствительными клетками. Термостабильные ингибиторы способны инактивировать инфекционные, токсичные, гемагглютинирующие свойства чувствительных к ним штаммов вирусов. Термостабильные – блокируют связывание вирусов с рецепторами клеток хозяина. Люди с высоким уровнем ингибиторов в крови имеют большую стойкость к вирусным инфекциям.
Цитокины	Цитокины - это гормоноподобные медиаторы межклеточных взаимодействий, которые продуцируются различными клетками организма и способны влиять на функции других или этих же

групп клеток. Цитокины - пептиды или гликопротеиды; регуляторами продукции цитокинов могут быть другие цитокины, гормоны, простагландины, антигены и много других агентов, действующих на клетку.

Теоретические вопросы к занятию:

- Виды специфического иммунитета, которые обуславливают защиту организма от живых тел и веществ, которые несут признаки генетической чужеродной информации.
- Факторы неспецифической защиты организма и их особенности у взрослых и детей.
- Приоритет отечественных ученых в открытии факторов неспецифической защиты организма.
- Фагоцитоз. Клетки, способные к фагоцитозу. Стадии этого явления.
- Комплемент, его компоненты. Активация комплемента. Способы его определения.
- Пропердиновая система. Ее природа, свойства и значение.
- Лизоцим, его природа. Действие лизоцима на микроорганизмы и способы его определения.
- Почему нормальная микрофлора отнесена к неспецифическим факторам защиты?
- Типы интерферонов. Их роль в противовирусном, противоопухолевом иммунитете, регуляции иммунных функций организма.
- Практическое значение определения титра комплемента, лизоцима, фагоцитоза и других показателей неспецифической защиты организма.

Практические задания, выполняемые на занятии:

- Овладеть методикой определения лизоцима в слюне человека титрационным методом.
- Осуществить учет реакции титрования комплемента в сыворотке крови по 100% гемолизу, рассмотреть постановку и особенности этой реакции.
- Ознакомиться с явлением незавершенного фагоцитоза в демонстрационных препаратах.

Содержание темы:

Иммунитет – способ защиты организма от генетически чужеродных веществ – антигенов экзогенного и эндогенного происхождения.

Классификация видов и форм иммунитета.

По происхождению:

1. **Наследственный** (врожденный, видовой) - генетически закрепленная невосприимчивость к определенным возбудителям болезней или антигенам. Видовой иммунитет может быть *абсолютным* (напр., нечувствительность человека к вирусам бактерий) или *относительным* (напр., восприимчивость к возбудителю сибирской язвы у кур появляется после переохлаждения).

Данный вид иммунитета обеспечивается неспецифическими факторами иммунной защиты:

а) механические барьеры (кожа и слизистые, слизь и реснитчатый эпителий верхних дыхательных путей)

б) физико-химические барьеры (ферменты, соляная кислота желудочного сока, альдегиды и жирные кислоты потовых и сальных желез)

с) иммунобиологические барьеры (клеточные - фагоцитоз, гуморальные - система комплемента, интерферон, защитные белки крови).

2. Приобретенный - формируется в процессе жизни, в результате перенесенного инфекционного заболевания (постинфекционный) или в результате вакцинации (поствакцинальный), а также путем передачи антител от матери к плоду.

Формы приобретенного иммунитета:

а) Естественный врожденный – связан с переносом IgG от матери к плоду через плаценту (передача по вертикали). Это обеспечивает устойчивость новорожденного ко многим возбудителям в течение некоторого периода (обычно около 6 мес от момента рождения).

б) Естественный приобретенный (постинфекционный) – развивается после перенесенных инфекционных заболеваний, протекавших в клинически выраженной форме либо после скрытых контактов с микробными антигенами. Он может быть *стерильным* (невосприимчивость сохраняется и после элиминации возбудителя из макроорганизма – дифтерия, брюшной тиф) и *нестерильным* (обусловлен наличием инфекционного агента в организме, не является следствием перенесенного заболевания - туберкулез)

2. в) Искусственный активный – развивается после иммунизации ослабленными или убитыми микроорганизмами либо их антигенами. В обоих случаях организм активно участвует в создании невосприимчивости. Как правило, такая невосприимчивость устанавливается через несколько недель после иммунизации, по наследству не передается.

г) Искусственный пассивный – достигается введением готовых антител. В таких ситуациях иммунная система не участвует в своевременном развитии соответствующих иммунных реакций. Такая невосприимчивость развивается быстро, обычно через несколько часов после введения препарата, сохраняется недолго и исчезает по мере удаления донорских антител из кровотока.

По направленности действия:

1. Антимикробный – направлен на элиминацию возбудителя из макроорганизма.

2. Антитоксический – направлен на нейтрализацию токсинов (эндо- и экзотоксинов), продуцируемых микроорганизмами.

По механизму действия:

1. Клеточный – реализуется при участии иммунокомпетентных клеток, обеспечивающих иммунный ответ (Т- и В-лимфоциты, естественные киллеры, фагоцитирующие клетки – нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки).

2. Гуморальный – реализуется циркулирующими в средах организма антителами.

Иммунная система функционирует как единое целое. Все ее параметры взаимосвязаны и находятся в постоянном динамическом равновесии. Постоянство иммунологического надзора организма осуществляется за счет баланса между уровнями активности структурных компонентов иммунной системы. Но при различных патологических состояниях показатели иммунитета могут отклоняться от нормальных величин, что имеет как диагностическое, так и прогностическое значение. Поэтому определение отдельных звеньев иммунной системы приобретает огромное значение.

Неспецифические факторы иммунной защиты.

1. Фагоцитоз.

Механизм – поглощение, переваривание, инактивирование инородных для организма веществ специализированными клетками – фагоцитами.

Функции фагоцитов:

- 1) удаление из организма отмирающих клеток и их структур;
- 2) удаление неметаболизированных неорганических веществ;
- 3) поглощение и инактивирование микроорганизмов, их остатков и продуктов;
- 4) синтез биологически активных веществ (некоторые компоненты комплемента, лизоцим, интерферон, интерлейкины);
- 5) участие в регуляции иммунной системы;
- 6) презентация («ознакомление») Т-хелперов с антигенами.

Стадии фагоцитоза:

- 1) приближение фагоцита к объекту поглощения (хемотаксис)
- 2) адсорбция поглощаемого вещества на поверхности фагоцита
- 3) поглощение вещества путем инвагинации клеточной мембраны с образованием в цитоплазме фагосомы, содержащей вещество
- 4) слияние фагосомы с лизосомой с образованием фаголизосомы
- 5) переваривание вещества в фаголизосоме с помощью ферментов.

Фагоциты способны перемещаться к объекту фагоцитоза по градиенту концентрации биологически активных веществ – хемоаттрактантов или хемокинов. Такое передвижение названо хемотаксисом.

Стадии фагоцитоза: 1) хемотаксис – является результатом воспалительной реакции (изменение pH) и осуществляется за счет передвижения фагоцитов в направлении химического градиента, связан с наличием специфических рецепторов на мембране фагоцитов 2) адгезия (адсорбция) – прикрепление – опосредовано соот рецепторами. Адгезия бывает: обратимая – физико-химическое взаимодействие микроба и клетки и необратимая – биологическая связь, обеспечивается за счет специфических рецепторов) 3) проникновение а) эндоцитоз – различают: фагоцитоз – частицы не менее 0,1 микрометра, пиноцитоз менее 0,1 мкм, вироциклизис – вирусы, провирусы, прионы. В результате эндоцитоза образуется фагоцитарная вакуоль – первичная фагосома (окаймленный пузырек +

цитозоль клетки) б) Экзоцитоз – выведение продуктов переваривания 4) образование вторичной фагосомы (слияние первичной фагосомы и лизосомы), образование фаголизосомы 5) внутриклеточное переваривание – происходит в фаголизосоме, микроорганизм погибает в результате микробоцидности.

Механизм микробоцидности

– кислородозависимый и кислороднезависимый.

Кислородзависимые вещества

– продукты метаболизма кислорода – дыхательный взрыв в результате фагоцитоза. К ним относятся: супероксидный анион радикал, перекись водорода, гидроксидный радикал. Механизм действия – вызывают ПОЛ преимущественно Гр – флоры.

Кислороднезависимые вещества

– продукты гранул микрофагов (лейкоцитов) в очаге воспаления. К ним относятся: миелотраксидаза, лактопероксидаза, каталаза (регулирует процессы ПОЛ), лактоферин (препятствует колонизации бактерии, обладает жадностью к железу, связывает его и препятствует бинарному делению).

Дефензины – группа лизосомных катионных белков, небольшой молекулярной массы, высвобождаются при экзоцитозе из гранул. Механизм действия: обладают сродством к поверхности клеточных мембран бактерий, происходит адсорбция, что приводит к нарушению целостности клеточных мембран.

Фагоцитоз бывает завершенным – норма для взрослых, и незавершенным – норма для детей.

Незавершенный фагоцитоз – сохранение вирулентных бактерий внутри вторичной фагосомы, способных к длительной персистенции, колонизации, размножению. Причины незавершенного фагоцитоза: 1) препятствие слиянию фагосомы и лизосомы за счет антифагинов – веществ выделенных микроорганизмом (гонококки) 2) устойчивость к действию лизосомальных ферментов за счет клеточной стенки – туберкулез, ЛПС – Гр – флора, капсула и т.д. 3) способность покидать фагосому до ее слияния с лизосомой и уходить в цитоплазму клетки (хламидии, риккетсии, вирусы).

Гуморальные факторы неспецифической защиты:

1) система интерферона 2) система комплемента 3) антиоксидантная система 4) отдельные факторы неспецифической защиты.

Система интерферона.

Интерферон – это гликопротеид с вариабельной М 12-160000, устойчив к низким температурам, нагреванию, ультрафиолетовым лучам, кислотам, щелочам; не теряют реактивности в диапазоне рН 2,0-10,0, не обладает токсичностью. 1957 г. – Аэсон открыл интерферон. Система интерферона подчиняет геном расположенный во 2 и 5 паре хромосом. Существует целая система интерферонов, выделяют 3 основных типа интерферонов: 1) **альфа интерферон** – лимфоцитарный интерферон, получают в культуре лейкоцитов крови донора *in vitro*, обладает противовирусным и противоопухолевым

действием. 2) **бета интерферон** – фибробластный – получают в полупревиваемых культурах фибробластов человека, обладают выраженной противоопухолевой активностью, преобладающей над противовирусной. 3) **гама интерферон** – иммунный – получают в перевиваемых культурах лимфо-бластоидных клеток под действием митогенов бактериального и растительного происхождения. Главное действие – иммуномодулирующее.

Основные свойства системы интерферона: 1) универсальность, активен против любых вирусов 2) выражается тканевая специфичность, активен только в гомологичных системах 3) наличие эффекта последствия – длительное время сохраняет способность препятствовать размножению вируса в клетках, даже после отмыва 4) отсутствие токсического действия – работа интерферона не нарушает жизнедеятельности клетки 5) высокая эффективность действия – небольшое количество интерферона обладает выраженной противовирусной активностью.

Механизм действия системы интерферона: 1) развитие антивирусного состояния – блокада проникновения вируса в клетку 2) после проникновения вируса в клетку вирусная РНК индуцирует образование РНК протеинкиназы – фермента аутофосфорилирования. Затем фосфорилирует акт элонгации 2, что нарушает сборку белковой молекулы. Двухнитевая вирусная РНК индуцирует синтез 2'5'-олигоденилатсинтетазы, что приводит к активированию латентных эндонуклеаз и как следствие разрушение вирусной матричной РНК.

Интерферон индуцирует

Образование 2'5'-олигоденилат образование протеинкиназы синтетазы

синтез аденилового тринуклеотида фосфорилирование и инактивация фактора элонгации 2

активация эндонуклеаз

ингибирование синтеза белков

деградация вирусной матричной РНК

Вывод: интерферон действует на 1) уровне транскрипции – препятствует формированию на базе генной РНК информационной или матричной РНК, следовательно, происходит ее деградация и создается препятствие трансляции. 2) уровне трансляции – синтез белка в рибосомах, нарушает процесс формирования вирусных белков, что делает невозможным образование вирусных частиц и как следствие развитие инфекционного процесса.

Определение фагоцитарной активности нейтрофилов.

В пробирку с одним объемом стерильного 2% раствора цитрата натрия вносят два объема свежезятой крови и один объем взвеси бактерий, содержащей 1 млрд/мл микробных клеток, убитых нагреванием при 80°C в течение 1ч. Содержимое пробирки перемешивают, инкубируют в течение 30 мин при 37°C, затем готовят мазки и окрашивают по Романовскому-Гимзе.

Учет фагоцитарной активности нейтрофилов проводят, определяя процент нейтрофилов с фагоцитированными клетками бактерий (фагоцитарное число) и

количество поглощенных клеток бактерий из расчета на один нейтрофил (фагоцитарный индекс). В каждом препарате учитывают не менее 200 клеток.

На практическом занятии студенты должны овладеть методикой определения титра лизоцима в слюне человека; рассмотреть постановку и особенности реакции титрования комплемента по 100% гемолизу, осуществить учет этой реакции на демонстрации; изучить явление незавершенного фагоцитоза на демонстрационных препаратах. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

Рекомендации для оформления протокола

Схема титрования лизоцима в слюне

№ пробирки ингредиенты, мл.	Опытная						Контрольная
	1	2	3	4	5	6	7
0,0,5% раствор NaCl	1,8	1	1	1	1	1	1
Исследуемая слюна	0,2	1	1	1	1	1	
Полученное разведение	1:1 0	1:2 0	1:4 0	1:80	1:16 0	1:32 0	
2-х миллиардная взвесь M.lysodeikticus	1	1	1	1	1	1	1
Конечное разведение	1:2 0	1:4 0	1:8 0	1:16 0	1:32 0	1:64 0	
1 мл							
В термостат на 1 час при температуре 37 ⁰ С (предыдущий учет). Конечный учет через 24 часа содержания в термостате при температуре 37 ⁰ С. Титр лизоцима - это то, наибольшее разведение сыворотки, которое еще способно давать полный лизис бактерий (M.lysodeikticus)							

Схема титрования комплемента в сыворотке крови человека по 100% гемолизу.

№ пробирки Ингредиенты (мл)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Исследуемая сыворотка разведения 1:10	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,2
Физраствор	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,3
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
В термостат на 40-50 минут при температуре 37 ⁰ С											
Результат*	--Г	--Г	--Г	++Г	++Г	++Г	++Г	++Г	++ Г	++ Г	++ Г

Примечание: *-г - нет гемолиза; +Г - есть гемолиз.

Гемолитическая система - это смесь равных объемов разведенной по трехкратному титру гемолитической сыворотки и 3-5% взвеси бараньих эритроцитов. Смесь выдерживают при 37⁰С в термостате 30 минут для сенсibilизации эритроцитов.

Титр комплемента - это наименьшее количество исследуемой сыворотки, которое способствует полному гемолизу добавленного количества сенсibilизированных эритроцитов.

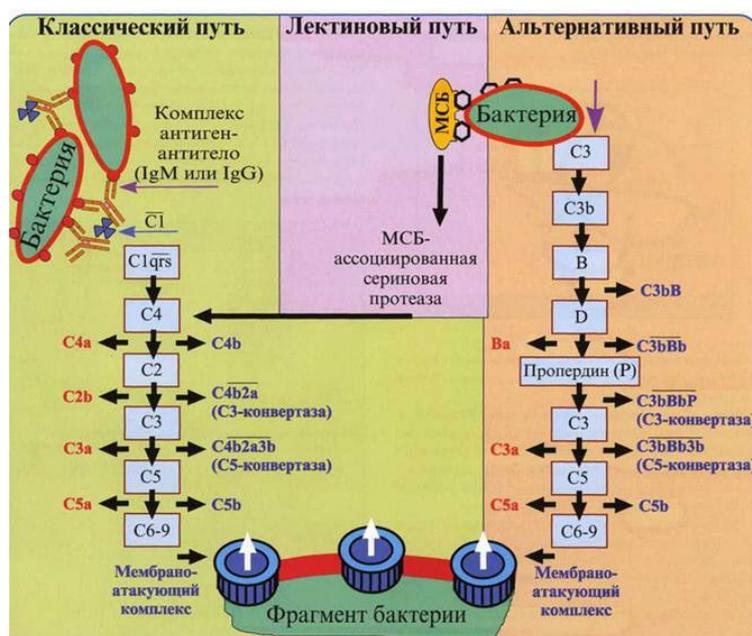
Система комплемента

Система комплемента является частью иммунной системы, она осуществляет *неспецифическую защиту* от бактерий и других проникающих в организм возбудителей болезней. Система комплемента состоит примерно из 20 различных белков — «*факторов (компонентов) комплемента*», которые находятся в плазме крови и составляют около 4% от всех белков плазмы.

А. Активация комплемента

Система комплемента может действовать тремя различными способами:

- **через хемотаксис:** различные компоненты (факторы) комплемента могут привлекать иммунные клетки, которые атакуют бактерии и пожирают их (фагоцитируют);
- **через лизис:** компоненты комплемента присоединяются к бактериальным мембранам, в результате чего образуется отверстие в мембране и бактерия лизируется;
- **через опсонизацию:** компоненты комплемента присоединяются к бактерии, в результате чего образуется метка для узнавания фагоцитирующими клетками (например, макрофагами и лейкоцитами), имеющими рецепторы к компонентам комплемента.



Реакции системы комплемента осуществляются, как правило, молекулами на поверхности микроорганизма. **Факторы** (компоненты) **с С1 по С9** (С от англ. complement) формируют так называемый «классический путь» (1) активации комплемента, **факторы В и D** участвуют в активации «альтернативного пути» (2). Другие компоненты системы комплемента, здесь не показанные, выполняют регуляторные функции.

Ранние компоненты системы комплемента являются сериновыми протеиназами. Они создают амплифицирующий ферментативный каскад реакций. Классический путь инициируется связыванием **компонента С1** (3) с несколькими молекулами IgG или с пентамерным IgM на поверхности микроорганизма (см. ниже). Альтернативный путь инициируется связыванием **фактора В**, например, с бактериальным липополисахаридом (эндотоксином). Оба пути ведут к расщеплению компонента **С3** *С3-конвертазой* комплемента на два фрагмента С3а и С3b, обладающих различными функциями. Меньший фрагмент **С3а** принимает участие в развитии воспалительного процесса, индуцируя хемотаксис лейкоцитов к очагу воспаления (*хемотаксис, воспалительные процессы*). Более крупный фрагмент **С3b** связывается ковалентно на поверхности бактериальной клетки и инициирует цепь реакций, приводящих к образованию *мембраноатакующего комплекса* поздними компонентами системы комплемента.

Мембрано-атакующий комплекс — это ионный канал (пора), в плазматической мембране бактериальной клетки, в формировании которого участвуют компоненты С3b, С5b, С6, С7, С8 и главным образом С9 (5). При этом молекулы С9 последовательно присоединяются к агрегату, формируя кольцевую структуру, через центр которой могут диффундировать небольшие молекулы, такие, как вода и ионы. Осмотические силы способствуют «накачиванию» воды внутрь бактериальной клетки, которая набухает и лопается (*лизирует*).

Врождённые Лимфоидные Клетки (Innate Lymphoid Cells)

Врождённые лимфоидные клетки (ВЛК) это группа лимфоцитов которые вовлечены в быстрое цитокин-зависимое реагирование организма во время воспалительного процесса.

Они играют важную роль в гомеостазе органов тканей и в иммунном ответе организма на внешние раздражители а также регулируют процессы развития клеток приобретённого иммунитета.

В отличии от "обычных" лимфоцитов приобретённого иммунитета у ВЛК отсутствуют антиген-специфичные рецепторы, они могут реагировать на широкий спектр воспалительных стимулов.

Как и Т-хелперы, ВЛК имеют общего предшественника охарактеризованного как клетка экспрессирующая транскрипторный фактор **inhibitor of DNA binding 2 (ID2)**.

На сегодняшний день выделяют три группы ВЛК в зависимости от их функции и экспрессии воспалительных медиаторов (Рисунок 1).

1-ая группа ВЛК делят множество характеристик с естественным киллерам (ЕК) (Natural killer, NK cells). Также как и ЕК, 1-тип ВЛК экспрессируют **интерферон-γ** и нуждаются в транскрипторном факторе **T-bet** для своего развития, но в отличие от ЕК, они не экспрессируют перфорин, гранзим В

(granzyme B) и рецептор киллерных клеток (Killer-cell Ig-like receptor) и также активизируются в основном на интерлейкин-7 (ИЛ-7) чем ИЛ-15. Высокое содержание 1-го типа ВЛК были обнаружены в кишечнике пациентов страдающие болезнью Крона.

2-ая группа ВЛК имеют способность продуцировать **ИЛ -13, -5 и -9.** Впервые эта популяция клеток была описана в контексте анти-гельминтной реакции организма. Исследователи показали что 2-ой тип ВЛК стимулирует эозинофилию и гиперплазию бокаловидных клеток, два важных процесса в анти-глистном ответе организма. Также недавно, 2-ой тип ВЛК был обнаружен в лёгких и играет важную роль в патофизиологии астмы. Для дифференциации во 2-ой тип ВЛК необходима активация таких транскрипторных факторов как retinoic acid receptor–related orphan receptor (**ROR**) α и **Gata3**.

3-я группа ВЛК для своего развития также нуждаются в **Gata3** и **ROR- γ t**. Эта группа делится на 3 под-группы. 1) Клетки индуцирующие лимфоидную ткань (Lymphoid tissue inducer, LTi) , они необходимы для лимфоидного органогенеза и продуцируют **ИЛ -17 и -22.** 2) ИЛ-22 продуцирующие ВЛК (natural cytotoxicity receptor, NCR позитивные) участвуют в защите организма от внешних патогенов. 3) ИЛ-17 продуцирующие ВЛК (NCR негативные) были обнаружены у пациентов страдающие язвенным колитом, также существуют исследования показывающие вовлечение этой группы клеток в прогрессии астмы и других аллергически-воспалительных процессах.

Что мы знаем....

ВЛК это новая популяция лимфоцитов, охарактеризованная относительно недавно.

ВЛК может продуцировать широкий спектр цитокинов.

ВЛК реагирует в НЕ антиген зависимой манере.

ВЛК функционируют независимо от клеток приобретённого иммунитета но в тоже время влияют на приобретённый иммунитет.

Что не знаем.....

Как ВЛК взаимодействуют с клетками приобретённого иммунитета т.к. Т-хелперы.

Изначально ВЛК это очень малочисленная популяция клеток но в критических ситуациях (воспаление, защита от инфекционных патогенов),эта популяция клеток резко увеличивается. И остаётся неизвестным механизмы запускающие экспансию ВЛК.

Существуют ли дополнительные суб-группы ВЛК?

Литература:

Nature Reviews Immunology (2013) 13, 75-87

Immunology and Cell Biology (2013) 91, 215–224

Curr Opin Immunol (2014) 27, 75–82

Функции нормальной микрофлоры

1) антагонисты гнилостной микрофлоры (продуцируют молочную и уксусную кислоты);

- 2) регуляция водно-солевого обмена, газового обмена, обмена белков, углеводов, нуклеиновых и жирных кислот, холестерина;
- 3) продуцируют биологически активные соединения – антибиотики, витамины;
- 4) участвуют в физиологическом воспалении слизистой и обновлении эпителия;
- 5) участвуют в процессе переваривания, детоксикации экзогенных субстратов и метаболитов (сравнивается с функцией печени)
- 6) разрушают канцерогенные вещества (антимутагенная роль)
- 7) формирует биологическую пленку – гликокаликс, выстилающий слизистые; он состоит из микробных тел Грам - нормальной микрофлоры слизистых. Защищает от физико-химических и биологических воздействий
- 8) формирует и поддерживает иммунитет за счет аг свойств (мурамилдипептид)
- 9) участвует в колонизационной резистентности (совокупность защитных факторов организма и конкурентных антагонистических свойств анаэробов, что препятствует колонизации патогенных микробов).

Изучить явление незавершенного фагоцитоза на демонстрационных препаратах.

Вопросы для самоконтроля.

- Что изучает иммунология?
- Перечислите факторы неспецифической защиты организма. Преимущества и недостатки механизмов неспецифической резистентности.
- Каков приоритет отечественных ученых в открытии факторов неспецифической защиты организма?
- Фагоцитоз. Клетки, способные к фагоцитозу. Виды фагоцитоза. Как происходит фагоцитоз?
- Комплемент, его компоненты. В чем сходство и различие двух путей активации комплемента? Каковы способы его определения?
- Пропердиновая система. Какова ее природа, свойства и значение?
- Что такое лизоцим; его природа? Как действует лизоцим на микроорганизмы? Каковы способы его определения?
- Дайте определение понятия "цитокины". Их иммуномодулирующее и защитное действие.
- Что представляют собой интерфероны? Назовите основные разновидности, их роль в противовирусной, противоопухолевой защите и иммуномодулирующей функции организма?
- Практическое значение определения комплемента, лизоцима, фагоцитоза и других показателей неспецифической защиты организма.

Практическое занятие №10

Адаптивный иммунитет. Т- и В-лимфоциты. Характеристика антигенов. Презентация антигенов. Активация лимфоцитов.

Противоинфекционный иммунитет. Иммунологический метод исследования - серологические реакции. Иммуноглобулины как продукт гуморального иммунного ответа.

Актуальность темы:

Методика лечения инфекционного заболевания определяется биологическими особенностями возбудителя. Врач должен не только поставить клинический диагноз, но и определить, какой микроорганизм вызывал инфекцию. Этиологическая диагностика многих инфекционных заболеваний основана на выделении чистой культуры возбудителя и определении ее видовой принадлежности. Идентификация большинства бактерий и вирусов базируется на определении специфических антигенов, которое требует проведения серологических реакций. Целью такого исследования является серологическая идентификация. Кроме того, диагностика инфекционных заболеваний может основываться на выявлении специфических микробных антигенов непосредственно в материале больного (крови, ликворе, моче, др.), особенно в случае невозможности культивирования возбудителей и идентификации их другими методами.

С другой стороны, иммунный ответ организма проявляется, в частности, формированием специфических антител к каждому отдельному виду возбудителя. Это позволяет поставить этиологический диагноз путем выявления этих антител. Для этого проводится постановка серологической реакции с целью серологической диагностики.

Конкретные цели:

- Знать цели применения серологических реакций (СР).
- Изучить препараты, которые применяются для серологической идентификации.
- Ознакомиться с особенностями реакций агглютинации и преципитации.
- Овладеть методикой постановки реакции агглютинации на стекле и развернутой реакции агглютинации (РА).
- Усвоить методику постановки реакции преципитации (РП).

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент на занятии:

Термин	Определение
Серологическая реакция	Реакция специфического взаимодействия антигенов (АГ) и антител (АТ).
Реакция агглютинации	Агглютинация – это процесс склеивания корпускулярных антигенов (бактерии, эритроциты) под действием специфических антител в присутствии электролита с образованием осадка - агглютината.

Реакция преципитации	Преципитация - это осаждение мелкодисперсного или растворимого молекулярного АГ под воздействием специфической сыворотки.
Серологическая идентификация	Серологическая идентификация - это определение (идентификация) неизвестного АГ с помощью известных АТ с использованием серологических реакций.
Иммунная диагностическая сыворотка	Иммунная диагностическая сыворотка (ИДС) - это стандартный препарат, который содержит АТ к определенной группе микробов и используется для постановки серологической реакции.

Теоретические вопросы к занятию:

1. В чем заключается механизм клеточного иммунитета и гуморального иммунного ответа.
2. Назовите иммунокомпетентные клетки – антиген представляющие, регуляторные (индукторные), эффекторные, их функции.
3. МНС I класса и МНС II класса. На каких клетках они экспрессируются?
4. Что такое СД-антигены? Роль основных СД-маркеров – СД₁, СД₂, СД₃, СД₄, СД₈.
5. Назовите основные этапы иммунологического ответа по гуморальному типу с участием Т-хелперов.
6. Назовите основные этапы иммунологического ответа по клеточному типу.
7. Дать определение понятиям: антигены, антигенность
8. Антигенное строение бактериальной клетки на примере E.coli
9. Что представляют собой антитела, какова структура молекулы антител?
10. Дайте характеристику пяти классов иммуноглобулинов. Какой класс Yg синтезируется первыми при иммунном ответе, реакции агглютинации?
11. Особенности взаимодействия антигенов и антител
12. Серологические реакции, отличия простых и сложных СР.
13. Цели серологических реакций
14. Компоненты серологической реакции, поставленной с целью сероидентификации
15. Реакция агглютинации - определение
16. Реакция преципитации - определение
17. Иммунные диагностические сыворотки, использование и этапы их получения.

Содержание темы.

На практическом занятии студенты должны ознакомиться с понятием серологических реакций, определить цель постановки и компоненты СР, ознакомиться с особенностями реакций агглютинации и преципитации. Студенты проводят постановку реакций агглютинации на стекле с адсорбированными сыворотками и преципитации в жидкой фазе, осуществляют учет. Разбирают особенности учета развернутой реакции агглютинации, проводят постановку развернутой РА с целью серологической идентификации. Выполненные задания студенты заносят в протокол и подписывают его у преподавателя.

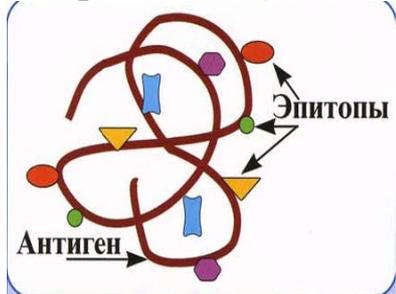
Антигены

Антигены – вещества различного происхождения, несущие признаки генетической чужеродности и вызывающие развитие иммунных реакций (гуморальных, клеточных, индуцирование иммунной памяти).

Свойства антигенов определяются комплексом признаков:

1. Иммуногенность – способность индуцировать иммунный ответ.
2. Антигенность – способность антигенов избирательно реагировать со специфичными к нему антителами или антигенраспознающими рецепторами.
3. Специфичность – структурные особенности отличающие один антиген от другого.

Способностью вызывать развитие иммунного ответа и определять его специфичность обладает фрагмент молекулы антигена – **антигенная детерминанта (эпитоп)**.



Эпитоп – располагается в области, обращенной к микроокружению антигена – это наименьшая распознаваемая единица антигена. Молекула антигена может иметь несколько эпитопов (поливалентные антигены).

Классификация антигенов.

1. **Иммуногены или полные антигены** – способны запускать иммунные реакции, выступают в дальнейшем как мишени, на которые иммунные реакции и будут направлены. Например – белки.

2. **Гаптены или неполные антигены** – обладают антигенностью (взаимодействуют с антителами), но не иммуногены (не способны запускать иммунные реакции), имеют небольшую молекулярную массу, не распознаются иммунокомпетентными клетками. Могут стать полными антигенами при связывании с высокомолекулярным носителем, обладающим собственной иммуногенностью. Например – никель, хром, полисахариды, липиды, нуклеиновые кислоты, метаболиты грибов, продукты распада пенициллинов.

3. **Полугаптены** – неорганические вещества (напр., йод, хром), присоединение которых к молекуле белка меняет его иммуногенные свойства. Образующиеся антитела специфичны к йоду или хрому (детерминанты на поверхности полного антигена), но не к белку-носителю.

По специфичности взаимодействия с антителами выделяют:

1. **Видовые антигены** – антигенные детерминанты присутствующие у особей одного вида. Отдельные штаммы могут содержать внутривидовые антигены, по которым разделяются на серологические варианты – **серовары**.

2. **Групповые антигены** – антигенные детерминанты, обуславливающие внутривидовые различия у особей одного вида, что позволяет разделять их на **серогруппы**.

3. **Гетерогенные антигены** – антигенные детерминанты, общие для организмов разных таксономических групп (например, Rh-система эритроцитов человека и антигены эритроцитов макаки - резус).

4. **Аллоантигены (изоантигены)** – антигены конкретного индивидуума, обладающие иммуногенностью по отношению к другим представителям этого вида.

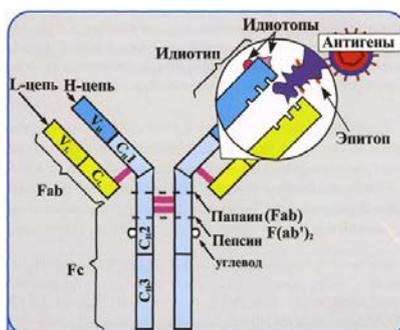
Антигены микроорганизмов.

По расположению в бактериальной клетке выделяют:

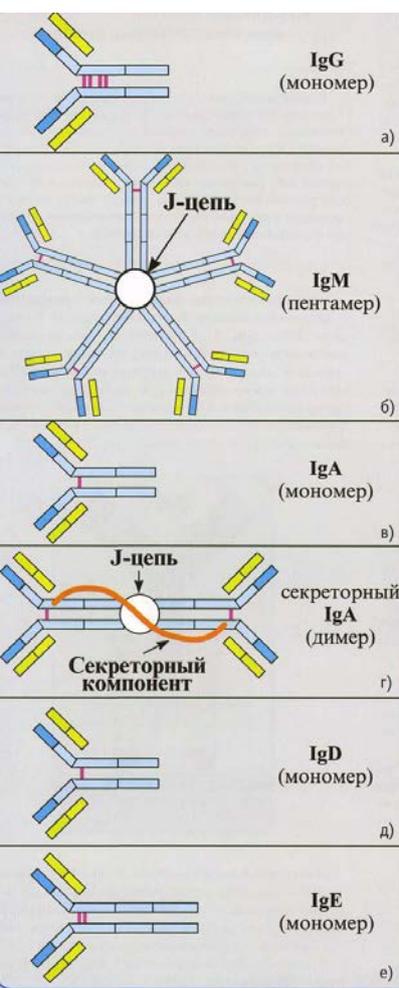
1. Соматический, О-Аг (от нем. ohne Rauch — без дыхания) – термостабильный липополисахаридно-полипептидный комплекс, является компонентом клеточной стенки, у грамотрицательных бактерий играет роль эндотоксина. У возбудителей кокковых инфекций, холерных вибрионов, возбудителей бруцеллеза, туберкулеза и некоторых анаэробов из тела микробных клеток выделены полисахаридные антигены. Полисахаридные антигены обуславливают типовую специфичность бактерий. Как антигены они могут быть активны в чистом виде и в комплексе с липидами.

2. К-Аг (капсульный) – в большинстве случаев термостабильный полисахаридной природы. У сальмонелл выделен термолабильный Vi-Аг (Аг вирулентности), который имеет важное значение. При иммунизации человека комплексом О- и Vi-антигенов наблюдается высокая степень защиты против брюшного тифа. Vi-антиген разрушается при 60°C и менее токсичен, чем О-антиген. Он обнаружен и у других кишечных микробов, например кишечной палочки.

3. Жгутиковый, H-Аг (от нем. Rauch — дыхание) – термолабильный белковой природы, образован белком флагеллином. Жгутиковые антигены быстро разрушаются при нагревании и под действием фенола. Они хорошо сохраняются в присутствии формлина. Это свойство используют при изготовлении убитых диагностикумов для реакции агглютинации, когда необходимо сохранить жгутик.



Антитела



Антитела – эффекторные молекулы гуморального иммунного ответа, белки, синтез которых индуцируется антигенами, а их основное свойство – способность к специфичному взаимодействию с антигеном.

Антитела (иммуноглобулины) – молекулы гликопротеидов, γ -глобулины, продуцируемые плазмочитами (плазматические клетки - это В-лимфоциты активированные и прошедшие пролиферацию и дифференцировку под воздействием сигнала, запущенного антигеном).

Молекула иммуноглобулина состоит из двух идентичных тяжелых (H) и двух легких (L) цепей. N-концевые области L- и H-цепей образуют два антиген – связывающих центра (паратопы). Fc-фрагмент взаимодействует со своим рецептором в мембране различных типов клеток (макрофаг, нейтрофил, тучная клетка).

Классификация иммуноглобулинов.

IgM – синтезируется при первичном попадании Аг в организм, однако он образуется постоянно к некоторым Аг бактерий (напр., жгутикам). Наличие IgM к антигенам конкретного возбудителя указывает на острый инфекционный процесс. Опсонизируют, агглютинируют, преципитируют и лизируют, содержащие Аг структуру, активируют комплемент по

классическому пути.

IgG – основной класс Ат, защищающий от бактерий, вирусов и токсинов. Сменяет синтез IgM (особенно большое кол-во – при вторичном иммунном ответе). Обнаружение высоких титров IgG к Аг конкретного возбудителя – состояние реконвалесценции или конкретное заболевание было перенесено недавно. Участвуют в реакциях иммунного цитолиза, нейтрализации, усиливают фагоцитоз. *Проникают через плаценту* (формирование пассивного иммунитета новорожденных.)

IgA – выделяют сывороточный и секреторный IgA (фиксирован на поверхности эпителия). Присутствует в слюне, слезной жидкости, грудном молоке. Усиливают защитные свойства слизистых ЖКТ, дыхательных, половых и мочевыводящих путей. Участвуют в реакции нейтрализации и агглютинации возбудителей, активируют комплемент по классическому пути. Сывороточная форма – двухвалентный мономер, секреторный – четырехвалентный димер.

IgD – биологическая роль не установлена, обнаруживаются на поверхности развивающихся В-лимфоцитов, в сыворотке здорового - в очень низком титре. Титр увеличивается при беременности, бронхиальной астме, системной красной волчанке.

IgE – взаимодействуют с тучными клетками и базофилами, активируя их дегрануляцию, что ведет к расширению просвета и увеличению проницаемости

венул, как при аллергической реакции. Защитные свойства направлены против гельминтов (нематод), титр увеличивается при паразитарных инвазиях, некоторых формах миеломы, при первичных иммунодефицитах (атаксия-телеангиэктазия, синдромы Вискотта-Олдрича, Незелофа, Ди Джорджи). **Реагины** – аллергические Ат, относящиеся к классу иммуноглобулинов E. Fc-рецептором адсорбируются на поверхности тучных клеток и базофилов. Присоединение аллергена к фиксированным реагинам приводит к дегрануляции тучных клеток, выбросу в кровь высоких концентраций гистамина и др. биогенных аминов, приводящих к сокращению гладких мышечных волокон, повышению проницаемости сосудов и др. патофизиологических реакций. Р. участвуют в патогенезе анафилактического шока и атоний.

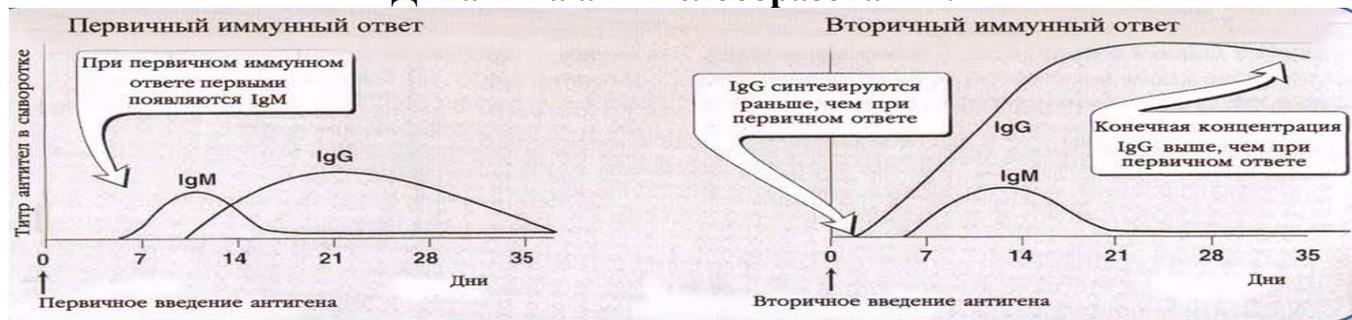
Основные типы антител:

1. Антитоксические – нейтрализуют или флоккулируют антигены (токсины).
2. Агглютинирующие – агрегируют бактерии.
3. Преципитирующие (полные) – образуют комплекс Аг-Ат с растворимым Аг только в растворах или гелях
4. Лизирующие – вызывают разрушение клеток-мишеней (обычно взаимодействуя с комплементом).
5. Опсонизирующие – взаимодействуют с поверхностными структурами клеток микроорганизмов или зараженных вирусом клеток, способствуя поглощению их фагоцитами.
6. Нейтрализующие – инактивируют антигены (токсины, микроорганизмы), лишая их возможности проявлять патогенные свойства.

Основные функции антител.

1. Опсонизация (иммунный фагоцитоз).
2. Антитоксический эффект.
3. Активация комплемента.
4. Нейтрализация.
5. Циркулирующие комплексы (связанные растворимые Аг образуют комплексы с Ат, которые выводятся из организма с желчью и мочой).
6. Антителозависимая цитотоксичность.

Динамика антителообразования.



Теории выработки антител

Теория боковых цепей

Первой последовательной теорией образования антител была теория «боковых цепей» Эрлиха, опубликованная в 1897 г. Сущность ее сводилась к тому, что клетки имеют химические группировки, или боковые цепи, некоторые из которых по чистой случайности соответствуют химическим группировкам антигенов. Это, естественно, препятствовало бы нормальной функции боковой цепи в клетке; по этой причине клетка должна была бы создавать больше боковых цепей для того, чтобы возместить нарушение функции. Ehrlich считал, что «антитоксины представляют собой не что иное, как боковые цепи, репродуцированные в излишестве в течение регенерации, и поэтому они выталкиваются из цитоплазмы для того, чтобы находиться в свободном состоянии».

Матричная теория образования антител. Landsteiner занимался методичным анализом антител, которые могут быть синтезированы против различных небольших химических группировок или гаптен. Вскоре стало ясно, что распознающая способность антител безгранична. Казалось неправдоподобным, что любая клетка могла бы синтезировать такое разнообразие боковых цепей. Скорее полагали, что антиген индуцирует некоторые химические изменения в синтетическом механизме клетки. Эта точка зрения завоевала всеобщее признание, хотя несколько не удовлетворяла исследователей. Haurowitz развил ее, когда сформулировал то, что стало известно как матричная теория образования антител. Это прямая химическая теория постулировала, что антиген проникает в антителообразующую клетку и действует как шаблон или матрица, на которой происходит сборка молекул глобулина. Естественно, глобулин принимал форму, комплементарную форме антигена. Следовательно, он мог становиться специфическим антителом.

Клонально-селекционная гипотеза Ф. Бернета

Согласно ей, в организме присутствует более 10000 клонов лимфоидных и иммунологически компетентных клеток, способных реагировать с различными антигенами или их детерминантами и вырабатывать антитела. Допускается, что клоны таких клеток способны вступать в реакцию с собственными белками, в результате чего уничтожаются. Так погибают клетки, образующие антиагглютинины против А - антигена у организмов с группой крови А и анти - В - агглютинины с группой крови В.

Специфический иммунный ответ развивается в организме параллельно с развитием инфекции или после вакцинации и приводит к формированию ряда специфических эффекторных механизмов противоинфекционной защиты:

- 1. Гуморальный иммунный ответ (В-лимфоцит);**
- 2. Клеточный иммунный ответ (Т-лимфоцит);**
- 3. Иммунологическая память (Т- и В-лимфоциты);**
- 4. Иммунологическая толерантность.**

К этим механизмам относятся *эффекторные молекулы (антитела) и эффекторные клетки (Т-лимфоциты и макрофаги)* иммунной системы.

Гуморальные иммунные реакции

В гуморальных иммунных реакциях участвуют три клеточных типа: *макрофаги* (Аг-представляющие клетки), *Т-хелперы* и *В-лимфоциты*.

Аг-представляющие клетки фагоцитируют микроорганизм и перерабатывают его, расщепляя на фрагменты (процессинг Аг). Фрагменты Аг выставляются на поверхности Аг-представляющей клетки вместе с молекулой МНС. Комплекс «Аг-молекула МНС класса II» предьявляется Т-хелперу. Распознавание комплекса Т-хелпером стимулирует секрецию ИЛ-1 макрофагами.

Т-хелпер под действием ИЛ-1 синтезирует ИЛ-2 и рецепторы к ИЛ-2; последний стимулирует пролиферацию Т-хелперов, а также ЦТЛ. Таким образом, после взаимодействия с Аг-представляющей клеткой Т-хелпер приобретает способность отвечать на действие ИЛ-2 бурным размножением. Биологический смысл этого явления состоит в накоплении Т-хелперов, обеспечивающих образование в лимфоидных органах необходимого пула плазматических клеток, вырабатывающих АТ к данному Аг.

В-лимфоцит. Активация В-лимфоцита предполагает прямое взаимодействие Аг с молекулой Ig на поверхности В-клетки. В этом случае сам В-лимфоцит перерабатывает Аг и представляет его фрагмент в связи с молекулой МНС II на своей поверхности. Этот комплекс распознает Т-хелпер, отобранный при помощи того же Аг. Узнавание рецептором Т-хелпера комплекса Аг-молекула МНС класса II на поверхности В-лимфоцита приводит к секреции Т-хелпером ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, под действием которых В-клетка размножается, образуя клон плазматических клеток (плазмоцитов). *Плазмоциты синтезируют антитела.* Часть зрелых В-лимфоцитов после антигензависимой дифференцировки циркулируют в организме в виде *клеток памяти*.

Клеточные иммунные реакции

В очаге иммунного воспаления **Т-эффекторы ГЗТ**, активированные при контакте с микробными антигенами, продуцируют **лимфокины**, индуцирующие микробоцидные механизмы **фагоцитов**. В результате усиливается внутриклеточная гибель захваченных фагоцитами возбудителей.

Гибель клеток-«мишеней» вместе с паразитирующими в них возбудителями может наступить вследствие их распознавания **Т-киллерами**, специфически сенсibilизированных против микробных антигенов.

Другой механизм гибели зараженных клеток носит название **антителозависимой цитотоксичности** (АЗЦТ). Он заключается в распознавании микробных антигенов на мембране зараженной клетки-«мишени» антителами, адсорбированными на Fc-рецепторах **НК-клеток** или **макрофагов**. При этом цитотоксичность является результатом действия лизосомных ферментов и других продуктов секреции данных клеток.

В целом клеточные механизмы обеспечивают защиту организма против факультативно и облигатно внутриклеточных паразитов, что позволяет оценивать напряженность специфического иммунитета по результатам **кожно-**

аллергической реакции. Этим же объясняется и тот факт, что наиболее эффективными для специфической профилактики таких инфекций являются вакцины из живых ослабленных микроорганизмов, активирующие клеточные механизмы иммунитета.

Серологические реакции в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний.

В защите организма от чужеродных антигенов решающую роль играют иммунологические механизмы, осуществляющиеся антителами и иммунокомпетентными клетками. Основа иммунологических механизмов – специфическая реакция между антителами или лимфоцитами (образовавшихся под воздействием попавшего в организм антигена) и антигена. Главная функция антител – связывание антигена и его дальнейшее выведение из организма.

Однако такие реакции между антителами и антигенами могут происходить и вне организма (*in vitro*) в присутствии электролита и возможны лишь при наличии комплементарности (структурного сходства, сродства) антигена и антитела.

Имея специфические антитела против определенного антигена можно распознать и выявить его среди других антигенов, а в сыворотке крови антитела против известного антигена.

Общая схема иммунного ответа

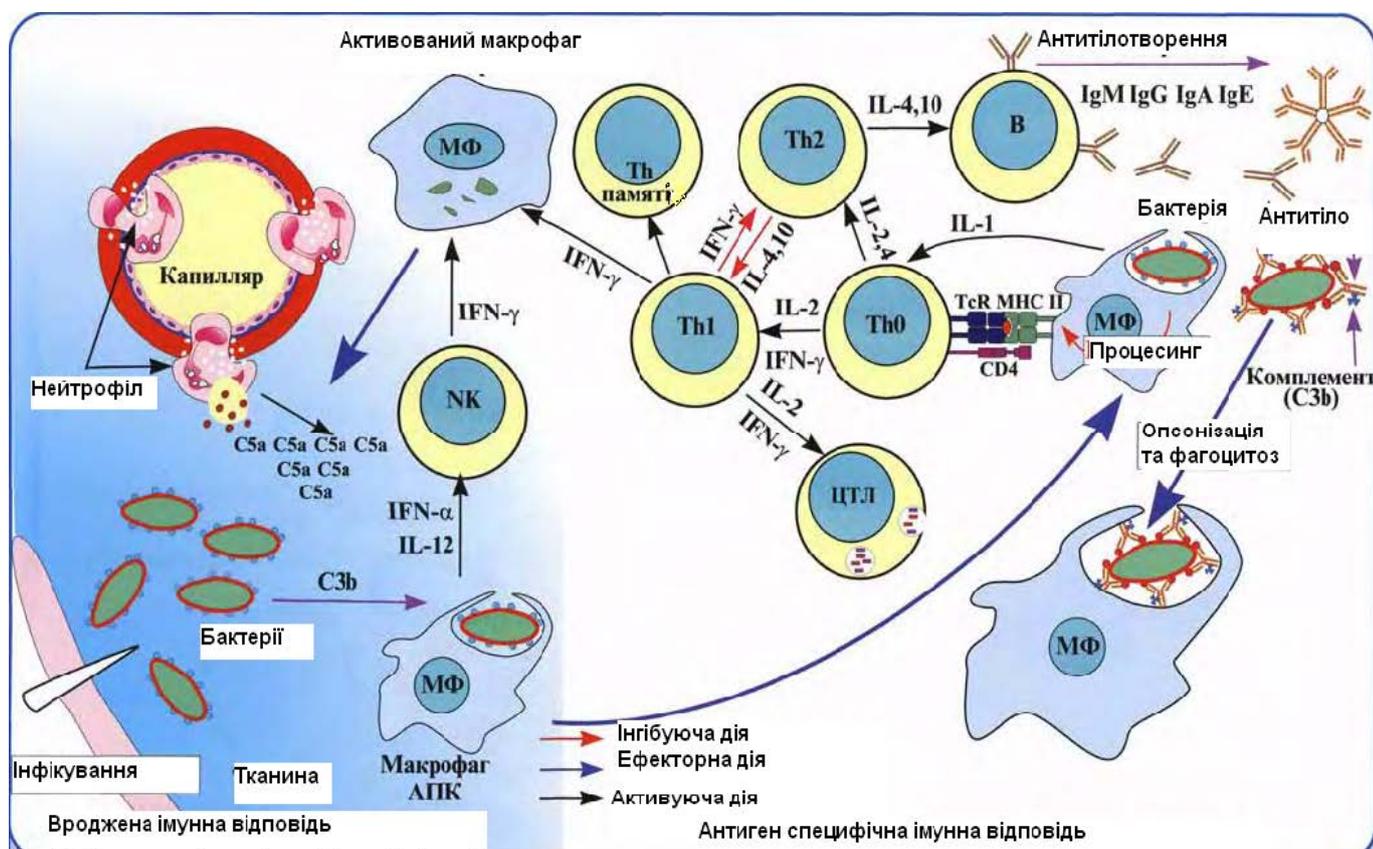


Рис. 83. Схема антибактеріальної імунної відповіді

Реакция антиген-антитело *in vitro* сопровождается возникновением определенного феномена – агглютинации, преципитации, лизиса.

Таким образом, *все серологические реакции используются с двумя целями:*

1) выявление антител в сыворотке больного с помощью стандартных антигенов-диагностикумов (для серологической диагностики инфекционных болезней);

2) для выявления неизвестных антигенов по известным стандартным сывороткам, содержащим антитела определенной специфичности (для серологической идентификации возбудителей).

Например, если сыворотка больного реагирует с конкретным микробным антигеном – значит в сыворотке больного есть антитела против данного микроорганизма.

Серологическая диагностика – берут стандартный антиген (диагностикум), представляющий собой инактивированные или живые бактерии, вирусы или же их антигены (компоненты) в изотоническом растворе.

Серологическая идентификация – используют стандартные иммунные сыворотки, которые получают от иммунизированных животных (в крови животных в результате многократной иммунизации возбудителем появляется большое количество антител).

Агглютинация.

Агглютинация — *склеивание* и выпадение в осадок из однородной взвеси бактерий, эритроцитов и др. клеток, несущих антигены, под действием специфических антител — агглютининов.

Агглютинация – серологическая реакция между антителами (агглютинидами) и антигенами (агглютининогенами), размещенными на поверхности бактериальной клетки, а в результате образуется комплекс антиген-антитело (агглютинат).

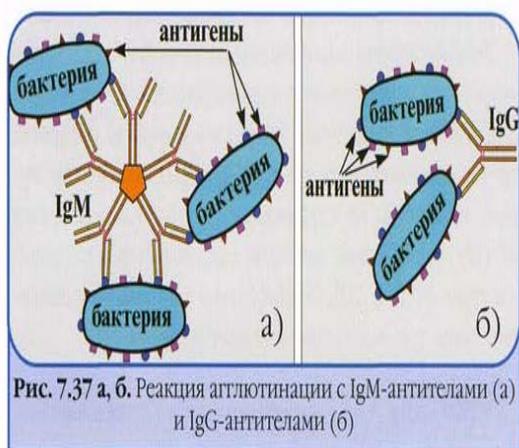
Механизм агглютинации – под влиянием ионов электролита уменьшается негативный поверхностный заряд бактериальной клетки и следовательно они могут сблизиться на такое расстояние при котором возникает склеивание бактерий.

Макро- и микроскопический вид агглютината:

1) О-агглютинация (соматическая) – мелкозернистая, при микроскопии – бактерии склеиваются полюсами клеток, образуя сеть.

2) Vi-агглютинация (капсульная) – мелкозернистая, при микроскопии - склеивание бактерий происходит всей поверхностью клетки.

3) H-агглютинация (жгутиковая) – агглютинины взаимодействуют с жгутиками обездвиживая бактерии, при микроскопии – крупнохлопчатая, склеивание бактериальных клеток в области жгутиков.



Реакция агглютинации используется для определения антител в сыворотке крови больных, например, при бруцеллезе (реакции Райта, Хеддельсона), брюшном тифе и паратифах (реакция Видаля) других инфекционных болезнях, а также при определении возбудителя, выделенного от больного. Эту же реакцию применяют для определения групп крови с использованием моноклональных антител против аллоантигенов эритроцитов.

Применяются различные варианты реакции агглютинации: развернутая, ориентировочная, непрямая и др.

Для определения у больного антител ставят **развернутую реакцию агглютинации**: к разведениям сыворотки крови больного добавляют взвесь убитых микробов (диагностикум) и через несколько часов инкубации при 37°C отмечают наибольшее разведение (титр) сыворотки, при котором произошла агглютинация, т.е. образовался осадок.

Характер и скорость агглютинации зависят от вида антигена и антител.

Если необходимо определить возбудитель, выделенный от больного, ставят **ориентировочную реакцию агглютинации**, применяя диагностические антитела, т.е. проводят серотипирование возбудителя. Ориентировочную реакцию проводят на предметном стекле. К 1 капле диагностической иммунной сыворотки в разведении 1:10 или 1:20 добавляют чистую культуру возбудителя, выделенного от больного. Если появляется хлопьевидный осадок, то реакцию проводят в пробирках с увеличивающимися разведениями диагностической сыворотки, добавляя в каждую дозу сыворотки 2—3 капли взвеси возбудителя. Реакцию считают положительной, если агглютинация отмечается в разведении, близком к титру диагностической сыворотки. В контролях (сыворотка, разведенная изотоническим раствором хлорида натрия, или взвесь микробов в том же растворе) осадок в виде хлопьев должен отсутствовать.

Разные родственные бактерии могут агглютинироваться одной и той же диагностической агглютинирующей сывороткой, что затрудняет их идентификацию. Поэтому пользуются адсорбированными агглютинирующими сыворотками, из которых удалены перекрестно реагирующие антитела путем адсорбции их родственными бактериями. В таких сыворотках сохраняются антитела, специфичные только к данной бактерии. Получение таким способом

монорецепторных диагностических агглютинирующих сывороток было предложено А. Кастеллиани (1902).

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА) основана на использовании эритроцитов (или латекса) с адсорбированными на их поверхности антигенами или антителами, взаимодействие которых с соответствующими антителами или антигенами сыворотки крови больных вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка. РНГА применяют для диагностики инфекционных болезней, определения гонадотропного гормона в моче при установлении беременности, для выявления повышенной чувствительности к лекарственным препаратам и гормонам и в некоторых других случаях.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) основана на блокаде, подавлении вирусов антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты. РТГА применяют для диагностики многих вирусных болезней, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита и др.) могут агглютинировать эритроциты различных животных.

Реакцию агглютинации для определения групп крови применяют для установления системы АВО с помощью РА эритроцитов, используя антитела к группам крови А(II), В(III). Контролем служит сыворотка, не содержащая антител, т.е. АВ(IV) группы крови, антигены, содержащиеся в эритроцитах групп А(II), В(III); отрицательный контроль не содержит антигенов, т.е. используют эритроциты группы 0 (I).

В реакции агглютинации для определения резус-фактора используют антирезусные сыворотки (не менее двух различных серий). При наличии на мембране исследуемых эритроцитов резус-антигена происходит агглютинация этих клеток. Контролем служат стандартные резус-положительные и резус-отрицательные эритроциты всех групп крови.

Реакцию агглютинации для определения антирезусных антител (непрямую реакцию Кумбса) применяют у больных при внутрисосудистом гемолизе. У некоторых таких больных обнаруживают антирезусные антитела, которые являются неполными. Они специфически взаимодействуют с резус-положительными эритроцитами, но не вызывают их агглютинации. Наличие таких неполных антител определяют в непрямой реакции Кумбса. Для этого в систему антирезусные антитела + резус-положительные эритроциты добавляют антиглобулиновую сыворотку (антитела против иммуноглобулинов человека), что вызывает агглютинацию эритроцитов. С помощью реакции Кумбса диагностируют: патологические состояния, связанные с внутрисосудистым лизисом эритроцитов иммунного генеза, например гемолитическую болезнь новорожденных: эритроциты резус-положительного плода соединяются с циркулирующими в крови неполными антителами к резус-фактору, которые перешли через плаценту от резус-отрицательной матери.

Реакция коагглютинации - разновидность РА: клетки возбудителя определяют с помощью стафилококков, предварительно обработанных иммунной диагностической сывороткой. Стафилококки, содержащие белок А, имеющий

средство к иммуноглобулинам, неспецифически адсорбируют антимикробные антитела, которые затем взаимодействуют активными центрами с соответствующими микробами, выделенными от больных. В результате коаггутинации образуются хлопья, состоящие из стафилококков, антител диагностической сыворотки и определяемого микроба.

Схема постановки реакции агглютинации.

Компоненты	Пробирки						
	1	2	3	4	5	6 КС	7 КД
Изотонический раствор NaCl (физиологический раствор)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	1
Сыворотка больного в разведении 1:5 (стартовое разведение)	1	→	→	→	→	↓	1
Разведение	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:100	-
Диагностикум, капли	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	2

КС – контроль сыворотки; КД – контроль диагностикума

Титр сыворотки - наибольшее разведение сыворотки, при котором произошло образование агглютината, т.е. образовался осадок. Фактически – это разведение сыворотки в последней пробирке, где произошло образование агглютината.

Преципитация.

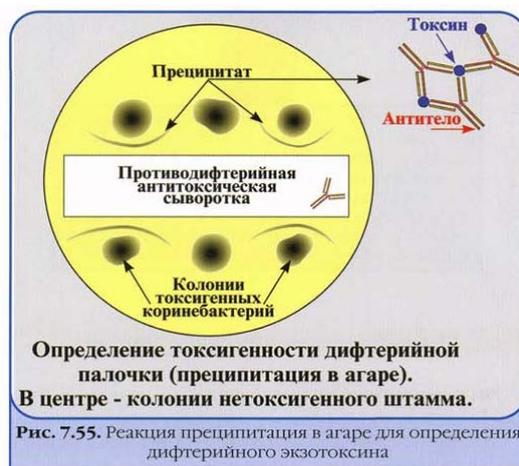
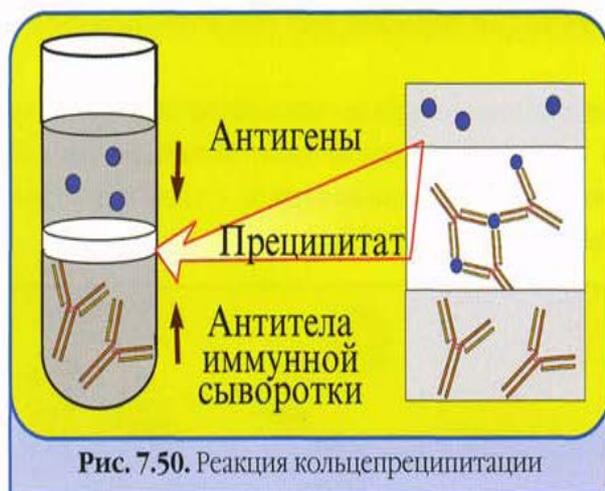
Преципитация (лат. *praecipitatio* — «стремительное падение») – в основе механизма лежит образование и выпадение в осадок комплексов антиген-антитело.

Характер антигена – молекулярные, в растворимом виде.

Антигенами могут быть экстракты микроорганизмов, тканей, органов, тканей, химические вещества.

Феномен преципитации состоит в реакции между антителами (преципитинами) и антигенами (преципитиногенами) с образованием осадка (преципитата) или помутнением раствора.

Реакция преципитации гораздо более чувствительна, чем реакция агглютинации, ее можно проводить в жидкой и плотной среде, однако обязательным условием является прозрачность исходных компонентов.



Реакцию проводят в пробирках, нанося (наслаивая) растворимый антиген на иммунную сыворотку. При оптимальном соотношении антигена и антител на границе раздела двух растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата (*реакция кольцепреципитации*). Избыток антигена не влияет на результат кольцепреципитации вследствие постепенной диффузии реагентов к границе жидкости. Если в качестве антигенов в реакции кольцепреципитации используют прокипяченные и профильтрованные водные экстракты органов и тканей, то такая реакция называется *реакцией термпреципитации* (реакцией Асколи).

Реакции преципитации в полужидком геле агара или агарозы: двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез.

Двойная иммунодиффузия по Оухтерлони растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку и после затвердевания в нем вырезают лунки. В лунки раздельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируя в агар, образуют в месте встречи преципитат в виде белой полосы.

При постановке реакции радиальной иммунодиффузии иммунную сыворотку вносят в агаровый гель. В лунки геля помещают раствор антигена, который диффундируя в гель, образует кольцевые зоны преципитации вокруг лунок. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена. Реакцию используют для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента и др.

Имуноэлектрофорез – сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации: смесь антигенов разделяется на геле с помощью электрофореза, затем параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой диффундируют в гель и образуют в месте «встречи» с антигеном линии преципитации.

Реакция флоккуляции (по Рамону) – появление опалесценции или хлопьевидной массы (иммунопреципитации) при реакции токсин-антитоксин или анатоксин-антитоксин. Ее применяют для определения активности анатоксина или антитоксической сыворотки.

Схема постановки реакции преципитации.

Компоненты	Контроли			Опыт
	1	2	3	4
Нормальная сыворотка	1	1	-	-
Иммунная сыворотка	-	-	1	1
Экстракт положительный	-	1	1	-
Исследуемый экстракт	1	-	-	1
Результаты	отрицат	отрицат	положит	?

Система комплемента.

Система комплемента – это группа более чем 20 сывороточных белков (компонентов комплемента), опосредующих воспалительные реакции при участии гранулоцитов и макрофагов. Компоненты системы участвуют в реакциях свертывания крови, способствуют межклеточным взаимодействиям, необходимым для процессинга антигена, вызывают лизис бактерий и клеток, инфицированных вирусами. В норме компоненты комплемента находятся в неактивной форме. Активация комплемента приводит к поочередному (каскадному) появлению его активных компонентов, стимулирующих защитные процессы.

В здоровом организме идет довольно интенсивное потребление комплемента за счет постоянного формирования иммунных комплексов, например, с антителами против антигенов бактериальной аутофлоры. Поэтому белки системы комплемента быстро обновляются. Потребление комплемента может резко возрастать при различных патологиях, связанных с усиленным образованием иммунных комплексов при инфекциях и иммунопатологических состояниях.

Основные функции компонентов комплемента:

- стимуляция фагоцитоза;
- нарушение целостности клеточных стенок микроорганизмов мембраноповреждающим (мембраноатакующим) комплексом;
- индукция синтеза медиаторов воспалительного ответа;
- стимуляция воспалительного ответа (некоторые компоненты – хемоаттрактанты для фагоцитов);
- участие в развитии иммунных (через активацию макрофагов) и аллергических реакций (анафилаксия).

Пути активации комплемента.

1. Классический путь – активация происходит комплексом антиген-антитело. Причем только IgG и IgM способны инициировать этот процесс

Например такой путь запускает ДНК и белок А стафилококков. Конечным эффектом активации компонентов комплемента является формирование мембраноатакующего комплекса (МАК) на мембране бактериальной клетки, что в конечном итоге ведет к разрушению клетки.

2. Альтернативный путь – активация происходит без участия антител и задолго до их появления. Активация происходит такими микробными продуктами, как эндотоксины (липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий), поверхностными структурами вирусов (например, гриппа), иммунными комплексами, включающими IgA и IgE. Эффект активации состоит в формировании МАК на поверхности клетки, что вызовет ее разрушение.

Реакции лизиса.

Для постановки реакции лизиса необходимы антиген (микроорганизм, эритроциты или др. клетки), антитело (лизины – специфическая сыворотка или сыворотка больного) и комплемент.

Комплемент при образовании комплекса клетка (антиген) – антитело, связывается с ним, активируется по классическому пути и вызывает лизис (разрушение) клеток. Без комплемента лизис невозможен.

Выделяют такие реакции лизиса: бактериолиза, гемолиза, цитолиза.

Реакцию бактериолиза с диагностической целью практически не используют. А чаще используют реакции гемолиза и цитолиза.

Реакция связывания комплемента (РСК).

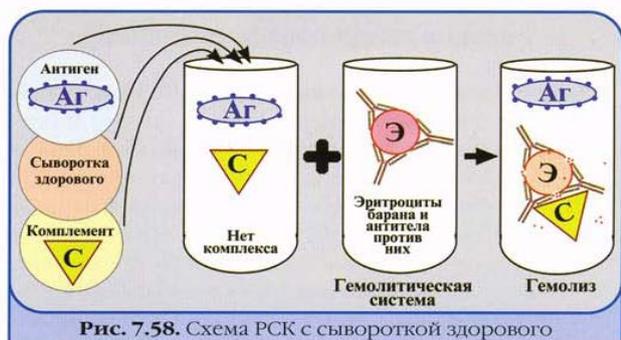
В отличие от реакций агглютинации и преципитации в РСК, кроме антигена и антитела принимает участие комплемент и гемолитическая (индикаторная) система.

Образование комплекса антиген-антитело, как правило, не проявляется внешними изменениями, однако при образовании такого комплекса к нему всегда присоединяется комплемент. А если комплекс антиген-антитело не образуется комплемент остается свободным. При добавлении комплекса эритроцитов барана и антител к ним (гемолизинов) свободный комплемент связывается с таким комплексом и вызывает гемолиз эритроцитов барана. При соответствии антигена



и антитела с ними связывается комплемент, а чтобы убедиться в этом добавляют эритроциты барана и гемолитическую сыворотку (антитела к эритроцитам барана, гемолизины) – эритроциты гемолитической системы останутся неповрежденными и осядут на дно пробирки.

Этот принцип и положен в основу РСК.



Для постановки РСК в качестве комплемента используется свежая или лиофилизированная сыворотка морских (гвинейских) свинок, которые

отличаются наиболее стабильной продукцией компонентов комплемента.

Перед постановкой основного опыта проводят титрование комплемента с целью определить дозу комплемента, которую необходимо взять в реакцию. Она должна быть такой, чтобы полностью связалась с комплексом антиген-антитело. Если часть комплемента останется не связанной, то при добавлении гемолитической системы часть эритроцитов будет лизироваться. А наличие гемолиза, как известно, свидетельствует об отрицательном результате РСК.

Титром комплемента – будет его наименьшее количество, при котором наблюдается полный гемолиз.

Рабочая доза всегда будет больше, чем титр на 25% и практически она будет содержаться в следующей пробирке.

Схема титрования комплемента.

Компоненты, мл	Пробирки										Контроль	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 КС	12 КГС
Комплемент в разведении 1:10	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	-
Изотонический раствор NaCl (физиологический раствор)	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,0	1,5
Термостат 37°C – 30 мин												
Гемолитическая система (эритроциты)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Термостатирование при 37°C в течение 60 мин												

КС – контроль сыворотки; КГС – контроль гемолитической системы

Схема постановки основного опыта РСК.

Компоненты, мл	Опыт	Контроли		
		комплемента	сыворотки	антигена
Изотонический раствор NaCl (физиологический раствор)	0,5	0,5	0,5	0,5
Сыворотка больного в разведении 1:50	0,5	0,5	0,5	-
Специфический антиген (диагностикум)	0,5	0,5	-	0,5
Комплемент в рабочей дозе	0,5	-	0,5	0,5
Термостат 37°C – 60 мин				
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0
Термостат 37°C – 60 мин				
Результат	?	гемолиза нет	гемолиз	гемолиз

РСК оценивают по четырех плюсовой системе:

1. Резко положительная реакция (++++, +++) – полная задержка гемолиза, жидкость бесцветна или бледно-розовая, эритроциты оседают на дно;
2. Положительная реакция (++) – частичная задержка гемолиза, жидкость розового цвета, компактный осадок эритроцитов;
3. Сомнительная реакция (+) – незначительная задержка гемолиза, на дне еле заметный осадок, жидкость розового цвета;
4. Негативная реакция (-) – полный гемолиз, осадок отсутствует, жидкость красная, прозрачная.

Классическую схему постановки РСК предложили Ж.Борде и О.Жангу для диагностики хронической гонореи. В настоящее время она применяется для серологической диагностики заболеваний бактериальной этиологии - сифилиса (реакция Вассермана), лептоспироза, бруцеллеза, туляремии, листериоза, орнитоза, и вирусной этиологии – гриппа, паротита, цитомегалии, полиомиелита, лимфоцитарного менингита, энцефалита, грибковой этиологии – кандидоза, аспергиллеза, а также токсоплазмоза, пневмоцистоза и т.д.

Рекомендации для оформления протокола.

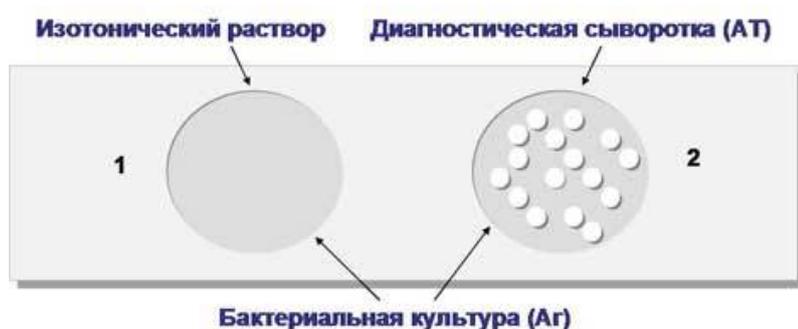
Реакция агглютинации на стекле

Материалы:

- Культура бактерий
- Адсорбированная иммунная диагностическая сыворотка для РА на стекле
- 0,5% раствор NaCl
- Предметное стекло, бак. петля

Ход работы:

Схема реакции агглютинации на стекле



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

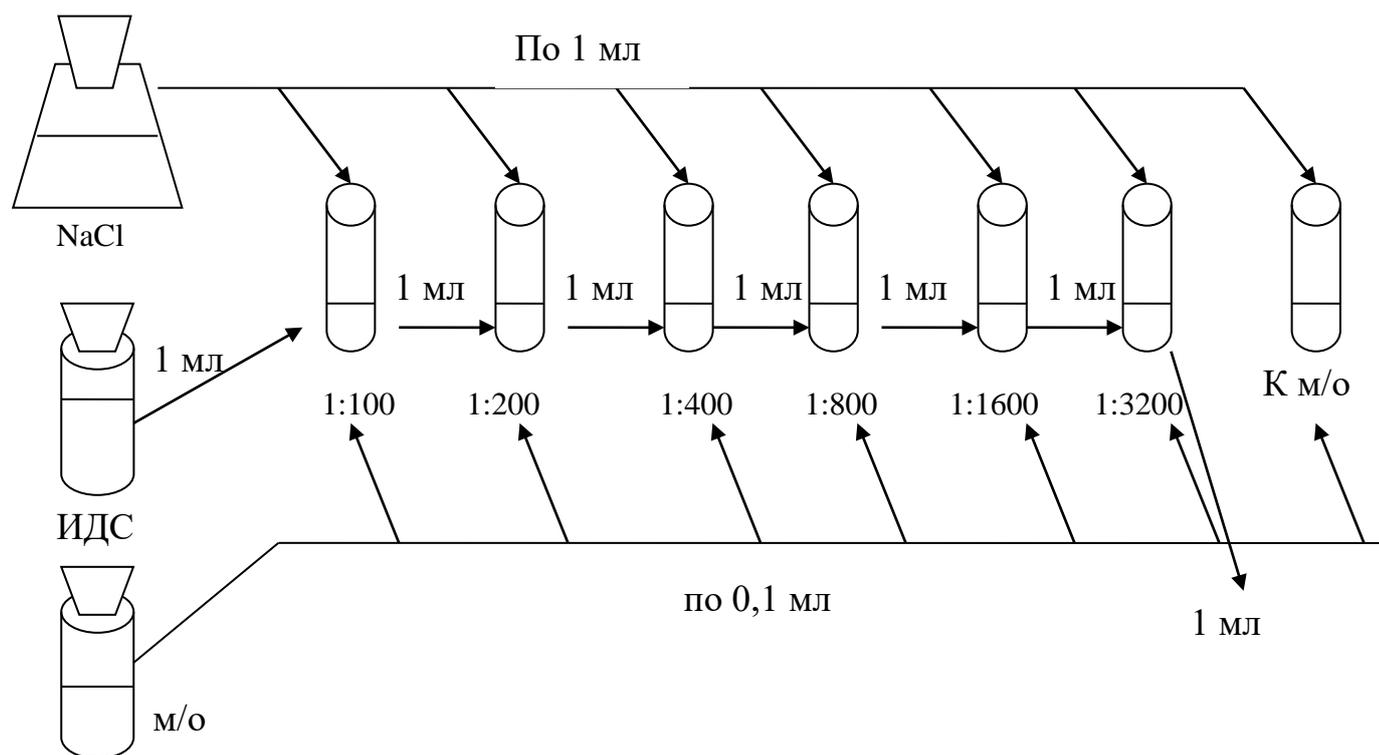
Примечание: положительный результат - наличие хлопьев агглютината, отрицательный - **отсутствие хлопьев** агглютината

Развернутая реакция агглютинации, поставленная с целью серологической идентификации культуры бактерий

Материалы:

- Культура бактерий (суспензия)
- Иммунная диагностическая сыворотка в рабочем разведении (1:50), титр - 1:3200
- 0,5% раствор NaCl
- Пробирки, пипетки

Ход работы:



Учет результатов. Положительный результат - образование агглютината.

Предварительный учет проводится через 2 часа, окончательный - через 18-24 часа.

Реакция преципитации в жидкой фазе.

Материалы: Антиген (преципитиноген);

Сыворотка (преципитин);

Пипетки.



Рис. 4. Реакция кольцепреципитации.

Учет. Результаты реакции учитывают в зависимости от вида антигена и антител через 5-10 мин, 1-2 ч или через 20-24 ч. В случае **положительной** реакции в пробирке на границе между сывороткой и исследуемым экстрактом появляется осадок в виде кольца белого цвета (помутнение).

Определение токсигенности коринебактерий дифтерии в реакции преципитации в агаре.

Эта издавна используемая реакция преципитации, предложенная для определения токсичности коринебактерий дифтерии, ставится на фосфатно-пептонном агаре в чашке Петри. Вдоль ее посередине помещают полоску стерильной фильтровальной бумаги, смоченной **антитоксической сывороткой**. После подсушивания на расстоянии 1 см от края полоски бляшками диаметром 10 мм подсевают выделенные культуры. В одной чашке можно сеять от 3 до 10 культур, одна из которых, контрольная, должна быть заведомо токсигенной. Посевы помещают в термостат.

Учет реакций проводят через 24-48-72 ч. Если культура токсигенная, на некотором расстоянии от полоски бумаги возникают линии осадка, совпадающие с линиями осадка контрольной культуры. Они имеют вид «стрел-усиков», которые хорошо видны в проходящем свете.

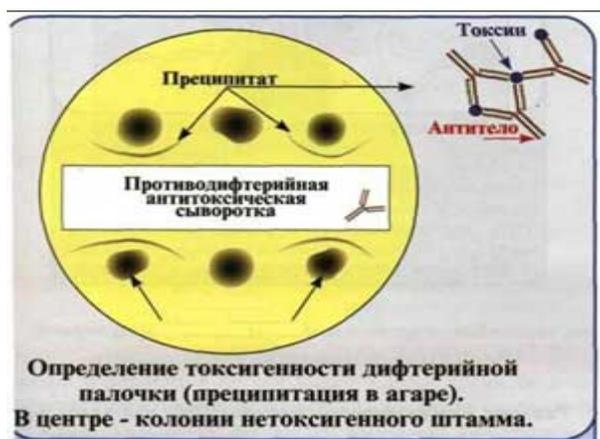


Рис. 5. Реакция преципитации в агаре.

Вопросы для самоконтроля.

- Какие органы иммунной системы относятся к центральным и периферическим, их функции?
- Какие клетки относятся к иммунокомпетентным, их функции?
- Какие клетки принимают участие в синтезе антител, характер их кооперации?
- Дать определение понятиям: антигены, антигенность.
- Какие антигены имеет бактерия (на примере E.coli)?
- Строение и функции иммуноглобулинов.
- Что такое серологические реакции, отличия простых и сложных СР?
- С какой целью может быть поставлена серологическая реакция?
- Реакция агглютинации - определение.
- Реакция преципитации - определение.
- Какие составляющие простых СР?

- Какие этапы включает в себя получение иммунных диагностических сывороток?

Практическое занятие №11

Сыворотки и иммуноглобулины. Реакция флуклюляции (нейтрализации). Аллергические реакции в иммуно диагностике инфекционных заболеваний. Принципы использования антител как лечебно-профилактических и диагностических препаратов. Гиперчувствительность. Аутоиммунные феномены.

Актуальность темы:

В защите организма от чужеродных агентов решающую роль играют иммунологические механизмы, которые осуществляются антителами (иммуноглобулинами) и иммунокомпетентными клетками (лимфоцитами). В основе иммунологических механизмов лежит специфическое взаимодействие антигена, попавшего в организм, и антитела, образовавшегося в ответ на попадание антигена. На использовании принципа взаимодействия антигена и антитела базируются все иммунологические диагностические реакции, которые названы серологическими, поскольку антитела находятся в сыворотке крови. Применение серологических реакций с целью серодиагностики инфекционного заболевания и с целью сероидентификации возбудителей, выделенных от больного, является необходимым для установления заключительного диагноза инфекционного заболевания. На занятии студентам предоставляется возможность овладеть методикой постановки основных серологических реакций (реакция агглютинации, реакция пассивной гемагглютинации, реакция иммунного гемолиза). Понимание роли антителообразования в формировании иммунного ответа является необходимой основой для формирования представления о сложном механизме функционирования иммунной системы и ее роли в развитии иммунозависимых патологий. Умение выбирать нужные для диагностики инфекционного заболевания серологические реакции, ставить их и интерпретировать полученные результаты является важным для формирования у студентов клинического мышления и понимания сути патологического процесса при инфекционных болезнях.

Конкретные цели:

- Анализировать механизм взаимодействия антител с антигенами
- Знать закономерности серологических реакций
- Интерпретировать участие клеток иммунной системы в иммунном ответе и фазы иммунного ответа
- Уметь проводить учет результатов развернутой реакции агглютинации, поставленной с целью серологической идентификации
- Овладеть методикой постановки реакции агглютинации, поставленной с целью серологической диагностики (реакция Видаля)

- Овладеть методикой постановки реакции иммунного гемолиза
- Усвоить методику постановки реакции непрямой гемагглютинации

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:

Термин	Определение
Реакции лизиса	Реакцией лизиса называют растворение антигена под действием антитела в присутствии комплемента. Свежевыделенная из организма человека иммунная сыворотка имеет лизирующие свойства, потому что содержит антитела и комплемент. Если же сыворотка прогревалась или долго хранилась, то лизис происходит лишь при условии добавления комплемента.
Реакция иммунного гемолиза	Реакция иммунного гемолиза основана на том, что при иммунизации животных (чаще кролей эритроцитами барана) в сыворотке крови появляются специфические защитные антитела - гемолизины, которые способны в присутствии комплемента нарушать связь гемоглобина со стромой эритроцитов и вызывать гемолиз (выход гемоглобина из эритроцита). Иммунная сыворотка, содержащая гемолизины, называется гемолитической сывороткой. Такие сыворотки выпускают институты бактериальных препаратов.
Сила гемолитической сыворотки	Сила гемолитической сыворотки определяется в титрах - это максимальное ее разведение в объеме 0,5 мл, при котором наблюдается полный гемолиз 0,5 мл 3% взвеси бараньих эритроцитов в присутствии 0,5 мл комплемента, разведенного 1:10 и инкубации пробирок на протяжении часа при 37 ⁰ С.
Реакция непрямой гемагглютинации	Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) заключается в том, что эритроциты барана или другого вида животных, на поверхности которых адсорбированы антигены, становятся "чувствительными" (сенсibilизированными) к соответствующей иммунной сыворотке. Под воздействием специфических антител сенсibilизированные эритроциты склеиваются и выпадают в осадок, образуя на дне пробирки (или лунки) гемагглютинат. Отличаясь высокой специфичностью и чувствительностью, РНГА позволяет выявлять минимальное количество антител.
Система комплемента	Группа сывороточных белков, которые в процессе их активации превращаются в эффекторные молекулы, приводящие к развитию воспаления (С3а, С5а, С4а), фагоцитоза (С3b) и разрушению клеток (С6-9). Таким

	образом, белки комплемента принимают участие в развитии воспалительных реакций, реакций опсонизации и лизиса клеточных мембран.
Диагностикумы	Диагностикумы - стандартные антигены, в роли которых могут быть суспензии инактивированных, реже живых, бактерий, вирусов или их антигенов в изотоническом растворе. Диагностикумы применяются при серологической диагностике инфекционных заболеваний.

Теоретические вопросы к занятию:

- Диагностикумы, их характеристика, принципы получения и практическое использование.
- Трехкомпонентные и многокомпонентные серологические реакции (иммунного лизиса, реакция связывания комплемента, опсонофагоцитарная, непрямой гемагглютинации), их суть, практическое использование.
- Система комплемента, пути ее активации, биологическое значение.
- Реакция иммунного гемолиза, механизм, практическое использование.
- Оценка результатов серологических реакций и выводы.
- Реакции бактериолиза, цитолиза, их механизм и практическое использование.

Дополнительный материал к теме:

При необходимости экстренного создания иммунитета, а также для лечения уже развивающейся инфекции используют сывороточные препараты - иммунные сыворотки и иммуноглобулины, действующим началом которых являются специфические антитела готовые антитела. Эти препараты обеспечивают развитие искусственного пассивного иммунитета, что определяет область их использования – профилактика и лечение инфекционных заболеваний.

Обычно сывороточные препараты вводят парентерально, что обуславливает быстрое развитие невосприимчивости, но оно длится не долго (около 2-3 нед).

Иммунные сыворотки получают или от иммунизированных животных (*гетерологичные сыворотки*), или переболевших, а также вакцинированных людей (*гомологичные сыворотки*).

1. **Гетерологичные сыворотки** готовят путем гипериммунизации чаще всего лошадей, т.е. путем многократного введения животным больших доз антигена по разработанной схеме. На пике антителообразования у иммунных животных забирают кровь, освобождают ее от форменных элементов и фибрина, фильтруют и стандартизируют по концентрации антител (антитоксинов, агглютининов, вируснейтрализующих антител и т.д.), содержанию белка и другим свойствам. Полученная таким образом нативная иммунная сыворотка содержит много балластных белков, и имеют относительно низкую концентрацию антител. Поэтому из нее получают **иммуноглобулины** путем выделения, очистки и концентрирования их ферментативным способом в сочетании диализом (“Диаферм”), осаждением спиртом на холоде, хроматографией или иными

способами. Предпочтительнее использование глобулиновых фракций, которые содержат не более 20% всех белков, содержащихся в сыворотке. Однако гетерологичные сыворотки иммуногены для человека. Иммуноглобулины содержат меньше балластного белка и имеют более высокую концентрацию антител.

2. Препараты иммуноглобулинов, полученные из человеческой крови, для человека не иммуногены и в этом их преимущество перед гетерологичными сыворотками и глобулинами.

Гомологичные сыворотки готовят из донорской или плацентарной крови, предварительно смешивают сыворотки, полученные из крови разных лиц, и поэтому концентрация в них антител невелика. Для получения препаратов иммуноглобулинов (гомологичных) с повышенным содержанием антител производят предварительный отбор сырья – используют сыворотки реконвалесцентов или доноров, подвергнутых иммунизации. Такие препараты чаще используют для групп риска: новорожденных, тяжелобольных и т.п.

Разработаны также методы получения активных фрагментов иммуноглобулинов, активных центров (детерминант) иммуноглобулинов (так называемые доменные иммуноглобулины). Их преимущество заключается в незначительно белковой нагрузке, более высокой специфичности и эффективности препаратов. Для получения гомологичных иммуноглобулинов и их фрагментов используют кровь иммунных (переболевших, вакцинированных) людей или специально вакцинированных доноров, а также плацентарную и абортную кровь.

Иммунные сыворотки, иммуноглобулины и их фрагменты подразделяются на:

1. *Антитоксические* - сыворотки против дифтерии, столбняка, ботулизма, газовой гангрены, т.е. сыворотки, содержащие в качестве антител антитоксины, которые нейтрализуют специфические токсины.

2. *Антибактериальные* - сыворотки, содержащие агглютинины, преципитины, комплементсвязывающие и другие антитела к возбудителям таких болезней, как брюшной тиф, дизентерия, чума, коклюш и др.

3. *Противовирусные* - сыворотки (коревая, гриппозная, антирабическая и др.), содержащие вируснейтрализующие, комплементсвязывающие и другие противовирусные антитела.

Сывороточные препараты также можно разделить на:

1. Нормальные сыворотки – получают из крови нескольких тысяч доноров и используют для профилактики респираторных инфекций у детей, для профилактики гепатита А, эпидемического паротита, кори, ветряной оспы. Они содержат кроме специфичных антител и большое кол-во других иммуноглобулинов.

2. Иммунные сыворотки – содержат иммуноглобулины направленного действия (антистафилококковый, против синегнойной палочки). Их получают путем очистки от неспецифических антител.

В настоящее время используются:

1. Иммуноглобулины человека: противогриппозный, противокклюшный, противодифтерийный, противостолбнячный, против клещевого энцефалита, против ветряной оспы, против гепатита А, противостафилококковый, противоботулинические.

2. Гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины: противодифтерийная, противостолбнячная, противоботулиническая А, В, Е, противогангренозные – лошадиные, антирабический иммуноглобулин, противосибирезвенный иммуноглобулин, пролущенные из сыворотки лошадей, иммуноглобулин против клещевого энцефалита.

Активность иммунных сывороточных препаратов выражают в единицах, определяемых в серологических реакциях нейтрализации, агглютинации, преципитации и т.д. Профилактическое и лечебное действие оценивают в опытах на экспериментальных животных (белые мыши, кролики, морские свинки). Например, активность антитоксических сывороток выражают в международных антитоксических единицах (МЕ): 1 МЕ — это количество антител, нейтрализующее определенное количество D_{1m} специфического токсина. Например, 1 МЕ противостолбнячной сыворотки — это количество антитоксина, нейтрализующее 100 D_{1m} токсина для белой мыши. Противостолбнячная сыворотка обычно содержит 3000 МЕ/мл.

Иммунные сыворотки и иммуноглобулины создают пассивный специфический иммунитет практически сразу же после их введения. Этот иммунитет сохраняется при введении гомологичных сывороток до 1-1,5 мес и гетерологичных — до 10—20 сут (в организме чужеродные белки быстрее разрушаются). Иммунные сывороточные препараты вводят, как правило, внутримышечно в больших дозах и как можно раньше после вероятного инфицирования. Разработаны препараты и для внутривенного введения.

Осложнения иммунопрофилактики.

Чужеродные сыворотки и иммуноглобулины при введении людям могут вызывать осложнения в виде анафилактического шока или сывороточной болезни. При первом введении таких препаратов происходит сенсибилизация, а при повторном – развитие аллергических реакций немедленного типа.

Наиболее опасным осложнением является **анафилактический шок** - на фоне или сразу после введения лекарственного препарата появились слабость, головокружение, затруднение дыхания, чувство нехватки воздуха, беспокойство, чувство жара во всем теле, иногда рвота, кожа бледная, холодная влажная, дыхание частое, поверхностное, систолическое давление 90 мм рт. ст. или ниже. В тяжелых случаях угнетение сознания и дыхания. А при отсутствии квалифицированной медицинской помощи через 5-30 мин может наступить летальный исход.

Срок развития **сывороточной болезни** после введения гетерологичной сыворотки зависит от времени и частоты введения препарата. Так, после первого введения симптомы болезни проявляются в среднем через 7-10 дней, а при повторном – через более короткий срок – от нескольких часов до 2-3 дней. Продолжительность болезни зависит от ее тяжести и составляет от нескольких дней до 2 недель.

Для профилактики анафилактического шока перед введением гетерологической сыворотки ставят внутрикожную пробу с разведенной 1:100 сывороткой лошади (ампула прилагается в наборе с сывороткой и маркирована красным цветом). Такую сыворотку вводят внутрикожно в сгибательную поверхность предплечья в объеме 0,1 мл. Учет результата проводят через 20 мин. Проба считается отрицательной, если диаметр отека (гиперемии) в месте инъекции, менее чем 1 см. Проба считается положительной, если диаметр отека 1 см и более.

При отрицательной кожной пробе неразведенную сыворотку (ампула маркирована синим цветом и входит в набор) вводят в объеме 0,1 мл подкожно в области средней трети плеча. При отсутствии местной и общей реакции через 30-60 мин внутримышечно вводят необходимую дозу сыворотки.

Если кожная проба положительная, а также при развитии реакции на подкожную инъекцию, препарат используют только при жизненной необходимости. Обязательны мероприятия по десенсибилизации – введение по Безредко. Для этого сыворотку, разведенную 1:100, вводят подкожно в объеме 0,5 мл, 2 мл, 5 мл с интервалом 15-20 мин, затем с такими же интервалами вводят подкожно 0,1 мл, и 1,0 мл неразведенной сыворотки. При отсутствии реакции вводят назначенную дозу сыворотки.

Одновременно с началом десенсибилизации начинают противошоковую терапию. Всегда наготове необходимо иметь раствор адреналина 1:1000 или 0,5% раствор эфедрина.

Реакции нейтрализации токсина антитоксином.

При диагностике некоторых инфекционных заболеваний, возбудители которых продуцируют экзотоксины, используют реакцию нейтрализации токсина антитоксином. Для ее проведения исследуемый материал, в котором подозревают наличие токсина, смешивают с соответствующей антитоксической сывороткой и после инкубации в термостате вводят лабораторным животным (белые мыши, морские свинки). Контрольным животным вводят только исследуемый материал. Если взятая в опыт антитоксическая сыворотка нейтрализует токсин, животные останутся живы. Контрольные животные гибнут под действием токсина. Реакция нейтрализации используется для выявления токсинов возбудителей ботулизма, столбняка, газовой гангрены.

Часто для определения активности иммунных антитоксических сывороток анатоксинов используется реакция нейтрализации по механизму флоккуляции.

Реакция флоккуляции.

В результате взаимодействия токсина или анатоксина с антитоксической сывороткой выпадают хлопья флоккулята. Наиболее интенсивная и ранняя («инициальная») флоккуляция происходит в пробирке, где антиген и антитело содержатся в эквивалентных соотношениях.

Реакцию ставят в два этапа.

1. По стандартной сыворотке устанавливают Lf (Limes flocculationis) в 1 мл токсина. Lf токсина определяется его количеством, которое дает «инициальную»

флоккуляцию с международной единицей (МЕ) сыворотки. Установив силу токсина, приступают к определению силы сыворотки.

2. Известной силы токсин и испытуемую антитоксическую сыворотку разливают в пробирки в определенном объеме. Пробирки выдерживают на водяной бане при 45°C в течение 30 мин до выпадения хлопьев в одной из них.

«Инициальная» флоккуляция проявляется в той пробирке, где количество токсина соответствует количеству международных единиц сыворотки. Например, если флоккуляция произошла в 3-й пробирке, значит в 0,4 мл сыворотки находится 40МЕ. Следовательно, 1 мл сыворотки содержит $40:0,4=100$ МЕ.

Ингредиенты, мл	№ пробирки						
	1	2	3	4	5	6	7
Токсин, содержащий 20 Lf в 1 мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Исследуемая сыворотка	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	-	0,6
Инкубация при 45°C в течение 30 мин							
Результаты по «инициальной» флоккуляции							

Рекомендации для оформления протокола.

Учет поставленной на предыдущем занятии реакции агглютинации с целью серологической идентификации культуры бактерий.

Студенты проводят окончательный учет поставленной на предыдущем занятии реакции агглютинации с целью идентификации культуры бактерий. Степень позитивной реакции агглютинации обозначается плюсами:

++++ - полная агглютинация, жидкость прозрачная, а на дне значительное количество белого осадка;

+++ - жидкость не совсем прозрачная, осадок меньше;

++ - жидкость непрозрачная, осадок еще меньше;

+ - жидкость мутная, очень незначительный осадок;

- - жидкость равномерно мутная, как в контроле антигена; осадок отсутствует. Результат в этом случае считают негативным.

Соответствие между видом микроба и диагностической агглютинирующей сывороткой считается достоверным при условии четко выраженной реакции агглютинации в пробирках с разведением сыворотки в пределах титра, но не менее 2/3 ее титра при отсутствии осадка в контролях сыворотки и культуры.

Постановка реакции агглютинации с целью выявления антител в сыворотке больного с подозрением на брюшной тиф и паратиф А и В.

Для проведения реакции берут у больного кровь, получают из нее сыворотку и разводят изотоническим раствором натрия хлорида от 1:50 до 1:800 по схеме. Как антиген в этой реакции используют диагностикумы - суспензии из известных убитых микроорганизмов - брюшного тифа и паратифа А и В.

СХЕМА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНОГО

№ пробирки Ингредиенты (в мл)	Опытные					Контрольные	
	1	2	3	4	5	6	7
Физраствор	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	---
Сыворотка крови больного в разведении 1:25 (0,1 мл с-ки + 2,4 мл физ.раствора)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	В дез. р-р. ---	1,0
Диагностикум	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	---
Полученные разведения сыворотки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	КД	КС

Штатив с пробирками помещают в термостат при 37⁰С. Предварительный учет реакции проводят через 2 часа, а окончательный - через 18-20 часов.

Принцип постановки и учет результатов реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), поставленной с целью серологической диагностики.

Суть реакции непрямой гемагглютинации заключается в том, что эритроциты, на поверхности которых адсорбируются растворимые антигены, приобретают способность агглютинироваться при взаимодействии с антителами, специфическими к адсорбированному антигену. Эритроциты, сенсibilизированные антигенами, называются эритроцитарными диагностикумами. Чаще всего используют эритроциты барана, которым свойственна высокая адсорбирующая активность. Реакцию ставят по такой схеме: в пробирках или лунках прогретую на протяжении 30 мин. при 58⁰С исследуемую сыворотку разводят последовательно от 1:10 до 1:320 в объеме 0,25 мл и добавляют по 2 капли эритроцитарного диагностикума. Реакцию сопровождают контролями: на спонтанную агглютинацию сенсibilизированных эритроцитов, контроль с нормальными эритроцитами, а также контроли диагностикумов с заведомо положительной и отрицательной сыворотками. После легкого встряхивания пробирки или лунки выдерживают в термостате 30-45 мин. при 37⁰С. Учет результатов реакции осуществляют после выпадения в осадок эритроцитов в соответствующих контрольных пробирках. Достоверными результатами следует считать отсутствие гемагглютинации в контролях с нормальными, сенсibilизированными эритроцитами, с заведомо негативной сывороткой и наличие гемагглютинации с заведомо положительной сывороткой. Гемагглютинация в опытных пробирках при соответствующих контролях свидетельствует о наличии специфических антител в исследуемой сыворотке. Результаты оценивают по внешнему виду осадка эритроцитов в лунках. В положительном случае (+) эритроциты равномерно в виде "зонтика" покрывают почти все дно пробирки или лунки. При отрицательном результате (-) эритроциты оседают в форме компактного комочка - "пуговицы".

Постановка реакции иммунного гемолиза.

Иммунный лизис - это растворение клеток (антигенов) под действием специфических антител (лизинов) в присутствии комплемента. В зависимости от

антигенов, которые участвуют в реакции лизиса, она получила название бактериолиза, спирохетолиза, гемолиза и тому подобное. Чаще всего используется в лабораторной практике реакция гемолиза как индикаторная система в реакции связывания комплемента. Для постановки реакции нужны: 1) антиген - 3% суспензия эритроцитов; 2) антитело - гемолитическая сыворотка против эритроцитов барана; 3) комплемент - сыворотка морской свинки, разведенная 1:10; 4) изотонический раствор хлорида натрия.

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ОСНОВНОГО ОПЫТА РЕАКЦИИ ГЕМОЛИЗА

№ пробирок Ингредиенты (в мл)	Опыт	Контроли		
	1	2	3	4
Антитело - гемолитическая сыворотка	0,5	---	0,5	---
Антиген - 3% взвесь эритроцитов барана	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент (1:10)	0,5	0,5	---	---
Физраствор	---	0,5	0,5	1,0

Все пробирки ставят в термостат на 30-45 минут при 37⁰С, после чего проводят учет реакции. В данном случае в опытной пробирке должен наступить гемолиз в результате специфической реакции между гемолитической сывороткой и эритроцитами в присутствии комплемента. В контрольных пробирках не должно быть гемолиза, потому что в одной из них отсутствует комплемент (контроль гемолитической сыворотки), во второй отсутствует гемолитическая сыворотка (контроль комплемента), а в третьей отсутствуют комплемент и гемолитическая сыворотка (контроль эритроцитов).

Аллергия.

Аллергия (от греч. allos - другой) – специфическая повышенная чувствительность к антигенам (аллергенам) в результате неадекватной реакции иммунной системы.

Алгоритм развития аллергической реакции:

I Стадия сенсibilизации — первичная встреча с аллергеном, результатом которой является возникновение сенсibilизации.

Сенсibilизация (лат. *sensibilis* — чувствительность) — стадия аллергической реакции, при которой происходит переход от нормальной реактивности организма к какому-либо веществу к повышенной.

Начальные этапы развития аллергической реакции соответствуют формированию иммунного ответа по гуморальному либо клеточному пути.

II Стадия разрешения (собственно аллергическая реакция).

В самой аллергической реакции различают 3 связанные между собой фазы:

1) *иммунологическая фаза*. Осуществляется взаимодействие аллергена с АТ и/или сенсibilизированными к нему Т-лимфоцитами;

2) *патохимическая реакция*. После взаимодействия аллергена с Ат или Т-лимфоцитом образуются иммунные комплексы, которые активируют образование и высвобождение медиаторов аллергии;

3) *патофизиологическая фаза*. Под влиянием комплексов Аг-АТ, медиаторов аллергии происходит повреждение тканей — периферические эффекты. Основными участниками событий при аллергии являются Т- и В-лимфоциты, макрофаги, гранулоциты, система комплемента и другие белки плазмы, ламброциты и другие клетки.

III Стадия десенсибилизации (гипосенсибилизации)

Специфическая десенсибилизация основана на использовании того аллергена, который вызвал сенсibilизацию, и рассчитана на формирование толерантности организма к этому аллергену.

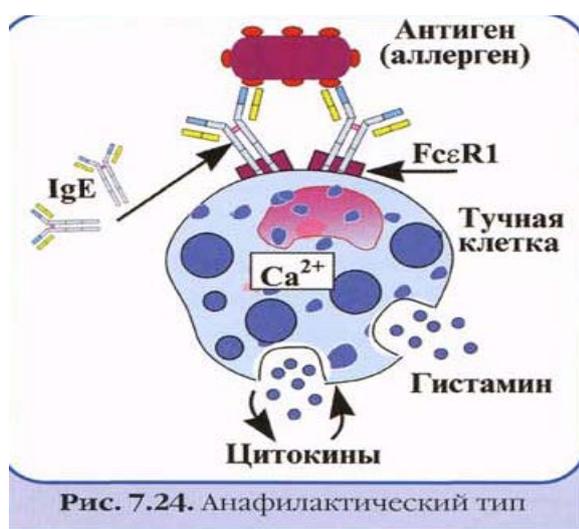
Неспецифическая десенсибилизация основывается на ослаблении основных механизмов развития аллергических реакций и коррекции их регуляции.

Аллергические реакции различаются по времени их появления после повторного контакта с аллергеном:

1) реакции гиперчувствительности немедленного типа (ГЧНТ) - развиваются через несколько минут;

2) реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЧЗТ) – развиваются через 6-10 ч и позднее.

По классификации Джелла и Кумбса все аллергические реакции в зависимости от механизмов развития разделяют на 4 типа.



Реакции гиперчувствительности I типа – анафилактический тип (синонимы: медиаторный, реагиновый, IgE-опосредованный) - характеризуется синтезом антител с особой клеточной аффинностью (гомоцитотропные). У человека первый тип аллергических реакций опосредуется IgE- и IgG4-антителами. В развитии иммунной реакции принимают участие 3 основные клетки, в тесном взаимодействии осуществляющие иммунный ответ – Т-лимфоциты, В-

лимфоциты и макрофаги. Макрофаги первыми получают информацию об антигене путем захвата и переработки его соответствующими ферментами с последующей подготовкой (процессингом) к связыванию и индуцированию

соответствующих иммунных реакций с лимфоцитами. Клетками продуцентами IgE-АТ являются дифференцированные В-лимфоциты, а регуляторами синтеза этих АТ являются Т-клетки. IgE-АТ, взаимодействуя с Fc-рецепторами клеток-мишеней (например, тучные клетки, базофилы), фиксируются на их поверхности, и при повторном контакте с аллергеном на поверхности клетки-мишени развивается специфическая реакция, приводящая к активации клетки, с последующим высвобождением БАВ (гистамин, серотонин, эозинофильный и нейтрофильный хемотаксические факторы, протеазы). Эти медиаторы взаимодействуют с рецепторами мышечных клеток, секреторных и многих других клеток, что приводит к сокращению гладкой мускулатуры (напр., бронхов), повышению проницаемости сосудов и отеку. На рис. 1 представлена примерная схема развития аллергических реакций 1-го типа (рисунки цитированы по И.С.Гущину, 2002). Такое развитие чаще наблюдается после воздействия атопических аллергенов (пыльцевые, бытовые, эпидермальные, пищевые и др.), введения чужеродных сывороток и сывороточных препаратов, пенициллинов, сульфаниламидных препаратов, местных анестетиков и других средств. По 1-му типу аллергических реакций протекают анафилактический шок, поллиноз, атопическая бронхиальная астма, атопический дерматит, отек Квинке, анафилактические реакции на укусы насекомых и др.

Анафилактические реакции специфичны и развиваются после попадания аллергена, к которому организм был предварительно сенсибилизирован. После первичного контакта с аллергеном такое состояние формируется через 7-14 сут. и сохраняется годами.

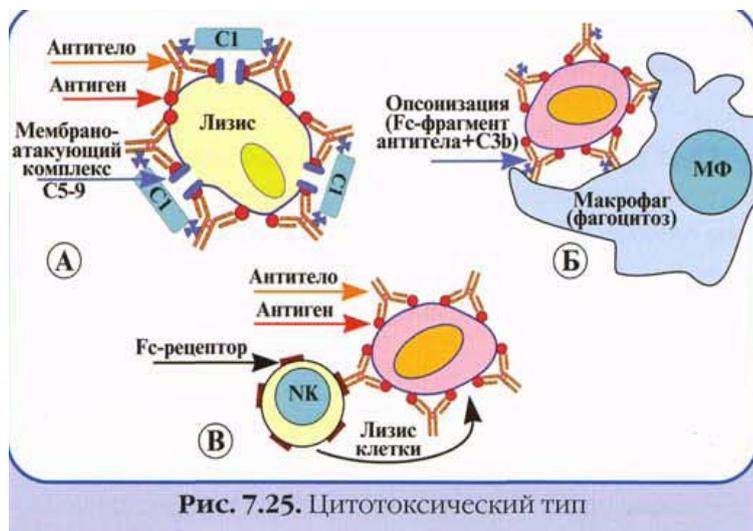


Рис. 7.25. Цитотоксический тип

Реакции гиперчувствительности II типа – цитотоксический тип.

характеризуется образованием АТ (IgG1, IgG2, IgG3, IgM) к первичным или вторичным компонентам клеточных мембран и обусловлен взаимодействием АТ с фиксированными на мембранах собственных клеток антигенами (АГ). Поскольку АТ взаимодействуют с АГ на клетках своими Fab-фрагментами, Fc-фрагменты остаются свободными и активируют систему комплемента. В процессе активации комплемента образуется цитотоксический мембраноатакующий комплекс (МАК), повреждающий клетку-мишень. Результатом такого взаимодействия является активация комплемента, приводящая к повреждению и последующей гибели клетки (рис. 2). АГ при втором типе реакций чаще являются медикаменты, бактериальные, вирусные и другие инфекционные аллергены, аутоаллергены и др.

фрагменты остаются свободными и активируют систему комплемента. В процессе активации комплемента образуется цитотоксический мембраноатакующий комплекс (МАК), повреждающий клетку-мишень. Результатом такого взаимодействия является активация комплемента, приводящая к повреждению и последующей гибели клетки (рис. 2). АГ при втором типе реакций чаще являются медикаменты, бактериальные, вирусные и другие инфекционные аллергены, аутоаллергены и др.

Клинически проявляются поражениями крови (иммунные цитопении), поражении легких и почек при синдроме Гудпасчера, острыми отторжениями трансплантатов, гемолитической болезнью новорожденных.

По 2-му типу аллергических реакций могут протекать пищевая и лекарственная аллергия, аллергические реакции на укусы насекомых (кровососущих и др.) и др.

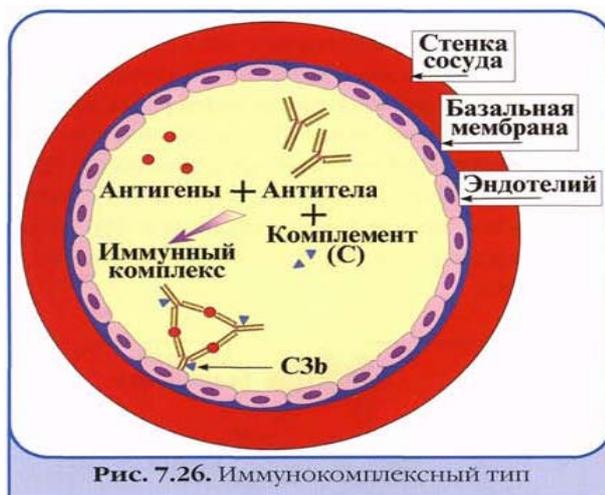


Рис. 7.26. Иммунокомплексный тип

Реакции гиперчувствительности III типа – иммунокомплексный тип.

Данные реакции обусловлены образованием иммунных комплексов, фиксирующихся в тканях и вызывающих их повреждение. В норме такие комплексы Ag-Аг элиминируются фагоцитами. Иногда при высоких концентрациях иммунных комплексов они задерживаются в тканях (часто не имеющих отношения к источнику антигена) и запускают местные и системные воспалительные реакции.

Комплексы, связывающие IgG- и IgM-АТ, активируют систему комплемента по классическому пути, а комплексы, содержащие IgA-АТ, могут активировать систему комплемента по альтернативному пути. Связывая и активируя компоненты системы комплемента, они привлекают фагоциты. Последние не способны поглощать такие большие структуры и выделяют протеолитические ферменты и другие медиаторы воспаления, повреждающие ткани, в которых фиксирован комплекс. При третьем типе аллергических реакций чаще поражаются органы, богатые капиллярами (кожа, легкие, почки), а также соединительная ткань.

Клинические примеры: сывороточная болезнь, экзогенный аллергический альвеолит (комплексы фиксируются в легочных капиллярах), системная красная волчанка, ревматоидный артрит (комплексы фиксируются в синовиальных оболочках суставов), васкулиты (комплексы фиксируются в эндотелии кровеносных сосудов), гломерулонефрит (комплексы фиксируются в фильтрующем аппарате почек).



Рис. 7.27. ГЗТ (гиперчувствительность замедленного типа)

Реакции гиперчувствительности IV типа – клеточно-опосредованный (гиперчувствительность замедленного типа, ГЗТ).

Обусловлена клеточными иммунными реакциями. Развиваются не ранее чем через 24-48ч после повторного введения антигена. Развитие ГЗТ индуцируют продукты микроорганизмов, гельминтов, природные и искусственные антигены и гаптены

(лекарства, косметика).

Классические примеры – туберкулиновая проба и контактный дерматит.

Распознавание антигена связанного с белками организма, иммунокомпетентными клетками вызывает активацию Т-хелперов, что приводит к пролиферации Т-киллеров ГЧЗТ. Сенсibilизированные Т-киллеры секретируют лимфокины, участвующих в межклеточных взаимосвязях иммунных реакций и ответственных за развитие клинических проявлений замедленного типа гиперчувствительности, а также привлекают другие лимфоциты и макрофаги в очаг. На более поздних этапах в реакцию включаются полиморфно-ядерные фагоциты, стимулирующие воспалительный ответ. Аллергические АТ в этих реакциях не участвуют (рис. 4). Среди лимфокинов наиболее важное значение в развитии ИАР имеют такие медиаторы, как фактор угнетения миграции макрофагов, фактор хемотаксиса нейтрофилов и моноцитов, митогенный фактор, фактор переноса и др.

Гаптены приобретают способность инициировать реакции ГЧЗТ после взаимодействия с белками. Белки же вызывают ГЧЗТ при длительной иммунизации малыми дозами в сочетании с адьювантами. Многие низкомолекулярные органические и неорганические вещества (напр., хром), связываясь с белками кожи, выполняют роль гаптен и сенсibilизируют организм при длительном контакте. В результате развивается контактный дерматит.

Способность отвечать развитием ГЧЗТ на различные микробные продукты (напр., антигены возбудителей туберкулеза, бруцеллеза) применяют при постановке проб для диагностики инфекционного процесса или установления возможного контакта организма с возбудителем.

Гиперчувствительность V типа

В конце 70-х годов был выделен **пятый тип аллергических реакций**, в основе которого, так же как при 1-м, 2-м и 3-м типах аллергических реакций, лежит взаимодействие АГ с АТ.



Рис. 5. Схема реакции гиперчувствительности 5-го типа.

При пятом (антирецепторном или стимулирующем) типе аллергических реакций в процессе принимают участие АТ, направленные против разных компонентов клеточной поверхности, например, против рецепторов физиологических медиаторов (ацетилхолиновых, адренорецепторов, рецепторов для гормонов и т.п.). АТ при 5-м типе аллергических реакций чаще относятся к

иммуноглобулинам класса IgG. По 5-му типу могут протекать бронхиальная астма, атопический дерматит, сахарный диабет и др. (рис. 5). В развитии аллергических реакций разных типов можно выделить три стадии: иммунологическая (стадия иммунных реакций), патохимическая (стадия биохимических реакций) и патофизиологическая (стадия клинических проявлений).

Реакции гиперчувствительности типа V обусловлены взаимодействием антител с антигенами клеточной поверхности - ключевыми компонентами клеточной поверхности, например, с рецептором гормона, что приводит к активации клетки. Пример такого состояния - гиперреактивность щитовидной железы при болезни Грейвса, вызванной антителами, стимулирующими тиреоидные клетки.

Методы диагностики аллергических реакций

Цели аллергодиагностики:

- выявление свободных антител в сыворотке крови и секретах;
- обнаружение антител, связанных с лейкоцитами.

Применяемые реакции:

- прямой тест дегрануляции базофилов,
- реакция аллергенспецифического повреждения гранулоцитов,
- реакция выброса ионов K^+ и др.;
- определение лимфоцитов, сенсibilизированных к аллергену.

Методы диагностики аллергических реакций:

- специальный расспрос больного (аллергологический анамнез).

Выясняется наследственная предрасположенность к аллергическим заболеваниям,

предположительно определяются аллергены;

- кожные пробы.

Варианты постановки:

- накожные (аппликационные, patch-tests) пробы;
- скарификационные кожные пробы;
- внутрикожные пробы.

Результаты кожных проб в зависимости от применяемого антигена оценивают через 20 минут, 5-6 часов и 1-2 суток.

Интенсивность реакции определяют обычно в плюсах (от 1 до 4) или по диаметру папулы на коже.

- провокационные тесты;
- элиминационные тесты;

• лабораторные методы. Наиболее часто при аллергических заболеваниях применяют методы количественного определения иммуноглобулинов различных классов, особенно IgE; реакция Кумбса применяется для распознавания гемолитической анемии.

Вопросы для самоконтроля

- Что означают понятия "серологическая идентификация возбудителя заболевания" и "серологическая диагностика инфекционного заболевания"?
- Как классифицируют серологические реакции?
- Что представляют собой и как получают стандартные диагностикумы?
- Какие серологические реакции являются многокомпонентными?
- Что такое система комплемента? Каковы пути ее активации?
- Что такое реакции иммунного лизиса?
- Что такое реакция иммунного гемолиза? Какова цель ее использования?
- Что такое реакция непрямой гемагглютинации? Какова цель ее использования?

Серологические реакции с метками

Актуальность темы:

На современном этапе развития микробиологии и иммунологии среди иммунологических методов диагностики инфекционных заболеваний все шире применяются серологические реакции с мечеными антигенами или антителами, такие как реакция иммунной флуоресценции (РИФ), иммуноферментный (ИФА) и радиоиммунный анализы (РИА). Это обусловлено высокой чувствительностью и специфичностью названных реакций, возможностью применения их с целью экспресс-диагностики инфекционных заболеваний. На практическом занятии студенты продолжают изучение двухкомпонентных и многокомпонентных серологических реакций (реакция агглютинации, реакция связывания комплемента), что способствует закреплению знаний, полученных на предыдущих занятиях. Также студентам предоставляется возможность ознакомиться с методикой постановки реакций с метками, самостоятельно осуществить оценку поставленных РИФ и ИФА. Все это обуславливает актуальность темы занятия и формирует позитивную мотивацию ее изучения.

Конкретные цели:

- Усвоить принципы, методику и осуществить учет реакции связывания комплемента (РСК) с целью выявления антител в исследуемой сыворотке.
- Осуществить учет реакции агглютинации, поставленной с целью серологической диагностики, сделать вывод.
- Провести идентификацию микробной культуры в препарате с помощью иммунофлуоресцентного метода (демонстрация)
- Ознакомиться с принципами постановки иммуноферментного анализа (ИФА) и радиоиммунного анализа (РИА). Провести учет ИФА, поставленного с целью серодиагностики.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:

Термин	Определение
Реакция связывания комплемента	Многокомпонентная серологическая реакция, которая заключается во взаимодействии антигена с соответствующим специфическим антителом и образовании специфического комплекса антиген-антитело и связыванием комплемента.
	Образовавшийся комплекс не вызывает никаких видимых изменений. Чтобы установить, состоялось ли связывание комплемента или он остался свободным (несвязанным), в реакцию вводят вторую систему (гемолитическую), которая в свою очередь состоит из антигена (3% взвесь эритроцитов) и специфической гемолитической сыворотки (взятой в утроенном титре). При отсутствии свободного активного комплемента гемолиз эритроцитов под действием специфического гемолизина не происходит (реакция позитивна). В случае несоответствия антитела и антигена в первой системе, комплемент остается свободным и в его присутствии наступает гемолиз второй системы (реакция негативна).
Моноклональные антитела (МКАТ)	Антитела, полученные с помощью гибридомных технологий. Принадлежат к одному классу иммуноглобулинов и реагируют со специфическим эпитопом антигена, против которого они выработались. В серологических реакциях с меткой использование МКАТ имеет целый ряд преимуществ по сравнению с поликлональными антителами, а именно: однородность, отсутствие неспецифических антител, простота распознавания и высокая воспроизводимость результатов.
Серологические реакции с метками	Реакции, основанные на выявлении образованного при взаимодействии антигена с антителом иммунного комплекса по метке, прикрепленной к одному из компонентов реакции, которая наблюдается или визуально, или с помощью специальных высокочувствительных приборов, позволяющих количественно выявить меченый субстрат и, соответственно, неизвестный антиген или антитело.
Метка	Для РИФ – светящийся в ультрафиолетовом свете краситель (изоцианат флюоресцеина). Для ИФА – фермент (пероксидаза, щелочная фосфатаза), выявляемый по изменению цвета соответствующего субстрата Для РИА – изотоп, выявляемый с помощью

	радиометрии.
Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)	<p>Основана на свойстве флюоресцирующих антител специфически соединяться с гомологичным антигеном и светиться в фиолетовой и ультрафиолетовой части спектра люминесцентного микроскопа. РИФ специфична, высокочувствительна, используется в основном для идентификации антигена и может быть осуществлена в нескольких вариантах.</p> <p>1. Прямая РИФ – используются иммунофлюоресцирующие сыворотки против каждого исследуемого антигена.</p> <p>2. Непрямая РИФ - основана на использовании двух разных сывороток. На первом этапе используют немеченые антитела против исследуемого антигена, а на втором этапе реакции образованный комплекс антиген-антитело обрабатывают флуоресцирующей сывороткой, которая содержит антитела против гамма-глобулинов того вида животных, от которых была получена специфическая немеченая сыворотка.</p>
Имуноферментный анализ (ИФА)	<p>Основан на использовании в качестве метки для антител ферментов, способных разлагать субстраты с образованием окрашенных продуктов. Используются как прямой, так и непрямой варианты ИФА. Суть его заключается в том, что сначала на каком-то твердом материале будут сорбированы антигены (или антитела), а потом добавлены все другие ингредиенты серологической реакции. Как твердофазные носители антигена или антител широко используются пластиковые планшеты, шарики, пленки, пробирки из разных синтетических материалов. Адсорбированные на поверхности таких материалов антигены или антитела даже в высушенном состоянии долгое время сохраняют свою иммунологическую специфичность и способность вступать в серологические реакции.</p> <p>Наличие и активность фермента, связанного с антителом или комплексом антиген-антитело выявляют и оценивают визуально по интенсивности окраски после инкубации с соответствующим субстратом. ИФА проводится с помощью специального оборудования, в котором автоматически происходит промывка реагентов буфером (вошер) и результат регистрируется с помощью фотометра (ридер).</p>
Радиоиммунный анализ	Радиоиммунный анализ (РИА) основан на использовании как метки одного из компонентов

	серологической реакции радиоактивных изотопов. Метод наиболее чувствителен и позволяет выявлять незначительные количества реагентов. Как и при постановке ИФА используют прямой и непрямой варианты. Для проведения РИА и регистрации результатов необходима специальная радиометрическая аппаратура.
--	---

Теоретические вопросы к занятию:

- Многокомпонентные серологические реакции, их характеристика, составные компоненты.
- Серологические реакции с использованием метки, требования к ним.
- Моноклональные антитела, принципы получения, их применение в серологических реакциях с метками.
- Реакция связывания комплемента (РСК), механизм, особенности постановки, практическое использование.
- Реакция Кумбса, механизм, практическое использование.
- Реакция иммунофлуоресценции (РИФ), суть, варианты постановки, практическое использование.
- Радиоиммунный анализ (РИА), суть, методы, особенности постановки и учета результатов.

Практические задания, которые выполняются на занятии:

- Провести учет реакции Видала, поставленной с целью определения АТ в сыворотке крови больного против возбудителей брюшного тифа и паратифа А и В. Сделать выводы.
- Провести учет результатов реакции связывания комплемента, поставленной с целью определения антител в сыворотке крови больного (демонстрационная работа). Сделать выводы.
- Провести идентификацию культуры грибов рода *Candida*, окрашенных иммунной сывороткой, меченой флуорохромом, в препарате с помощью иммунофлуоресцентного метода (демонстрационная работа). Сделать вывод.
- Провести учет ИФА, что была поставлена с целью выявления HBsAg в сыворотке крови больных с подозрением на вирусный гепатит В (демонстрационная работа). Сделать выводы.
- Изучить образцы тест-систем для постановки ИФА с целью выявления HBsAg.

Содержание темы:

На практическом занятии студенты знакомятся с особенностями постановки и применения серологических реакций с мечеными антителами и антигенами (ИФА, РИА, РИФ); проводят учет реакции Видала, поставленной с целью серодиагностики брюшного тифа и паратифа А и В; проводят учет результатов реакции связывания комплемента, поставленной с целью определения антител в

сыворотке крови больного; проводят идентификацию в препарате культуры грибов рода *Candida*, окрашенных иммунной сывороткой, меченой флуорохромом, с помощью иммунофлуоресцентного метода; проводят учет ИФА, поставленной с целью выявления HBsAg в сыворотке крови больных с подозрением на вирусный гепатит В; изучают образцы тест-систем для постановки ИФА с целью выявления HBsAg. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

Рекомендации по оформлению протокола.

Проведение учета реакции Видаля, поставленной с целью серодиагностики брюшного тифа и паратифов А и В.

При учете реакции Видаля определяют, с каким из диагностикумов и в каком титре состоялась реакция агглютинации. При положительной реакции агглютинации образуется беловатый осадок на дне пробирки с более-менее прозрачной жидкостью над ним. При отрицательной реакции жидкость остается мутной, осадок на дне пробирки отсутствует. Диагностическим титром реакции Видаля у больных, которые не вакцинировались и имеют типичную клиническую картину, считается 1:100, а при атипичных или стертых клинических формах заболевания - не ниже 1:200.

Постановка реакции связывания комплемента (РСК) с целью выявления антител в исследуемой сыворотке.

Реакция связывания комплемента основана на способности специфического комплекса антиген+антитело адсорбировать (связывать) комплемент. Поскольку процесс связывания комплемента не проявляется визуально, в качестве индикатора используется гемолитическая система (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка). Если антиген и антитело соответствуют друг другу, то комплемент связывается этим комплексом и гемолиз не проходит, а если комплекс не образуется, то наступает гемолиз.

РСК относится к сложным серологическим реакциям и для ее осуществления необходимо не менее 5 ингредиентов: антиген, антитело и комплемент (первая система), эритроциты барана и соответствующая им гемолитическая сыворотка.

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ОСНОВНОГО ОПЫТА РЕКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК) С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ В ИССЛЕДУЕМОЙ СЫВОРОТКЕ

№ пробирок	Опытная	Контрольные				
	1	2	3	4	5	6
Ингредиенты (в мл)						
Исследуемая сыворотка (1:10)	0,5	---	0,5	0,5	---	---
Антиген в рабочей дозе	0,5	0,5	---	0,5	0,5	0,5
Комплемент в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5	---	0,5	0,5
Заведомо положительная сыворотка (1:10)	---	---	---	---	0,5	---

Заведомо отрицательная сыворотка (1:10)	---	---	---	---	---	0,5
Изотонический раствор NaCl	---	0,5	0,5	0,5	---	---
В термостат на 2 часа при 37 ⁰						
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
В термостат на 1 час при 37 ⁰						

Провести в препарате идентификацию культуры грибов рода *Candida*, окрашенных иммунной сывороткой, меченой флуорохромом, с помощью реакции иммунофлуоресценции (демонстрационная работа). Сделать вывод.

При постановке прямой РИФ исследуемый материал (культуры грибов рода *Candida*) бактериологической петлей наносят на обезжиренное предметное стекло, готовят тонкий мазок, высушивают его на воздухе, фиксируют. На зафиксированный препарат наносят 1-2 капли флуоресцирующей сыворотки и красят во влажной камере 20-30 мин. при 25⁰С. После инкубации препарат промывают 2-4 раза забуференным изотоническим раствором, на протяжении 10-15 мин. прополаскивают дистиллированной водой, высушивают, наносят каплю нефлуоресцирующего масла и рассматривают в люминесцентном микроскопе с помощью иммерсионного объектива. При этом грибы рода *Candida* дают яркое свечение на темном фоне.

Провести учет ИФА, поставленной с целью выявления HBsAg в сыворотке крови больных с подозрением на вирусный гепатит В (демонстрационная работа).

Наличие и активность фермента, связанного с антителом или комплексом антиген-антитело выявляют и оценивают визуально по интенсивности расцветки после инкубации с соответствующим субстратом.

Вопрос для самоконтроля.

- На каком принципе основана реакция связывания комплемента; в чем ее преимущества перед другими серологическими реакциями?
- Какие серологические реакции можно применить с целью экспресс-диагностики инфекционных заболеваний?
- Какие перспективы и аспекты использования моноклональных антител? Почему в серологических реакциях с метками отдается предпочтение именно моноклональным антителам?
- В чем заключаются принципы прямой и непрямой РИФ, ИФА, РИА, каковы преимущества и недостатки этих методов?

Практическое занятие №13 **Тема: "Вакцины и иммунные сыворотки".**

Актуальность темы:

В общем комплексе противоэпидемических мероприятий большая роль принадлежит специфической профилактике и терапии инфекционных

заболеваний. Особое значение в этом имеют вакцины, иммунные сыворотки и иммуноглобулины, которые спасли жизнь миллионам людей. Вакцины и анатоксины способствуют формированию активного противои инфекционного иммунитета, мобилизуя механизмы иммунологической памяти. Введение иммунных сывороток и иммуноглобулинов создает немедленный пассивный гуморальный иммунитет, способный защитить организм от интоксикации или инфекции. Диагностические иммунные сыворотки используют для определения антигенной структуры возбудителя и его серологической идентификации для установления этиологии инфекционного заболевания.

Студентам предоставляется возможность ознакомиться с лечебно-профилактическими и диагностическими препаратами, используемыми в медицине, усвоить принципы их получения, методы стандартизации и контроля.

Это обуславливает актуальность темы занятия и формирует позитивную мотивацию ее изучения.

Конкретные цели:

- Проанализировать принципы получения вакцинных препаратов, дать сравнительную характеристику каждому из них, изучить методы их стандартизации и контроля, практическое использование.
- Ознакомиться с вакцинами, применяемыми в медицинской практике, принципами их классификации.
- Овладеть принципами изготовления иммунных сывороток, методами их стандартизации, контроля, практическое значение.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:

Термин	Определение
Иммуно-профилактика	Профилактика инфекционных заболеваний путем создания иммунитета к ним с помощью иммунологических методов - активной и пассивной иммунизации.
Иммунотерапия	Лечение больных иммунологическими методами
Вакцины	Биологические препараты, полученные из микроорганизмов, продуктов их жизнедеятельности, их синтетические, генно-инженерные аналоги, или антиидиотипические антитела, используемые с целью активной иммунизации людей для профилактики и терапии инфекционных заболеваний.
Аттенуация	Стойкое необратимое ослабление вирулентности патогенных микроорганизмов, используется для получения вакцинных штаммов.
Вакцина живая	Содержит жизнеспособные штаммы патогенных микроорганизмов с максимально сниженной вирулентностью, но сохраненными антигенными свойствами. Создает напряженный иммунитет, схожий с постинфекционным.

Вакцина инактивированная	Изготовлена из микроорганизмов, с выраженными иммуногенными свойствами, инактивированная (убитая) действием физических и химических факторов.
Вакцина химическая	Состоит из специфических антигенов, изъятых из микроорганизмов и очищенных от балластных веществ.
Анатоксин	Качественно новый препарат, полученный из экзотоксина путем действия 0,3% раствора формалина при температуре 37 ⁰ С в течение 30 дней.
Вакцина генно-инженерная	Получена на основе картирования геномов микроорганизмов: гены, контролирующие необходимые антигенные детерминанты, переносят в геном других микроорганизмов и клонируют в них, способствуя экспрессии этих генов в новых условиях.
Антиидиотипические антитела	Вакцины, полученные на основе антиидиотипических антител, активные центры которых имеют структуру, подобную эпитомам антигена.
Иммунные сыворотки	Сыворотки крови, полученные от человека или животных, иммунизированных определенным антигеном и содержащие антитела к этому антигену. Используются в качестве лечебного или диагностического средства.
Флокуляция	Разновидность реакции преципитации в жидкости, при которой комплексы антиген-антитело (чаще всего токсин-анатоксин) образуют видимые преципитаты (флокулянты). Может быть охарактеризована количественно.
Сила анатоксина	Наименьшее количество анатоксина, которое вступает в реакцию флокуляции в инициальной пробирке с одной антитоксической единицей антитоксической сыворотки при температуре 45 ⁰ С.
Инициальная пробирка	Пробирка, которая содержит эквивалентное количество анатоксина и антитоксина, в ней первой появляется опалесценция или мелкодисперсный осадок.

Теоретические вопросы к занятию:

- История развития иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных заболеваний.
- Принципы получения, методы стандартизации и характеристика вакцин первого поколения - живых и инактивированных.
- Принципы получения, методы стандартизации и характеристика вакцин второго поколения - химических и анатоксинов.
- Генно-инженерные вакцины, антиидиотипические антитела, теоретические основы для их создания, свойства, перспективы использования.
- Иммунные сыворотки и иммуноглобулины, принципы получения, практическое значение.
- Методы контроля вакцинных препаратов и препаратов из сывороток.

Практические задания, которые выполняются на занятии:

- Ознакомиться с вакцинами, применяемыми в медицине, определить их свойства, преимущества и недостатки, практическое приложение.
- Изучить принципы получения лечебно-профилактических и диагностических сывороток, используемых в медицине.
- Усвоить методику определения силы анатоксина в флоккуляционных единицах.
- Анализировать методы контроля вакцинных и сывороточных препаратов.

Содержание темы:

На практическом занятии студенты изучают принципы классификации, методы получения различных иммунопрофилактических, лечебных, диагностических препаратов, применяемых в медицине, их свойства, преимущества и недостатки. Усваивают принципы их стандартизации и контроля. Овладевают методом определения силы анатоксина с помощью реакции флоккуляции. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

Рекомендации по оформлению протокола.

Практическая работа №1. Определить силу дифтерийного анатоксина с помощью реакции флоккуляции.

Антитоксическую сыворотку известной силы (200 АЕ в 1мл) разливают в пробирки в уменьшающихся количествах (0,1 мл, 0,2 мл, 0,3 мл, 0,4 мл, 0,5 мл). Затем в каждую пробирку добавляют по 2 мл анатоксина, помещают в водяную баню при температуре 45⁰С и наблюдают появление опалесценции в инициальный пробирке. Зная количество антитоксических единиц сыворотки в данной пробирке, вычисляют количество иммуногенных единиц анатоксина.

Делают расчет силы анатоксина и вывод.

Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ	ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ
<ul style="list-style-type: none">• Антитоксические и антибактериальные Противодифтерийная сыворотка; Противостолбнячная сыворотка и противостолбнячный иммуноглобулин; Противогангренозная моно- и поливалентная сыворотки Антистафилококковый иммуноглобулин Глобулин против сибирской язвы	<ul style="list-style-type: none">• Для идентификации бактериальных инфекций Агглютинирующие Преципитирующие Комплементсвязывающие Лизирующие
<ul style="list-style-type: none">• Антивирусные	<ul style="list-style-type: none">• Для идентификации вирусов Вируснейтрализующие Комплементсвязывающие

Противокоревой иммуноглобулин Антирабический гамма-глобулин Противогриппозный иммуноглобулин Противооспенный иммуноглобулин Иммуноглобулин против вируса клещевого энцефалита	Антигемагглютинирующие
---	------------------------

3. Антигенная структура (значение отдельных серологических вариантов).
4. Устойчивость к факторам внешней среды и антимикробным препаратам.
5. Факторы патогенности: адгезины, инвазины, капсула, токсины, ферменты агрессии, белки, липиды и др. Их роль в развитии инфекционного процесса.
6. Эколого-эпидемиологические особенности:
 - источник (и) инфекции;
 - механизм заражения и пути передачи, факторы передачи возбудителя.
7. Основы патогенеза инфекции:
 - заболевание, вызываемое у человека;
 - входные ворота инфекции;
 - заражающая доза;
 - локализация в организме в разные периоды инфекции;
 - ткани и органы-мишени;
 - клинический материал, из которого, можно выделить возбудителя инфекции.
8. Особенности иммунитета.
9. Характерные признаки и исходы заболевания.
10. Принципы микробиологической диагностики - рекомендуемые методы.
11. Специфическое лечение (антибиотики, другие ХТП, сыворотки, иммуноглобулины, вакцины) особенности использования, условия их хранения, признаки непригодности.
12. Специфическая профилактика: плановая, экстренная; препараты, их механизм действия; дозирование, особенности введения, условия их хранения, признаки непригодности.

СХЕМА описания иммунобиологического препарата

1. Группа (например, вакцина, сыворотка, анатоксин, иммуноглобулин, аллерген, бактериофаг, антибиотик)
2. Положение внутри группы (например, сыворотка лечебная, антимикробная или антитоксическая)
3. Что и в каком виде содержит (например, антигены, антитела, микробные клетки (живые, инактивированные): например, противогриппозный иммуноглобулин содержит антитела - IgG)
4. Принцип получения (например, противоботулиническая сыворотка была получена путем гипериммунизации лошадей соответствующим анатоксином)

5. Единицы измерения активности (мл, мкг, флоккулирующие единицы (ЛФ), МЕ/мл, титр; например, анатоксин противодифтерийный содержит в 1 мл 60 флоккулирующих единиц очищенного дифтерийного анатоксина (антиген); или например, вакцина против гепатита В содержит в 1 мл препарата 20 мкг HBsAg.

6. Назначение препарата для: больных, контактных, бактерионосителей (лечение, профилактика: плановая, экстренная)

7. Как используется (местное или общее применение, способ введения, с предварительной постановкой пробы на чувствительность к гетерогенному белку, дробное введение)

8. На чем основано использование (создание искусственного активного/пассивного иммунитета, нейтрализация токсина, дополнительная стимуляция иммунной системы и активация факторов естественной резистентности, выявление гиперчувствительности замедленного типа, коррекция дисбиоза)

9. Признаки непригодности к употреблению (например, лечебно-профилактическая сыворотка непригодна при появлении мутности, хлопьев, трещин и сколов ампулы, АДС непригоден, если препарат был заморожен)

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ КОНТРОЛЯ ВАКЦИННЫХ И СЫВОРОТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ

1. На стерильность (в случае живых вакцин – на отсутствие контаминации посторонними микроорганизмами).

2. На безвредность. Проводится на чувствительных животных (данные о смерти или выживании животных, клинические проявления инфекции, наличие интоксикации, бактериологические показатели, изменение веса).

3. На реактогенность. Проводится на лабораторных животных или, иногда, на ограниченных контингентах людей – добровольцев (наблюдают за температурной реакцией организма, развитием воспаления на месте введения и другими показателями).

4. На специфическую активность.

А. Вакцинные препараты:

- На концентрацию микробов.
- На антигенность (способность вызывать антителообразование при введении животным).
- На иммуногенность (способностью вызывать у иммунизированных животных невосприимчивость к заражению соответствующими вирулентными микроорганизмами).

Б. Препараты из сывороток – на концентрацию антител.

5. На онкогенность. Проверке на экспериментальных животных подлежат корпускулярные вакцины.

6. Вопросы для самоконтроля

- Что такое иммунопрофилактика и иммунотерапия?
- Какие препараты используют для создания искусственного активного антимикробного иммунитета?
- По каким принципам классифицируют вакцины?
- Кто первым получил живые вакцины; что лежит в основе их изготовления?
- Какие препараты используют для создания искусственного активного антитоксического иммунитета; как их получают?
- Какие препараты используют для создания искусственного пассивного антимикробного и антитоксического иммунитета?
- С какой целью используют иммунные диагностические сыворотки, как их получают?

Практическое занятие №4

Тема: "Современные методы микробиологической диагностики инфекционных заболеваний"

Актуальность темы.

Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний является одним из приоритетных направлений развития системы здравоохранения Украины. Полученные лабораторные данные необходимы врачу для постановки окончательного диагноза заболевания и назначения рациональной антибиотико- и иммунотерапии. Врач - эпидемиолог использует результаты микробиологических и иммунологических исследований для проведения эпидемиологического анализа заболеваемости с целью установления источника инфекции, путей ее передачи, выявления бактерионосителей и других целей.

Конкретные цели

- Определить основные задачи лабораторной диагностики инфекционных заболеваний
- Ознакомиться с современными методами лабораторной диагностики инфекционных заболеваний.
- Выяснить преимущества и недостатки каждого из методов лабораторной диагностики.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию.

Термин	Определение
1	2
Специфичность метода	Возможность регистрировать минимальное количество ложноположительных результатов
Чувствительность метода	Способность выявлять максимальное количество истинно положительных образцов
Генетическая диагностика	Выявление в материале от больного или в выделенной культуре возбудителей специфического участка нуклеиновой кислоты, характерной лишь для этого микроорганизма
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	Метод выявления и идентификации вирусов и микробов в исследуемых материалах. Базируется на многочисленном копировании (селективной амплификации) исследуемой нуклеиновой кислоты ферментом ДНК - полимеразой.

Теоретические вопросы к занятию:

- Исторические этапы микробиологической диагностики
- Основные черты и тенденции развития современной микробиологии.
- Бактериоскопический метод исследования. Этапы.
- Бактериологический метод исследования. Принципы выделения чистых культур бактерий и их идентификации.

- Этапы проведения бактериологической диагностики инфекционных заболеваний.
- Основные преимущества и недостатки иммунологических методов исследования.
- Лабораторные животные. Характеристика биологического метода.
- Генетические методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, их характеристика.

Практические задания, выполняемые на занятии:

- Морфологические методы, их оценка. Изучить различные морфологические формы бактерий с использованием световой и электронной микроскопии (на демонстрационных материалах).
- Культуральные методы, их оценка. Изучить различные формы колоний (на демонстрационных материалах).
- Иммунологические методы, их оценка. Осуществить учет РА и РСК, поставленных с целью серологической диагностики.
- Генетические методы, их суть и оценка.
- Биологический метод, характеристика, преимущества и недостатки.

Содержание темы.

На практическом занятии студенты знакомятся с основными современными методами лабораторной диагностики инфекционных заболеваний.

Используя знания, приобретенные во время самостоятельной подготовки к занятию и в процессе рассмотрения темы на занятии, студенты дают оценку каждому методу лабораторной диагностики. Студенты знакомятся с такими понятиями как экспресс-диагностика, генетическая диагностика, акцентируют внимание на специфичности и чувствительности метода. Рассматривают и записывают в протокол классификацию методов лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, этапы бактериологической диагностики инфекционных заболеваний и их особенности, этапы проведения полимеразной цепной реакции и ее оценку.

Составляют протокол и подписывают его у преподавателя.

Рекомендации по оформлению протокола

В протокол следует внести:

1. Зарисовать основные морфологические формы бактерий, а также электронно-микроскопическое изображение вирусов (на демонстрационных материалах).
2. Охарактеризовать колонии, выросшие на питательных средах. Зарисовать их в протоколе.
3. Таблицу: "Методы лабораторной диагностики при инфекционных заболеваниях".
4. Таблицу "Этапы бактериологической диагностики и их особенности при инфекционных заболеваниях".

Зарисовать принципиальную схему постановки полимеразной цепной реакции.

Вопросы для самоконтроля.

- Каковы цели и задачи лабораторной диагностики инфекционных заболеваний?
- В чем заключается принципиальная разница прямых и непрямых методов лабораторной диагностики инфекционных заболеваний?
- Какие заболевания можно диагностировать с использованием только микроскопического метода?
- Каковы преимущества и недостатки бактериологического метода лабораторной диагностики инфекционных заболеваний?
- Каковы основные преимущества и недостатки биологического метода?
- С какой целью используются моноклональные антитела?
- Каковы этапы проведения полимеразной цепной реакции?

Рекомендованная литература.

Основная:

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология; М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005, 734 с.
2. Воробьев А. А., Кривошеин Ю. С., Ширококов В. П. Медицинская и санитарная микробиология: учебное пособие.— М., 2008.-462 с.
3. Ширококов В. П., Янковский Д. С., Дымент Г. С. Микробная экология человека с цветным атласом : учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений IV уровня аккредитации и врачей-интернов / В. П. Ширококов, - К. : Червона рута-Турс, 2010. – 336 с.

Дополнительная:

4. Medical microbiology / edited by Samuel Baron, MD. - 4th ed. The University of Texas Medical Branch and Galveston, 1996, 1273 p.
5. W. Levinson, E. Jawetz. Medical microbiology and immunology: examination and board review, 6th ed. The McGraw - Hill Companies, 2000, 582 p.
6. Биргер М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования; М., 1983.
7. Красильников А. П. Микробиологический словарь-справочник.- Минск, 1986.
8. Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С. Практична мікробіологія: Посібник.-Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 440 с.
9. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія: підручнтк для студентів вищ.мед.навч.закл. /Під редакцією В.П. Широкова.- Вінниця: Нова Книга, 2010. - 969 с.