

**ГОУ ВПО  
РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ (РГМУ) РОСЗДРАВА РФ**

## **ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ**

**Часть 3**

**ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫЙ  
ИММУНИТЕТ. СЕРОДИАГНОСТИКА.  
ИММУНОПРОФИЛАКТИКА  
И ИММУНОТЕРАПИЯ**

**Москва 2011**

**ГОУ ВПО  
РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ (РГМУ) РОСЗДРАВА РФ**

## **ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ**

**ЧАСТЬ 3**

**ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫЙ  
ИММУНИТЕТ. СЕРОДИАГНОСТИКА.  
ИММУНОПРОФИЛАКТИКА  
И ИММУНОТЕРАПИЯ**

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ**

**Москва 2011**

**Общая микробиология. Часть 3. Противоинфекционный иммунитет.  
Серодиагностика. Иммунопрофилактика и иммунотерапия.**

**ГОУ ВПО Российской государственный медицинский университет  
(РГМУ) Росздрава РФ, 2011 г., стр. 140**

Учебно-методическое пособие составлено в соответствии с типовой «Программой по микробиологии, вирусологии и иммунологии» для высших учебных медицинских учреждений и является 3-й частью пособия «Общая микробиология», включает разделы теоретической и практической иммунологии.

Теоретический материал представлен в краткой форме, так как параллельно с инфекционной имmunологией студенты изучают основы общей иммунологии на кафедре иммунологии.

Основное внимание уделяется практической иммунологии. Рассматриваются общепринятые серологические реакции, способы их постановки, применяемые диагностические препараты и современные иммунологические экспресс-методы диагностики. Для закрепления материала предлагаются ситуационные задачи.

На занятиях, посвященных иммунопрофилактике и иммунотерапии, изучаются принципы получения вакцин, современные вакциновые препараты и национальный профилактический календарь прививок, дается характеристика современных лечебно-профилактических сывороток и иммуноглобулинов.

В каждом практическом занятии представлены план и содержание рассматриваемых тем, приводятся методики опытов, выполняемые и учитываемые студентами, и вопросы для самоподготовки.

Основное назначение пособия – методическая помощь студентам, способствующая усвоению учебного материала и оптимизации учебного процесса на практических занятиях.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов 2-3 курсов медицинских вузов.

Составители Н.С.Горячкина, Е.Д.Радакова, Л.И.Кафарская,  
С.М.Инжеваткина, И.А.Гладько, С.С.Хромова

Под общей редакцией Л.И.Кафарской и Н.С.Горячкиной

® Коллектив авторов  
ГОУ ВПО РГМУ Росздрава РФ  
2011 г.

## **Раздел: Противоинфекционный иммунитет. Серодиагностика. Иммунопрофилактика и иммунотерапия.**

Раздел, представленный в методическом пособии, состоит из двух частей – теоретической и практической.

В теоретической части приводятся основные сведения о формировании и сущности противоинфекционного иммунитета, об антигенах и антителах, строении и функциях иммунной системы и формах иммунного ответа.

Теоретический материал по иммунологии представлен в краткой форме, учитывая, что студенты параллельно с инфекционной иммунологией изучают основы общей иммунологии на кафедре иммунологии. Рекомендуется распределить материал по четырем занятиям (№№ 13–16), на занятии №17 провести контроль.

Большое внимание уделяется практической иммунологии – изучению методов иммунологической диагностики инфекционных заболеваний, а также их специфической профилактике и терапии.

Рассматриваются общепринятые серологические реакции, способы их постановки и современные иммунологические экспресс-методы, применяемые диагностические препараты. Два занятия посвящены проблемам специфической иммунопрофилактики и иммунотерапии. Изучаются принципы получения вакцин и лечебно-профилактических сывороток; применяемые вакциновые препараты, иммунные сыворотки и иммуноглобулины.

# **ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ**

## **Изучаемые темы:**

1. Противоинфекционный иммунитет, его сущность и принципы формирования.
2. Антигены, их основные свойства. Антигены и гаптены. Бактериальные антигены.
3. Антитела. Классы иммуноглобулинов, их строение и функции.
4. Иммунная система организма. Центральные и периферические органы иммунной системы, их организация и основные функции.
5. Адаптивный иммунный ответ. Клетки иммунной системы, участвующие в иммунном ответе. Факторы, обеспечивающие межклеточную кооперацию.
6. Особенности гуморального и клеточного иммунного ответа.
7. Формы иммунного ответа: гуморальный и клеточный иммунный ответ, иммунологическая память, реакции гиперчувствительности и иммунологическая толерантность.

## **1. Противоинфекционный иммунитет, принципы формирования**

**Противоинфекционный иммунитет – приобретенный, адаптивный иммунитет, направленный на защиту организма от внедрившихся в организм генетически чужеродных болезнетворных агентов – микроорганизмов, их структур и токсинов.**

По направленности различают антибактериальный, антитоксический, антигрибковый, антивирусный, антипротозойный иммунитет, каждый из них имеет свои характерные отличия. В пособии материал рассматривается преимущественно на примере антибактериального и антитоксического иммунитета.

Адаптивный иммунитет осуществляется иммунной системой организма, представляющей собой комплекс лимфоидных органов и тканей.

**Основная функция иммунной системы – иммунологический надзор, то есть способность отличать «свое» от «чужого» и избавляться от проникших в организм генетически чужеродных агентов, называемых антигенами, в том числе и патогенных микроорганизмов.**

Эффекторными клетками иммунной системы являются Т-лимфоциты и В-лимфоциты, которые реагируют на внедрившийся патоген специфическим иммунным ответом, соответственно, клеточным или гуморальным. Иммунный ответ формируется при взаимодействии с другими клетками иммунной системы (межклеточная коопeração) и контролируется цитокинами. Существует генетический контроль иммунного ответа.

*При клеточном иммунном ответе* образуются клоны активированных Т-лимфоцитов (иммунных, сенсибилизованных, примированных), продуцирующие цитокины. Т-лимфоциты обладают специфически направленной *цитотоксичностью* по отношению к инфекционному агенту – антигену, особенно расположенному внутриклеточно. При некоторых инфекциях развивается *гиперчувствительность замедленного типа* (ГЗТ), которую индуцируют сенсибилизованные Т-лимфоциты.

*Гуморальный иммунный ответ* характеризуется появлением специфических антител – иммуноглобулинов против внедрившегося микробного агента. Антитела продуцируются плазматическими клетками, в которые преобразуются клоны активированных В-лимфоцитов. Активность антител направлена, главным образом, против внеклеточно расположенных антигенов (микроорганизмов и их токсинов), с которыми антитела специфически связываются, что в конечном итоге приводит к обезвреживанию и уничтожению патогенов.

В развитии противоинфекционного иммунитета важное значение имеют *факторы врожденной естественной резистентности* организма (видового, врожденного иммунитета), которые реагируют на проникший патоген уже в первые часы и являются первой линией защиты от инфекции. Как правило, естественные защитные факторы не способны полностью уничтожить внедрившийся возбудитель, но они существенно ограничивают его размножение и замедляют распространение по организму. Это дает время для реализации иммунного ответа более медленно реагирующей иммунной системы (вторая линия защиты), которая действует целенаправленно на конкретный инфекционный агент. Специфические антитела и иммунные Т-лимфоциты действуют совместно с естественными факторами (фагоцитоз, система комплемента, острофазные белки и др.), эффективность которых значительно повышается в присутствии антител, сенсибилизованных Т-клеток, цитокинов и других медиаторов.

После перенесенного инфекционного заболевания обычно формируется *постинфекционный иммунитет* (клеточной и/или гуморальный) благодаря образующимся в организме «клеткам иммунологической памяти» - долгоживущим Т- и В-лимфоцитам. Эти клетки распознают повторно проникший в организм возбудитель той же антигенной специфичности и быстро реагируют на него пролиферацией соответствующих клонов Т-лимфоцитов и/или выработкой специфических антител плазмоцитами. Совместное синергичное действие адаптивных и естественных защитных факторов, как правило, препятствует развитию повторной инфекции.

## **2. Антигены, их основные свойства.**

### **Антигены бактерий**

**Антигены – генетически чужеродные агенты, в том числе и микробные, которые при внедрении во внутреннюю среду макроорганизма вызывают гуморальный и клеточный иммунный ответ в виде выработки специфических антител и/или иммунных Т-лимфоцитов.**

Антигенами являются многие химические соединения, как правило, биополимеры органического происхождения, с высокой молекулярной массой, сложной и частично жесткой пространственной структурой. По химической природе это чаще всего белки, полисахариды и липополисахариды, реже комплексные вещества. Антигены могут находиться в составе вирусов, микробных и других клеток, чужеродных для организма (корпускулярные антигены) или в свободном состоянии (растворимые антигены), как, например, белковые токсины.

Антигены не являются однородной структурой, они содержат реактивные участки, называемые *антигенными детерминантами* или *эпитопами*. Таких детерминант может быть несколько, причем одинаковой или разной специфичности, поэтому антигены по составу эпитопов являются поливалентными. На каждый эпитоп определенной специфичности вырабатываются соответствующие специфические (гомологичные) антитела.

**Антигены.** К основным свойствам антигенов относят чужеродность, антигенност, иммуногенность и специфичность.

– **Чужеродность.** Вещество, не являющееся генетически чужеродным для данного организма, как правило, не может индуцировать иммунный ответ. Исключение составляют аутоантигены – свободные или входящие в состав клеток и тканей организма вещества, которые при определенных условиях воспринимаются иммунной системой как чужеродные, например ткани забарьерных органов (ткани передней камеры глаза, нервная ткань и др.), продукты поврежденных тканей (ожоговые, лучевые, холодовые антигены и др.).

– **Антигенност** – потенциальная способность молекулы антигена индуцировать иммунный ответ организма и специфически взаимодействовать с антителами и клонами эффекторных Т-лимфоцитов, которые продуцировались после введения данного антигена.

– **Иммуногенность** – потенциальная способность антигена вызывать специфический иммунный ответ определенной интенсивности, обеспечивающий защиту организма от проникновения антигенов (возбудителей). Степень иммуногенности зависит от:

- химической природы антигена, наиболее сильными антигенами являются белки и полисахариды, в то время как нуклеиновые кислоты и липиды обладают слабой иммуногенностью;
- химического состава, чем более разнообразен аминокислотный состав белка, тем выше его иммуногенность, это свойство повышается также при наличии в составе молекулы ароматических аминокислот, таких как тирозин и триптофан;
- молекуллярной массы (не менее 10 кДа);
- уровня полимерности молекулы;
- количества и плотности антигенных детерминант и т.д.

По степени иммуногенности различают «сильные» и «слабые» антигены. Для повышения иммуногенности слабых антигенов их вводят совместно с веществами – адьювантами (гидроксидом алюминия, полиоксидонием или др.).

– **Специфичность** – это способность антигена индуцировать иммунный ответ к строго определенной антигенной детерминанте (эпитопу). Специфичность антигенной молекулы определяется химическим составом и пространственным расположением составляющих его эпитопов, имеющих олигосахаридную или пептидную природу. Антигенная детерминанта представляет собой минимальный участок

молекулы антигена, вызывающий иммунный ответ и определяющий его специфичность. Даже незначительное изменение структуры эпитопа, в частности замена единичной аминокислоты или изменение конформации белковой молекулы, меняет антигennую специфичность.

**Гаптены.** Кроме антигенов с полноценными свойствами, существуют гаптены. Их называют «неполноценные антигены». В свободном виде гаптены не обладают иммуногенностью, следовательно, не индуцируют иммунный ответ организма, но способны связываться с уже имеющимися гомологичными антителами. Гаптены – низкомолекулярные вещества, их можно превратить в полноценный антиген, соединив гаптены с высокомолекулярными носителями (белками). Такой коньюгат способен вызывать иммунный ответ с образованием специфических антител как против гаптена, так и белка-носителя.

К гаптенам также относятся различные природные соединения, некоторые лекарственные препараты, антибиотики, витамины, стероидные гормоны и др.

### **Антигены бактериальных клеток**

Возбудители инфекционных заболеваний содержат множество антигенных детерминант, связанных как с их клеточными структурами, так и с секреируемыми клетками веществами. Наиболее детально изучены бактериальные антигены, количество которых может достигать нескольких десятков. Наибольшее значение имеют антигенные детерминанты поверхностных структур бактериальной клетки. Существуют также цитоплазматические и мембранные антигены и выделяемые в окружающую среду антигены белковых токсинов и ферментов патогенности. В зависимости от локализации различают следующие группы антигенов:

**Капсульные, или К-антигены.** Они связаны с капсулами или микрокапсулами бактерий, могут иметь полисахаридную, белковую, полипептидную, реже комплексную природу, относятся к факторам патогенности. В эту группу входит и Vi-антиген – поверхностный полисахаридный антиген микрокапсул некоторых сальмонелл (*S.typhi*) и некоторых эшерихий.

**Жгутиковые, или Н-антигены.** Их антигенные свойства связаны с белком жгутиков – флагеллином. Н-антигены термолабильны, они являются сильными антигенами, им свойственна вариабельность.

К группе белковых поверхностных антигенов относят и антигены ворсинок, представляющие собой белок пилин.

**Соматические, или O-антигены.** Это антигены клеточной стенки грамотрицательных бактерий, представляющие собой липополисахарид (ЛПС). О-антигены термостабильны, обладают выраженной иммуногенностью и токсичностью, являются эндотоксином бактерий.

Как правило, О-антигены разных грамотрицательных бактерий построены по единому плану и состоят из 3-х частей: это липид А, являющийся эндотоксином, сердцевина (единая у большинства грамотрицательных бактерий) и О-специфический полисахарид, состоящий из 3-6 повторяющихся олигосахаридных остатков. О-антиген сохраняет свою специфичность после обработки спиртом и формалином.

К-антигены, Н-антигены и О-антигены многих бактерий обладают внутривидовой антигенной вариабельностью, вследствие которой бактериальный вид подразделяется на серологические варианты – серовары (серотипы). На основании этих различий созданы серологические классификации для некоторых родов, например для сальмонелл (по антигенному строению О- и Н-антигенов), эшерихий (в зависимости от строения К-, Н- и О-антигенов) и др.

У грамположительных бактерий антигенная специфичность клеточных стенок связана с тейхоевыми и липотейхоевыми кислотами, пронизывающими многослойный пептидогликан. Сам пептидогликан выполняет функцию адьюванта.

**Цитоплазматические антигены.** К ним относят находящиеся в цитоплазме белки и нуклеопротеиды.

**Внеклеточные антигены.** Ими являются полностью или частично секрециируемые белковые токсины (дифтерийный, столбнячный, О-стрептолизин и др.), на которые вырабатываются нейтрализующие их антитела – антитоксины.

Антигенными свойствами обладают также некоторые ферменты патогенности.

В зависимости от *степени специфичности* различают групповые, видовые и типовые микробные антигены:

- Групповыми называют антигены, общие для рода (родоспецифические) или для нескольких родов микроорганизмов (межродовые).
- Видовые антигены – общие для всего вида и не встречающиеся у других видов.

- Типовые (серовariantные) антигены характерны для неоднородных по антигенным свойствам видов, по которым их подразделяют на серовары (серотипы) внутри вида.

Особую группу составляют **протективные (защитные) антигены** – антигены ряда видов бактерий и вирусов, индуцирующие при их внедрении в организм развитие эффективного адаптивного иммунитета к возбудителю, содержащему такой антиген. Протективный антиген – это совокупность антигенных детерминант, которые вызывают наиболее выраженный специфический иммунный ответ. Свойствами протективных антигенов обладают экзотоксины бактерий, гликопротеины сложных вирусов и др. Одновременно протективные антигены являются важными, часто доминирующими факторами патогенности. Их специфическое обезвреживание в результате иммунного ответа способствует прекращению инфекционного процесса, при этом формируется стойкий адаптивный постинфекционный иммунитет.

**Суперантигены.** Некоторые микроорганизмы продуцируют особые вещества, которые получили название *суперантигенов*. Они способны связываться с различными клонами Т-лимфоцитов и с антигенпрезентирующими клетками (без процессинга антигенов), минуя их реактивные (антигенсвязывающие и антигенраспознающие) центры. Такое неспецифическое связывание препятствует распознаванию и формированию специфического иммунного ответа, вместо чего происходит поликлональная активация множества Т-лимфоцитов. Они, в свою очередь, секрецируют избыточное количество цитокинов, что вызывает синдром общей интоксикации организма. Далее активированные Т-лимфоциты погибают путем апоптоза (запограммированная гибель клеток), что приводит к резкому снижению количества Т-лимфоцитов и к развитию иммунодефицита или аутоиммунных реакций.

Суперантигенами для Т-лимфоцитов являются энтеротоксины и эксфолиатины стафилококков, экзотоксин синдрома токсического шока стафилококков, эритрогенный токсин стрептококков, антигены микоплазм.

### **3. Антитела. Классы иммуноглобулинов, их строение и функции**

**Антитела – это особый вид белков (гликопротеинов), которые вырабатываются в ответ на введение антигенов и обладают способностью специфически взаимодействовать с гомологичным антигеном (эпигеном), индуцировавшим их образование.**

Антитела (иммуноглобулины) produцируются при гуморальном иммунном ответе активными клонами В-лимфоцитов на конечной стадии дифференциации – плазматическими клетками.

Иммуноглобулины находятся в свободном и связанном состоянии. В свободном виде их выявляют в сыворотке крови, где на их долю приходится около одной трети всех белков, и в других жидкостях и тканях организма (тканевой жидкости, лимфе, желчи, слезной жидкости, грудном молоке, секретах слизистых оболочек желудочно-кишечного, респираторного и уро-генитального трактов). В связанном состоянии они являются мембранными антигенраспознающими рецепторами В-лимфоцитов (mIg).

В зависимости от строения входящих в состав антител тяжелых полипептидных цепей различают пять классов иммуноглобулинов – IgM, IgG, IgA, IgD и IgE, некоторые из них дополнительно подразделяют на подклассы. Иммуноглобулины, принадлежащие к различным классам, отличаются по ряду свойств и функций. В антиинфекционном иммунитете ведущую роль играют IgM, IgG и IgA.

Иммуноглобулины разных классов построены по единому принципу. Общей структурной единицей является *мономер* – комплекс из четырех полипептидных цепей, состоящий из двух идентичных легких L-цепей (англ. light) и двух идентичных тяжелых H-цепей (heavy), соединенных межцепочечными и внутрицепочечными дисульфидными связями (рис. 1).

**Строение легких и тяжелых цепей Ig.** Различают два типа легких цепей  $\lambda$  (лямбда) и  $\kappa$ (каппа) и пять типов тяжелых цепей –  $\alpha$ (альфа),  $\mu$  (мю),  $\gamma$ (гамма),  $\Delta$  (дельта) и  $\epsilon$  (эпсилон). Н-цепи определяют класс иммуноглобулинов (A, M, G, D, E).

Тяжелые и легкие цепи в зависимости от расположения в них аминокислот делят на две области. С-константная область имеет постоянный порядок расположения аминокислот, V-вариабельная область отличается многообразием их расположения. Кроме того,

цепи иммуноглобулинов образуют глобулярные участки-домены, соединенные между собой. Легкие цепи состоят из двух доменов – вариабельного ( $V_L$ ) и константного ( $C_L$ ). Тяжелые цепи содержат 3-4 домена: один вариабельный –  $V_H$ -домен, остальные константные с постоянным составом аминокислот ( $C_H 1$ ,  $C_H 2$  и т.д.).

**Строение и функции Fab- и Fc-фрагментов.** Молекула мономера имеет один раздвоенный конец, содержащий два идентичных Fab-фрагмента (fragment antigen binding), третий фрагмент обозначают как Fc (fragment cristallizable). На эти три фрагмента мономер распадается под действием протеолитического фермента папаина. Область соединения трех фрагментов называется шарнирной, она делает молекулу мономера гибкой (особенно у IgG) и создает лучшие условия связывания с гомологичным эпитопом.

**Fab-фрагмент** включает всю легкую цепь ( $V_L$ - и  $C_L$ -домены) и часть тяжелой цепи ( $V_H$ - и  $C_H 1$ -домены). Вариабельные  $V_L$  и  $V_H$ -домены расположены на конце Fab-фрагмента друг против друга и образуют впадину - *антигенсвязывающий активный центр*. Конфигурация активного центра (паратопа), обладающего гипервариабельными участками, комплементарна антигенному детерминанте (эпитопу), индуцировавшей образование данного иммуноглобулина, что обеспечивает *специфичность их связывания*.

Количество активных центров определяет *валентность молекулы антитела*. Молекула мономера имеет два активных центра, способных специфически взаимодействовать с двумя гомологичными эпитопами, то есть, все мономеры двухвалентны. Валентность полимеров зависит от количества входящих в их молекулу мономеров.

Другой конец мономера - **Fc-фрагмент** - состоит из двух остатков расположенных параллельно Н-цепей, включающих константные домены  $C_H 2$  и  $C_H 3$  (молекулы IgM и IgA содержат дополнительно  $C_H 4$ -домен). Fc-фрагмент обладает вторичными функциями, в том числе способен присоединять комплемент, фиксироваться на макрофагах, нейтрофилах и NK-клетках.

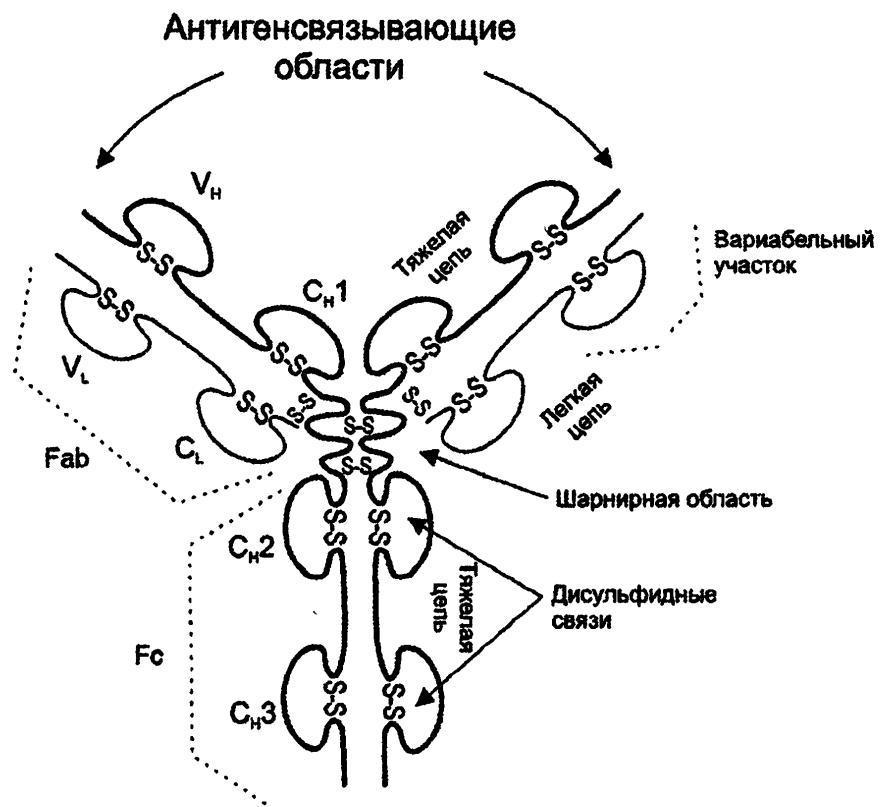
### **Строение молекул отдельных классов иммуноглобулинов**

**Молекулы IgG** представляют собой мономер. Этот класс антител содержится в организме в наибольшей концентрации, на его долю приходится около 75% иммуноглобулинов. При первичном иммунном

ответе IgG синтезируются позже IgM, но сохраняются дольше. При вторичном иммунном ответе IgG появляются быстро и накапливаются в высоком титре. Связываясь с соответствующими антигенами, IgG обезвреживают их. Они активно нейтрализуют внеклеточно расположенные вирусы и бактериальные токсины. В качестве опсонина, совместно с комплементом, IgG способствуют лизису или гибели многих микроорганизмов, находящихся вне клеток, а также участвуют в фагоцитарной реакции. Это единственный класс антител, который проникает через плаценту и обеспечивает иммунологическую защиту плода. IgG – основа постинфекционного и поствакцинального иммунитета. (Рисунок 1).

Рис. 1

### *Строение молекулы иммуноглобулина G(IgG) и ее фрагментов.*



$V_H$  - вариабельные области тяжелых цепей;  $V_L$  - вариабельные области легких цепей;  $C_{H1}-C_{H3}$  - константные области тяжелых цепей;  $C_L$  - константные области легких цепей; H - тяжелая цепь; L - легкая цепь.

**Молекула IgM** – пентамер и состоит из пяти мономеров, расположенных радиально и примыкающих С-концами к центральному J-соединительному белку, который, совместно с дисульфидными связями, объединяет их в единую структуру. Теоретически IgM должны быть десятивалентными, практически у них максимально активны только пять активных центров (паратопов). IgM при первичном иммунном

ответе появляются раньше других и составляют 6-10% от общего количества Ig в крови, к концу болезни практически исчезают. Они защищают организм от внеклеточных микроорганизмов, участвуют в активации комплемента по классическому пути, в виде мономеров находятся на поверхности клонов В-клеток (мембранный IgM, антиген-распознающий рецептор), придавая им ту или иную специфичность.

*Молекула IgA* обычно представляет собой димер и имеет 4 валентности, иногда имеет мономерную структуру. IgA составляет 7-15% всех Ig. Иммуноглобулины класса A находятся в сыворотке и биологических секретах – секреторные (sIgA). Молекула sIgA имеет строение димера, содержит соединительную J-цепь и секреторный компонент, который защищает IgA от разрушения ферментами. sIgA находится на поверхности всех слизистых оболочек и в выделяемых ими секретах (в слюне, слезах, молозиве и грудном молоке и др.). Они препятствуют адгезии и колонизации возбудителей (фактор местного иммунитета).

*Молекула IgD* – мономер, двухвалентна. Содержание IgD в сыворотке крови составляет около 0,2% всех антител. Эти антитела участвует в гуморальном иммунном ответе, являясь рецепторами В-лимфоцитов и контролируют их активацию и супрессию.

*Молекула IgE* имеет строение мономера. Содержание IgE в сыворотке крови составляет 0,001%. Этот класс антител участвует в развитии аллергических реакций, проявляет противопаразитарную (антигельминтную) активность.

## **Аффинность и авидность антител**

Аффинность и авидность характеризуют эффективность (силу) связывания антигена и антитела, обусловленную степенью гомологичности (комплémentарности) их реактивных центров.

**Аффинность** – это степень комплексарности (сродства) отдельной антигенной детерминанты (эпитопа) с антигенсвязывающим центром молекулы иммуноглобулина. Прочность и длительность связывания с образованием комплекса {антиген-антитело}, то есть иммунного комплекса, зависит от степени пространственного соответствия эпитопа и гипервариабельного активного центра антитела. Чем более выражена их комплексарность, тем прочнее и длительнее эта связь. При менее выраженному сродстве эпитопа и активного центра Ig, иммунный комплекс быстро распадается.

**Авидность** характеризует прочность связывания всех эпитопов антигена с молекулой антитела. Авидность зависит от свойств антигена (имеет значение количество эпитопов и их доступность для связывания), валентности антител (наибольшая у IgM), условий взаимодействия между антигеном и антителом (оптимальные – внутренняя среда организма).

Авидность характеризует силу связывания и количество связавшегося антигена определенным классом антител сыворотки крови, то есть определяет степень ее защитного действия против конкретного антигена.

### **Биологические функции антител**

Антитела – это бифункциональные молекулы иммуноглобулинов, имеющие вариабельные области для специфического взаимодействия с комплементарными антигенами, и Fc-фрагмент, способный связываться с рецепторами, присутствующими на мембранах многих клеток. Биологические функции антител многообразны. (Рисунок 2). Антитела обладают способностью:

- нейтрализовать бактериальные токсины и вирусы, образуя растворимые и нерастворимые комплексы с антигенами;
- осуществлять опсонизацию фагоцитирующих клеток, повышая эффективность фагоцитоза;
- активировать комплемент по классическому пути и участвовать в лизисе бактерий и других корпускулярных структур.

Антитела определяют гуморальный постинфекционный антибактериальный, антитоксический и антивирусный иммунитет. Их роль в антибактериальной защите заключается в:

- прямом повреждении бактериальных клеток с участием комплемента;
- повышении эффективности фагоцитоза бактерий путем опсонизации;
- нейтрализации бактериальных белковых токсинов.

Противовирусный иммунитет включает две формы участия антител:

- непосредственное действие на свободные вирусные частицы как на любые внеклеточные антигены;
- участие в элиминации клеток, инфицированных вирусами.

Рис. 2

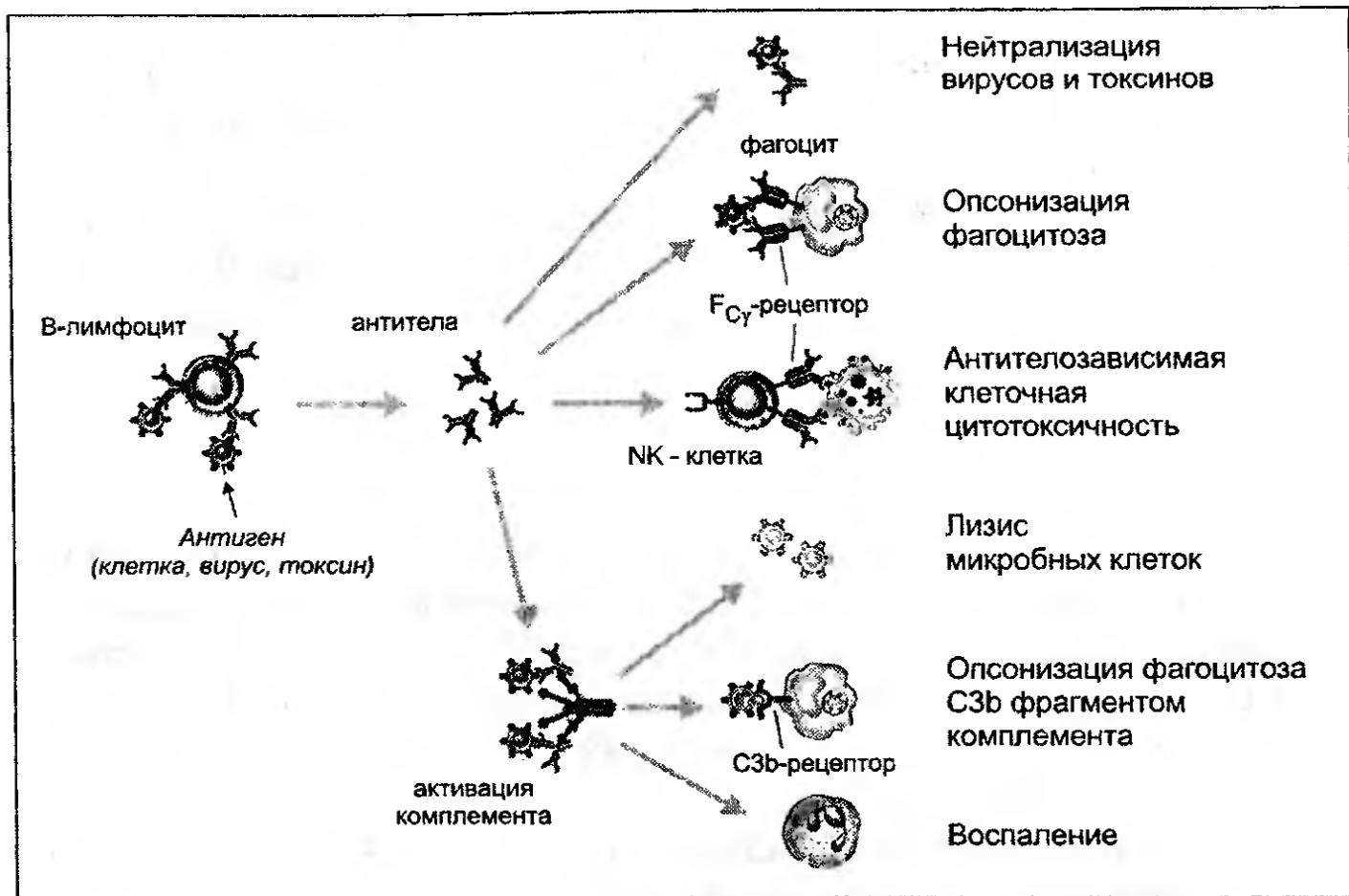
**Биологические функции антител****Задание:** Заполнить таблицу 1 «Свойства иммуноглобулинов»

Таблица 1

**Свойства иммуноглобулинов**

Свойства	Класс IgM	Класс IgG	Класс IgA
1. Уровень в крови, г/л			
2. Период полувыведения из крови, дни			
3. Молекулярная масса			
4. Коэффициент седimentации			
5. Молекулярная структура (нарисовать схему строения)			
6. Валентность			
7. Функциональные особенности			

## **4. Иммунная система, ее центральные и периферические органы**

**Иммунная система** – это система лимфоидных органов, тканей и клеток, расположенных по всему организму, в которой происходит созревание лимфоидных клеток и развитие иммунного ответа. Иммунная система сформировалась в процессе эволюции для защиты макроорганизма от патогенных микроорганизмов и других антигенов.

Различают центральные (первичные) органы иммунной системы – костный мозг и тимус, в которых происходит созревание лимфоидных клеток (Т-и В-лимфоцитов) и клеток миелоидного ряда, и периферические (вторичные) лимфоидные органы и ткани (селезенка, лимфоузлы и лимфоидные структуры, ассоциированные с кожей и слизистыми оболочками, где, собственно, и формируется иммунный ответ).

**Костный мозг.** У взрослых людей он находится в эпифизах длинных трубчатых костей и в плоских костях, у детей – в полостях всех костей. Этот, так называемый красный мозг (в отличие от желтого, содержащего жировые клетки), продуцирует полипотентные стволовые клетки, из которых после созревания образуются тромбоциты и эритроциты, клетки миелоидного ряда (моноциты, макрофаги, все гранулоциты, тучные клетки и большинство дендритных клеток). В костном мозге образуются и клетки лимфоидного ряда – NK-лимфоциты, В-лимфоциты, а также ранние предшественники Т-лимфоцитов, дальнейшее созревание которых происходит в тимусе.

В-клетки продолжают созревать в строме красного костного мозга, проходят ряд этапов и строгую селекцию. Через апоптоз уничтожаются все аутореактивные клетки В-лимфоцитов, имеющие рецепторы к тканям собственного организма и не способные распознавать МНС II класса. Выжившие 1-5% полноценных клеток не реагируют на аутоантигены и способны распознавать МНС II класса в комплексе с антигеном.

Все В-клетки представляют собой совокупность множества клонов. Причем, клетки каждого клона несут на своей поверхности специфические антигенраспознающие рецепторы только к одному антигенному эпитопу, что позволяет им распознавать любой внедрившийся в организм антиген, в том числе и антигены инфекционной природы.

Созревшие В-клетки покидают костный мозг и мигрируют в периферическую лимфоидную систему. Однако, до контакта с антигеном, В-клетки остаются функционально неактивными и их называют наивными (неиммунными) В-лимфоцитами.

**Тимус.** Это лимфоидный орган, в котором поступившие из костного мозга пре-Т-лимфоциты (пре-тимоциты) проходят процесс созревания и дифференцировки. На стадии незрелых тимоцитов клетки подвергаются селекции. Сначала отбираются тимоциты, способные взаимодействовать с молекулами МНС I или II классов (положительная селекция), остальные уничтожаются посредством апоптоза. При дальнейшем созревании происходит отрицательная селекция – элиминируются Т-клетки, реагирующие с антигенами собственных тканей (автоантигенами). В результате селекции погибают более 95% дефектных тимоцитов и остаются только полноценные клетки. Из них формируются две субпопуляции Т-лимфоцитов: одни Т-клетки несут на своей поверхности маркер CD4 и способны распознавать презентируемый антиген в комплексе с МНС II класса, другие – содержат маркер CD8, с помощью которого эти Т-клетки распознают соответствующий антиген в комплексе с МНС I класса.

На поздней стадии созревания наивные Т-лимфоциты (CD8- и CD4-Т-клетки) поступают из тимуса в кровь, лимфу, а затем локализуются в периферической лимфоидной системе.

**Периферические лимфоидные органы и ткани.** К ним относятся лимфоидные органы – селезенка и лимфатические узлы, а также лимфоидные фолликулы и диффузные скопления лимфоидных клеток. Различают лимфоидную ткань, ассоцииированную с кожей – Skin-associated lymphoid tissue (SALT), состоящую преимущественно из диффузных скоплений клеток в коже и лимфоидную ткань, ассоцииированную со слизистыми (мукозными) оболочками желудочно-кишечного, респираторного и мочеполового трактов (MALT). Например, на протяжении ЖКТ располагаются лимфоидное глоточное кольцо Пирогова, пейеровы бляшки и солитарные фолликулы, лимфоидная ткань аппендикса; лимфоциты находятся также между клетками эпителия слизистых оболочек.

Лимфоидные образования кожи и слизистых оболочек выполняют барьерную функцию и взаимодействуют с проникшими извне патогенами и другими чужеродными агентами. Селезенка и лимфатические узлы, соответственно, фильтруют кровь и лимфу (биологическое сито)

и, задерживая возбудителей и собственные отжившие (апоптозные) клетки, тем самым поддерживают постоянство внутренней среды организма. В селезенку, лимфоузлы и другие лимфоидные ткани постоянно мигрируют рециркулирующие Т- и В-лимфоциты, где они располагаются преимущественно в Т- и В-зависимых зонах, реже диффузно. Здесь же находятся и другие, участвующие в иммунном ответе, клетки.

Многие исследователи к вторичной иммунной системе относят также печень, кровь и лимфу. Печень содержит большое количество тканевых макрофагов и естественных киллеров (NK-лимфоцитов), в ней уничтожаются поступающие иммунные комплексы, отжившие эритроциты, на которых нередко сорбированы возбудители. В крови и лимфе постоянно циркулируют лимфоциты и другие клетки иммунной системы.

Все периферические органы и ткани контролируются центральной иммунной системой и связаны в единую функциональную систему кровеносными и лимфатическими сосудами, по которым происходит рециркуляция наивных Т- и В-лимфоцитов. Эти клетки непрерывно перемещаются из места первичной локализации в конкретном лимфоидном органе или ткани в лимфатическое и кровяное русло и затем возвращаются в ту же ткань. Первичная локализация Т- и В-клеток и их возвращение (хоминг) осуществляется благодаря находящимся на поверхности лимфоцитов рецепторам (homing, от англ. home – дом).

Рециркуляция продолжается до контакта наивных Т- и В-лимфоцитов с антигеном соответствующей специфичности, или до естественной гибели этих клеток.

## 5. Адаптивный иммунитет.

Адаптивный иммунитет формируется в лимфоидной ткани при участии антигеннпрезентирующих клеток, Т- и В-лимфоцитов и других клеток иммунной системы (лимфоидного и миелоидного ряда). Межклеточные контакты (кооперация) и регуляция процесса осуществляется поверхностными рецепторами клеток и цитокинами.

Иммунный ответ как реакция на встречу с антигеном, в том числе и микробной природы, начинается с поглощения антигена *антигеннпрезентирующими клеткам* - это дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты. Все они способны фагоцитировать антигены и рас-

щеплять их в фагосомах до небольших пептидов, состоящих из 10-20 аминокислотных остатков, осуществляя так называемый процессинг. Переработанные (процессированные) антиген-пептиды образуют комплекс с МНС II или I классов (их молекулы имеют углубления для антигена) и выставляются на поверхность антигенпрезентирующих клеток, где их распознают соответствующие клоны Т- и В-лимфоцитов с помощью своих антигенраспознающих рецепторов и при этом активируются – становятся иммунными.

Развитие иммунного ответа происходит в фолликулах лимфоидных органов и тканей, где находятся главные участники иммунного ответа: Т- и В-лимфоциты, антигенпрезентирующие клетки, а также вспомогательные участники – моноциты (макрофаги), гранулоциты, НК-клетки, тучные клетки и др.

Для формирования иммунного ответа, как правило, необходимы контакты между различными типами клеток-участников – «межклеточная коопeração», - осуществляемая путем лиганд-рецепторного взаимодействия при участии антигенраспознающих CD- и других поверхностных рецепторов клеток. Секретируемые клетками иммунной системы цитокины, посылая межклеточные сигналы, контролируют все стадии иммунного ответа: распознавание антигена, активацию клонов Т- и В-лимфоцитов, их пролиферацию (размножение) и дифференцировку.

**CD-антигенные маркеры.** На поверхности лимфоцитов и других типов клеток присутствуют маркерные антигены, указывающие на функциональные свойства данной клеточной популяции/субпопуляции или на определенную стадию клеточной дифференцировки. Эти молекулы получили название кластеров дифференцировки (Cluster of Differentiation) или CD-антигенные маркеры. Это гликопротеины, многие из которых относятся к суперсемейству иммуноглобулинов. Присутствие на клетках определенных CD-маркеров позволяет дифференцировать различные популяции и группы клеток. Для этой цели используют реакции со специфическими моноклональными антителами. Например, CD3-маркер встречается только на поверхности Т-лимфоцитов. Маркер CD4 характерен для субпопуляции Т-хелперов, а CD8-антigen – для субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов. Для В-лимфоцитов наиболее характерны CD19, 20, 21, 22 и т.п. Многие CD-молекулы являются антигенами и обеспечивают межклеточные контакты. Например, пары CD40 – CD40L (лиганд),

CD80/86 – CD28L образуют синапс между антигенпрезентирующими В-лимфоцитами и Т-хелперами. Большое количество CD-антител служат цитокиновыми рецепторами, воспринимают и передают межклеточные сигналы от цитокинов. Имеются CD-антителы – активаторы и костимуляторы иммунного ответа, а также запускающие механизм апоптоза (CD95).

**Цитокины.** Цитокины – белки, медиаторы воспалительного и иммунного ответа. Их секретируют клетки, участвующие в иммунном ответе – Т-лимфоциты, мононуклеарные фагоциты, дендритные клетки и другие группы клеток. Цитокины обладают следующими свойствами:

- действуют локально в тканях, обеспечивая местное и дистанционное взаимодействие и регуляцию всех стадий иммунного ответа;
- могут действовать непосредственно на клетки-продуценты (аутокринно), на окружающие клетки (параокринно), а также на отдаленно расположенные клетки (эндокринное или системное действие);
- их можно разделить на функциональные категории: медиаторы и регуляторы врожденного и адаптивного иммунитета, стимуляторы гемопоэза;
- действуют по принципу каскада или «сети» (network): в ответ на цитокиновый сигнал клетки синтезируют другие цитокины, которые воздействуют на следующие клетки и так далее;
- их синтез активированной клеткой – непродолжительный, так как матричная РНК цитокинов (мРНК) – коротковивущая.

Цитокины – это гетерогенная группа растворимых, биологически активных белков и полипептидов, которые отличаются по структуре и функциям. Различают следующие подгруппы (семейства) цитокинов: интерлейкины, интерфероны, фактор некроза опухоли, колониестимулирующие факторы, трансформирующий фактор роста, хемокины. Такое разделение довольно условно, так как цитокины, отнесенные к разным подгруппам, нередко выполняют аналогичные функции. Для контроля за противоинфекционным иммунитетом определяют уровень провоспалительных (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО) и противовоспалительных (регуляторных) цитокинов (ИЛ-10, трансформирующий фактор роста ТФР-бета).

*Интерлейкины (ИЛ)* – цитокины, синтезируемые лейкоцитами, обеспечивают межклеточное взаимодействие между лейкоцитами, активацию и коммуникации Т- и В-лимфоцитов в процессе иммунного ответа. Количество интерлейкинов велико, их обозначают цифрами, например ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и др.

*Интерфероны (ИФН)* – гликопroteины, подразделяемые на два типа. К первому типу относят α- и β-ИФН, обладающие преимущественно противовирусной активностью, их продуцируют фагоцитарные клетки. Ко второму типу – γ-ИФН (иммунный ИФН), продуцируемый Т-клетками в процессе иммунного ответа, в регуляции которого γ-ИФН принимает разностороннее участие.

*Фактор некроза опухолей (ФНО или TNF - tumor necrosis factor).* Вызывает геморрагический некроз некоторых опухолей, септический шок, кахексию и другие реакции. Участвует в иммунной защите организма, индуцирует синтез ИЛ-1, ИЛ-6 и белков острой фазы.

*Колониестимулирующие факторы* – полипептиды, регулирующие созревание стволовых клеток в костном мозге, стимулируют активность нейтрофилов и эозинофилов. Усиливают продукцию ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО макрофагами.

*Трансформирующий фактор роста β (ТФР-β)* – полипептидный, обладающий полифункциональными свойствами фактор, который регулирует митогенную активность и дифференциацию многих клеток, экспрессирует адгезивность и программирует апоптоз клеток. Обладает противовоспалительной активностью.

*Хемокины* – низкомолекулярные цитокины, ответственные за хемотаксис лейкоцитов в воспалительный очаг (хемоаттрактанты). Способны повышать активность макрофагов, Т-лимфоцитов, повышать дегрануляцию клеток.

## **Т- и В-лимфоциты**

Т- и В-клетки относятся к малым лимфоцитам, имеют сферическую форму и размеры 7-9 мкм. Они содержат крупное ядро округлой или бобовидной формы, которое окружено узкой каймой цитоплазмы. При иммерсионной микроскопии Т- и В-лимфоциты практически неразличимы, при электронноскопии у В-клеток обнаруживаются ворсинки, у Т-клеток они слабо выражены.

Наивные (неактивированные) Т- и В-лимфоциты малоактивны, они не делятся и не продуцируют цитокины. Продолжительность жизни наивных В-лимфоцитов несколько недель или месяцев. Т-лимфоциты сохраняют жизнеспособность от нескольких недель и месяцев до нескольких лет. Активированные после встречи с антигеном Т- и В-клетки живут около недели и, выполнив свои предназначения, подвергаются апоптозу.

Различают Т- и В-лимфоциты по строению поверхностных структур – различных рецепторов и антигенов, количество и разнообразие которых значительно увеличивается у активированных лимфоцитов. Кроме того, активированные Т- и В-клетки продуцируют множество различных цитокинов. Но главным отличием являются функциональные особенности и, прежде всего, форма иммунного ответа – клеточного или гуморального.

**В-лимфоциты** имеют следующие характерные особенности:

- участвуют в иммунном ответе гуморального типа – вырабатывают антитела (иммуноглобулины), обычно при условии межклеточной кооперации с Т-клетками;
- на их поверхности присутствуют молекулы МНС I и II классов;
- способны выполнять функцию антигенпрезентирующих клеток;
- на их поверхности присутствует главный антигенраспознающий В-клеточный receptor BCR (B-cell receptor): это мономерный mIgM (мембранный IgM). BCR каждого клона В-лимфоцитов способен распознавать с помощью вариабельного домена единственный эпитоп соответствующей антигенной специфичности (в составе молекулы МНС II класса) из всех поступивших в организм антигенов.
- их маркерами являются CD19, CD20, CD21, CD22, выявляемые с помощью моноклональных антител.

**Т-лимфоциты** имеют следующие характеристики:

- участвуют в иммунном ответе клеточного типа (CD4 Т-хелперы, CD8 цитотоксические лимфоциты);
- Т-хелперы (Th-субпопуляция) участвуют в межклеточной кооперации и способствуют дифференцировке В-клеток в антителосинтезирующие плазматические клетки с последующей продукцией антител;

- на их поверхности присутствует антигенраспознающий Т-клеточный рецептор TCR (T-cell receptor) - гетерополимер, состоящий из двух разных полипептидных цепей и CD3-маркера, по которому идентифицируют все Т-лимфоциты. Вариабельный домен TCR способен распознавать эпигенотип соответствующей антигенной специфичности.
- на поверхности активированных Т-лимфоцитов присутствуют CD-рецепторы, которые позволяют идентифицировать разные субпопуляции Т-клеток: CD4-маркер - Т-хелперы (Th1 и Th2), CD8-маркер – цитотоксические Т-лимфоциты.

Th1- и Th2-клетки с маркером CD4 производят цитокины: Th1-цитокины участвуют преимущественно в реакциях клеточного иммунитета (ИЛ-2,  $\gamma$ -ИФР), Th2-цитокины участвуют в реакциях гуморального иммунитета (ИЛ4, ИЛ5). Цитокины Th1- и Th2-клеток действуют как антагонисты.

### **Антигенпрезентирующие клетки (АПК)**

К ним относятся дендритные клетки и макрофаги, В-лимфоциты также способны выполнять антигенпрезентирующую функцию. Дендритные клетки в В-лимфоциты процессыируют (представляют) главным образом растворимые антигены и вирусы, макрофаги – фагоцитируемые корпскулярные антигены (бактериальные и др.).

**Дендритные клетки.** Эти клетки (DC - dendritic cells) рассматривают как основные антигенпрезентирующие клетки. Дендритные клетки имеют характерные отростки, с помощью которых они дистанционно осуществляют захват (эндоцитоз) антигена.

Известны миелоидные (DC1) и плазматоидные (DC2) клетки, имеющие костномозговое происхождение и фолликулярные FDC-клетки, которые образуются и постоянно присутствуют в фолликулах вторичных лимфоидных органов и тканей.

Миелоидные DC1-клетки происходят из миелоидной ткани, локализация – эпидермис, слизистые оболочки, тимус и Т-клеточные зоны вторичных лимфоидных органов и тканей. Продукция цитокинов: ИЛ-8 и ИЛ-12.

Плазматоидные DC: происхождение клеток-предшественников – лимфоидная ткань костного мозга. Локализация ограничена

Т-клеточными зонами вторичных лимфоидных органов и тканей. Производство цитокинов: главным образом интерфероны 1 типа.

По функциональной активности различают два типа дендритных клеток:

- 1) DC-клетки (DC-1 и DC-2), несущие на своей поверхности МНС II и I класса. DC-клетки процессыруют и презентируют Т-клеткам антигены (чужеродные белки).
- 2) Фолликулярные FDC-клетки, у которых отсутствуют МНС II класса. Эти клетки пассивно презентируют В-лимфоцитам антигены в форме иммунных комплексов (без захвата и процессинга антигена).

Таким образом, формирование иммунного ответа происходит в периферических лимфоидных органах и тканях. Его основные участники – антигенпрезентирующие клетки (дендритные, макрофаги и В-клетки) и клетки – эффекторы (активированные Т- и В-лимфоциты). Иммунный ответ, как правило, осуществляется путем межклеточной кооперации – взаимодействия различных типов клеток. Межклеточные контакты происходят с помощью адгезинов при участии цитокинов. Антигенпрезентирующие клетки экспрессируют костимуляторы, выполняющие роль второго сигнала, необходимого для активации Т-лимфоцитов (костимулятор B7) и В-лимфоцитов (лиганд CD40).

Различают несколько стадий иммунного ответа: *распознавание антигена, активация, пролиферация и дифференцировка Т- и В-клеток*. В зависимости от характера антигена (внутриклеточный или внеклеточный) развивается иммунный ответ преимущественно клеточного или гуморального типа.

При многих инфекционных заболеваниях возбудители сначала могут находиться внеклеточно, затем проникают в клетки, далее могут выходить из разрушенных ими клеток и поступать во внеклеточное пространство. Такие «волны» (внедрение в клетки, их разрушение в выход патогена) могут повторяться неоднократно. В этих случаях обычно формируются оба типа иммунного ответа – гуморальный и клеточный, но доминирует более эффективный для организма.

## **6. Особенности гуморального и клеточного иммунного ответа.**

### **Гуморальный иммунный ответ**

В основе гуморального типа иммунного ответа лежит продукция антител (иммуноглобулинов) активированными В-лимфоцитами при условии межклеточной кооперации Т- и В-лимфоцитов. Происходит пролиферация и дифференцировка В-клеток в антителопродуцирующие клетки (конечная стадия дифференцировки – плазматические клетки).

В том случае, если В-лимфоциты выполняют антигенпрезентирующую функцию, они способны воспринимать антиген непосредственно, чаще всего в форме иммунных комплексов {антigen-антитело}, расположенных на поверхности фолликулярных дендритных клеток (FDC), процессировать антиген до пептидов с последующим образованием комплекса «пептид – МНС-II класса». Затем на поверхности В-лимфоцитов происходит презентация этого комплекса Т-лимфоцитам.

Процесс распознавания антигена осуществляют Th2-хелперы, несущие TCR и маркер CD4. Между В-клетками и Th2-хелперами образуется комплекс CD40-CD40L, секретируемые цитокины передают сигналы, активирующие и вызывающие пролиферацию соответствующего клона В-клеток и их дифференцировку в продуценты антител.

При первичном иммунном ответе первыми образуются иммуноглобулины класса M (IgM). Далее происходит переключение на продукцию IgG, IgA, IgE и IgD той же специфичности, что регулируется Th2-цитокинами (ИЛ-4, ИЛ-5).

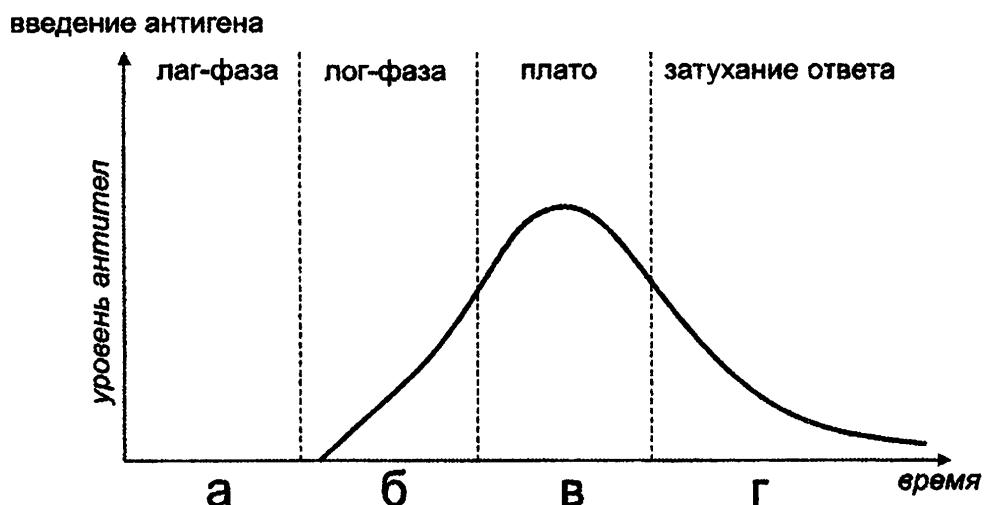
Такой тип гуморального иммунного ответа преобладает и характерен для тимусзависимых антигенов (рис. 3).

Существуют и тимуснезависимые антигены, которым для формирования иммунного ответа не требуется участия Th2-лимфоцитов.

В процессе гуморального иммунного ответа образуются также **В-лимфоциты иммунологической памяти**, которые не участвуют в первичном иммунном ответе. Это долгоживущие В-лимфоциты, несущие на своей поверхности антигенраспознающие BCR-рецепторы IgG или IgA (но не IgM). В-клетки памяти образуются в фолликулах лимфоидных органов и тканей, рециркулируют по организму и имеют ту же специфичность BCR-рецепторов, что и В-клетки, участвующие в первичном иммунном ответе. При повторном контакте с тем же антигеном В-клетки памяти способны к быстрой пролиферации и диффе-

Рис. 3

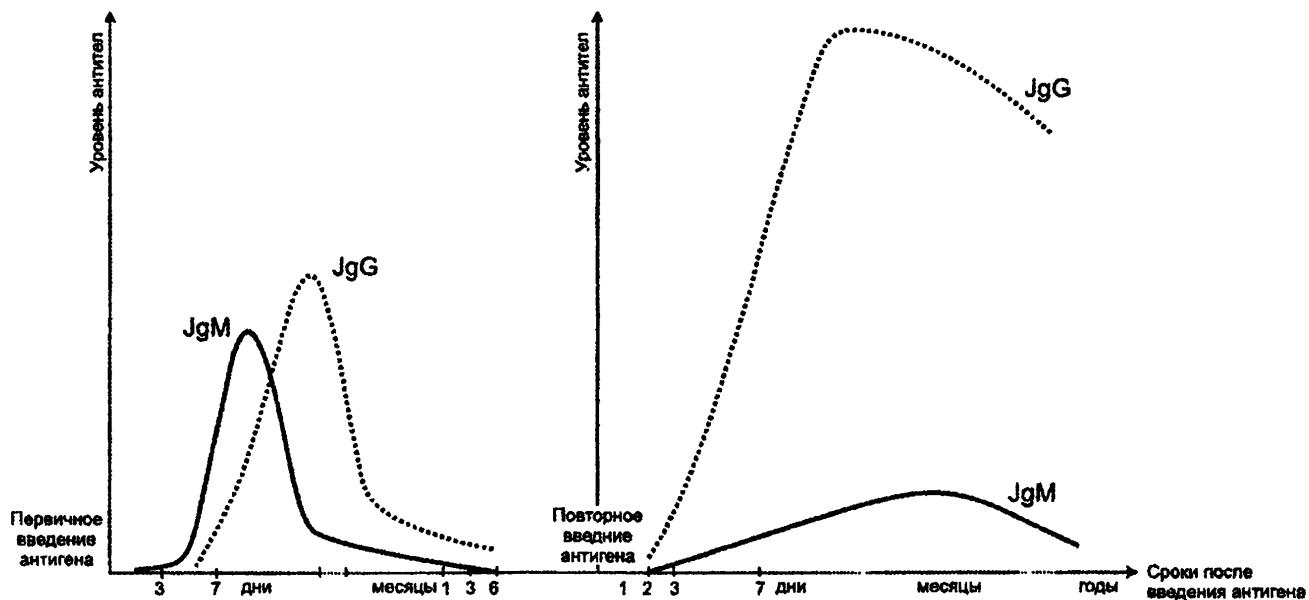
### Четыре фазы первичного гуморального иммунного ответа



Примечание: фазы образования антител: а) латентная, б) логарифмического роста, в) стационарная, г) снижения

Рис. 4

### Динамика антителообразования при первичном и вторичном иммунном ответе



ренцировке преимущественно в IgG-синтезирующие, а также частично в IgA-синтезирующие клетки. В результате вторичный иммунный ответ противостоит повторному развитию инфекции. (Рисунок 4).

## **Клеточный иммунный ответ**

Существует несколько форм иммунного ответа с участием Т-лимфоцитов: цитотоксический эффект Т-лимфоцитов, реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), реакция отторжения трансплантата и др. Иммунный ответ клеточного типа направлен, главным образом, против внутриклеточных микроорганизмов – бактерий, вирусов, простейших и некоторых грибов, осуществляет противоопухолевый надзор.

**Цитотоксический эффект CD8 Т-лимфоцитов.** Эта реакция осуществляется иммунными цитотоксическими CD8+ Т-клетками, которые синтезируют перфорины и гранзимы. Первоначально из тимуса выходят неиммунные CD8 Т-клетки. После распознавания антигена в комплексе с МНС I класса на поверхности инфицированных клеток и при действии цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-12), которые синтезируют активированные CD4 Т-клетки (Th1) и макрофаги, происходит активация и дифференцировка CD8 Т-лимфоцитов в клоны иммунных CD8 Т-клеток, обладающих цитотоксическим действием. Эта субпопуляция CD8 Т-клеток состоит из цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ), то есть Т-клеток киллеров, которые приводят к гибели инфицированную клетку-мишень с помощью следующих механизмов:

- секретируют перфорины и повреждают мембранные клеток;
- секретируют гранзимы, активируют каспазы и осуществляют киллинг через апоптоз (запограммированную клеточную гибель).

Этот процесс апоптоза происходит при участии Fas-рецептора (CD95) на клетках-мишениях, с которыми взаимодействуют FasL-лиганды на поверхности CD8 Т-клеток. При этом цитотоксические CD8 Т-клетки не погибают и продолжают уничтожать другие клетки-мишени.

Подобные механизмы гибели клеток-мишеней (синтез перфоринов, гранзимов) характерны и для NK-клеток. Для этих реакций типа «клетка атакует клетку» используют термин «cell-to-cell». Наряду с этим, иммунные CD8 Т-клетки продуцируют гамма-ИФН.

В процессе иммунного ответа формируются *T-клетки памяти* – долгоживущие Т-лимфоциты (CD8- и CD4-клетки), несущие TCR-рецепторы к антигену, который индуцировал первичный иммунный ответ. При повторном контакте с тем же антигеном Т-клетки памяти активируются. Происходит быстрое накопление специфических клонов

цитотоксических CD-клеток и CD4-хелперов, что обеспечивает более выраженный и ускоренный вторичный иммунный ответ.

CD4 Т-клетки известны как «профессиональные продуценты» цитокинов (Th1 и Th2), их участие в клеточном иммунитете связано также с распознаванием антигена и взаимодействием с В-клетками в направлении продукции антител. Наряду с этим, описаны случаи индукции апоптоза инфицированных клеток-мишеней Th1-клетками путем активации собственной Fas-системы.

**Гиперчувствительность замедленного типа (IV тип).** Основные участники этой формы клеточного иммунного ответа – CD4 Т-хелперы (Th1) и активированные этими клетками моноциты/макрофаги.

ГЗТ развивается при повторном контакте с антигеном, ранее вызвавшем сенсибилизацию CD4 Т-хелперов (Th0) и их дифференцировку в активированные Т-хелперы воспаления – Th1. Сенсибилизированные (иммунные) Th1-клетки при повторном контакте с антигеном той же специфичности, представленным в комплексе с МНС II класса на поверхности инфицированных макрофагов, содержащих персистирующие возбудители, активируют эти макрофаги с помощью секретируемых цитокинов и, особенно,  $\gamma$ -интерферона и ФНО. Активированные макрофаги уничтожают внутриклеточные патогены, но одновременно вызывают длительно протекающий воспалительный процесс мононуклеарного типа, характерный для ГЗТ. Продукты, выделяемые активированными макрофагами (привоспалительные цитокины, оксид азота, активные формы кислорода и др.), оказывают повреждающее действие на ткани, воспалительная реакция сопровождается образованием плотных инфильтратов, содержащих макрофаги и Th1-клетки. При некоторых инфекциях формируются специфические гранулемы (сифилис, туберкулез, лепра, риккетсиозы и др.).

*Гранулема – ограниченный очаг воспаления различной локализации. Это плотные «узелки», в центре которых активированные макрофаги и их производные – эпителиоидные и гигантские клетки, а на периферии – лимфоциты и моноциты. Продолжительность цикла развития гранулемы 1-5 месяцев, исход – рубцевание, инкапсуляция или некротический распад.*

Таким образом, ГЗТ имеет не только защитное значение, но является проявлением гиперреактивности (аллергии) и сопровождается поражением различных тканей и органов.

ГЗТ развивается при инфекционных заболеваниях с длительным персистированием внутриклеточных патогенов и, как правило, с затяжным течением инфекции (туберкулез, лепра, бруцеллез, туляремия, риккетсиозы, актиномикоз, кандидоз, токсоплазмоз, лейшманиоз, герпес и др.). Для диагностики таких заболеваний применяют кожно-аллергические пробы, выявляющие ГЗТ к конкретному антигену (аллергену). Для этой цели испытуемому вводят внутрикожно соответствующий антиген-аллерген (туберкулин, бруцеллин, актинолизат и т.п., изготовленные из одноименных возбудителей), результат учитывают через 24-48-72 часа. Появление покраснения и инфильтрата (папулы) определенного диаметра указывает на положительную реакцию, которая выявляется не только у больных соответствующей инфекцией, но длительно сохраняется у ранее переболевших, а также развивается после вакцинации.

## 7. Формы иммунного ответа

Кроме рассмотренных типов иммунного ответа, принимающих непосредственное участие в формировании адаптивного противоинфекционного иммунитета, существуют и другие. Основными формами иммунной реактивности являются:

- 1. Гуморальный иммунный ответ** – продукция специфических защитных антител-иммуноглобулинов (с участием В- и Т-лимфоцитов).
- 2. Клеточный иммунный ответ с участием Т-лимфоцитов:**
  - цитотоксическая реакция Т-клеток на генетически чужеродный патоген;
  - гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ, IV тип);
  - трансплантационный иммунитет (отторжение трансплантата);
  - противоопухолевый иммунитет.
- 3. Иммунологическая память** – образование клонов долгоживущих Т- и В-лимфоцитов, обеспечивающих эффективный вторичный иммунный ответ, что препятствует развитию инфекционного заболевания после повторного проникновения в организм патогена той же специфичности (постинфекционный или постvakцинальный иммунитет).

**4. Иммунологическая гиперчувствительность (аллергия)** – повышенная реактивность на повторный контакт с антигеном (аллергеном). Существует гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ I, II, III – типов) – это В-зависимая аллергия, развитие которой связано с образованием антител классов IgE, IgG, IgM к различным аллергенам. Эти реакции проявляются через несколько минут или часов после взаимодействия антител с повторно проникшим антигеном.

Другой тип – гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ, IV тип) – Т-зависимая. Развивается через 1-3 суток после повторного проникновения аллергена в сенсибилизированный организм.

Таким образом, имеются следующие типы гиперчувствительности:

- *Тип I* – гиперчувствительность немедленного типа (анафилактическая). Развивается при связывании аллергена с IgE, выработанными после первичного контакта с этим антигеном и фиксированными на базофилах и тучных клетках печени. Взаимодействие аллергена с IgE приводит к дегрануляции клеток и выбросу из гранул различных медиаторов, в том числе гистамина, и развитию анафилактической реакции.

- *Тип II* – гиперчувствительность цитолитического типа. Возникает при взаимодействии аллергена с клетками эндотелия, эпителия и другими, несущими на себе молекулы IgG, реже IgM. Аллерген присоединяется к активным центрам антител. На образовавшихся комплексах фиксируется комплемент, что ведет к комплементзависимому цитолизу клеток.

- *Тип III* – иммунокомплексная гиперчувствительность. Обусловлена образованием и фиксацией иммунных комплексов «антиген+антитело» (IgG, IgM) на клетках и развитием воспалительной реакции при участии компонентов комплемента C3a и C3b (анафилатоксина), а также клеток иммунной системы.

- *Тип IV* – гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). Развивается при повторном контакте аллергена с CD4-клетками воспаления (Th1), ведущей к активации макрофагов и возникновению длительного воспалительного процесса. ГЗТ имеет также защитное значение, способствуя уничтожению внутриклеточных патогенов.

Аллергенами являются антигены микробов и гельминтов, различные лекарственные средства и другие химические вещества (в качестве

гаптенов, присоединяющихся к белкам организма), многие вещества животного и растительного происхождения (пищевые аллергены, эпидермальные аллергены домашних животных и птиц, яды пчел, ос и других насекомых, тараканы, домашняя пыль и др.).

**5. Иммунологическая толерантность** – специфическая ареактивность («неотвечаемость») иммунной системы на те или иные антигены, при сохранении способности к иммунному ответу на другие антигены. Толерантность бывает врожденной (физиологической) и приобретенной (индуцированной).

*Врожденная (центральная) толерантность иммунной системы* к собственным клеткам и тканям организма формируется в эмбриональном периоде путем отрицательной селекции всех аутореактивных клонов Т- и В-лимфоцитов, реагирующих на антигены этих тканей. Центральная толерантность необходима для сохранения индивидуальной клеточной целостности организма, при ее нарушении развиваются аутоиммунные заболевания (ревматоидный артрит, красная волчанка и др.).

В организме существует так называемые забарьерные органы, к которым врожденная толерантность отсутствует (мозг, хрусталик и другие ткани глаза, надпочечники, семенники и др.). Эти органы в период эмбрионального и постнатального развития не контактировали с лимфоцитами, развивались обособленно. Поэтому, при повреждении этих органов и выходу их антигенов во внутреннюю среду организма, на них развивается иммунный ответ.

*Приобретенная толерантность* может возникнуть при попадании антигена (толерогена) в организм в первые дни жизни новорожденного, вследствие незрелости иммунной системы, или в зрелый организм при подавлении иммунной системы путем облучения, введения иммуносупрессантов и др., а также может быть получена в эксперименте на животных. Толерогены, как правило, слабые антигены со сниженной иммуногенной активностью; имеет значение доза толерогена и длительность его воздействия. В формировании толерантности могут участвовать различные механизмы – воздействие супрессантов, отсутствие у антигенпрезентирующих клеток выработки костимулирующего фактора В-7 (второго сигнала) и др. При выведении толерогена из организма состояние толерантности к нему прекращается.

## **Контрольные вопросы по теоретической иммунологии**

### **Контрольные вопросы к занятию № 13 (темы 1 и 2)**

1. Понятие «противоинфекционный иммунитет», его сущность и функции, последовательность формирования.
2. Понятие «антиген», Роль антигенов в инфекционном процессе и развитии адаптивного иммунного ответа.
3. Химическая природа и молекулярное строение антигенов. Корпускулярные и растворимые антигены. «Антигенная детерминанта» (эпитоп), специфичность антигенов.
4. Свойства антигенов, примеры. Понятие «антигенностъ» и «иммуногенностъ».
5. Гаптены, их свойства, примеры.
6. Антигены бактериальной клетки. их локализация. Поверхностные антигены, их свойства и значение. Серологическая вариабельность.
7. О-антigen грамотрицательных бактерий, строение и свойства.
8. Секретируемые антигены бактерий, их характеристика, функции, примеры.
9. Протективные антигены, их свойства и значение, примеры.
10. Суперантигены, механизм взаимодействия с клетками иммунной системы, примеры.
11. Понятие «антитело». Подразделение антител на классы. Роль антител в развитии адаптивного иммунного ответа.

### **Контрольные вопросы к занятию № 14 (темы 3 и 4)**

12. Молекулярная структура и свойства мономера иммуноглобулинов.
13. Строение и функции Fab-фрагментов и Fc-фрагмента иммуноглобулина на примере IgG, его защитная роль. Понятие «валентность» антител.
14. Молекулярное строение, характерные свойства и защитная роль IgM.
15. Молекулярное строение, свойства и защитная роль IgA. Особенности сывороточных и секреторных иммуноглобулинов этого класса.
16. Строение и функции IgD и IgE.
17. Понятия «аффинность» и «авидность» антител.

- 18.Биологические функции антител.
- 19.Иммунная система организма, ее организация и основные функции.
- 20.Характеристика центральных органов иммунной системы.Процессы созревания иммунокомпетентных клеток (В- и Т-лимфоцитов) в этих органах.
- 21.Периферические лимфоидные органы и ткани, их состав и характеристика, защитная роль.

**Контрольные вопросы к занятию № 15 (тема 5)**

- 22.Общие принципы адаптивного иммунитета (гуморального и клеточного). Клетки, участвующие в иммунном ответе, их функции.Межклеточные контакты и регуляция иммунного ответа.
- 23.CD-антигены и их роль в адаптивном иммунном ответе.
- 24.Цитокины, их характеристика, подразделение, функции (привести примеры).
- 25.В- и Т-лимфоциты, их сходство и отличия. Наивные и активированные В- и Т-клетки, их функции в иммунном ответе.
26. Функциональные и морфологические особенности В-лимфоцитов.
- 27.Т-лимфоциты, их функциональные и морфологические особенности. Субпопуляции Т-лимфоцитов.
- 28.Антигенпрезентирующие клетки, их роль в иммунном ответе.Дендритные клетки, их подразделение по происхождению и функциональной активности, локализация в организме.

**Контрольные вопросы к занятию № 16 (темы 6 и 7)**

- 29.Гуморальный адаптивный иммунный ответ (противоинфекционный), условия возникновения, основные факторы. Стадии (фазы) иммунного ответа.
30. Динамика антителообразования при первичном и вторичном иммунном ответе.
- 31.Клеточный адаптивный иммунный ответ, формы (типы) его проявления. Цитотоксическая реакция Т-лимфоцитов: условия возникновения, основные участники, динамика развития.
- 32.Роль цитотоксических иммунных CD8-Т-лимфоцитов и других клеток в киллинге клеток-мишеней, его механизм.

33. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ), как одна из форм клеточного иммунного ответа. Основные факторы и механизм действия. Последствия ГЗТ для организма. Примеры заболеваний, при которых развивается ГЗТ. Способ выявления ГЗТ.
34. Иммунологическая память. Роль В- и Т-лимфоцитов в формировании постинфекционного и поствакцинального иммунитета.
35. Формы адаптивного иммунного ответа (перечислить). Гиперчувствительность немедленного типа (реакции I, II и III типа), краткая характеристика.
36. Понятие «иммунологическая толерантность». Врожденная (центральная) толерантность, механизм возникновения и развития, значение для организма. Забарьерные органы и ткани. Приобретенная (индуцированная) толерантность.

## **Занятие № 13**

**Тема:. Практическая иммунология. Серологические реакции:  
реакция агглютинации, реакции непрямой агглютинации.**

**План занятия:**

1. Серологические реакции, их сущность, подразделение Практическое применение серологических реакций.
2. Реакция агглютинации. Ингредиенты, механизм реакции, внешнее проявление, цели и методы постановки:
  - а) Реакция агглютинации на предметном стекле;
  - б) Развернутая реакция агглютинации в пробирках. Определение титра испытуемой сыворотки.
3. Реакции непрямой (пассивной) агглютинации. Ингредиенты, механизм, методы постановки:
  - а) РНГА, ингредиенты, внешнее проявление, цели постановки.  
Учет развернутой РНГА.
  - б) Латекс-агглютинация, ингредиенты, внешнее проявление, цели постановки.
  - в) Коагглютинация, ингредиенты, внешнее проявление, цели постановки.

### **Методические указания к выполнению практических занятий.**

Перед разбором серологических реакций следует рассмотреть теоретический материал по иммунологии – темы 1 и 2 вопросы 1-11 (стр. 33).

Важнейшим разделом практической иммунологии являются методы исследования, проводимые при помощи серологических (иммuno-логических) реакций, основанных на специфическом взаимодействии антигенов и антител. Серологические реакции широко используются в диагностике инфекционных болезней различной этиологии (бактериальных, вирусных и др.), а также в неинфекционной патологии: для выявления аллергии, аутоиммунной патологии, определения совместимости тканей при трансплантации органов и др.

## **1. Серологические реакции**

*Серологические реакции – это реакции взаимодействия между антигенами и соответствующими им специфическими антителами «in vitro», имеющие различные видимые проявления.*

В зависимости от *механизма и внешних проявлений* серологические реакции подразделяют на:

- реакции агглютинации (прямая и непрямые) – склеивание крупных (корпскулярных) антигенов с образованием аггломератов;
- преципитации – осаждение мелкодисперсных антигенов из коллоидных растворов;
- реакции нейтрализации антигена с утратой им токсичности (биопатогенности);
- реакции с участием комплемента;
- реакции с использованием меченых антител или антигенов (применяют флюоресцентные, ферментные, радиоактивные метки).

По *характеру и количеству участвующих в реакции ингредиентов* серологические реакции подразделяют на простые и сложные. Простые делят на прямые - двухкомпонентные (взаимодействуют между собой только антиген и антитело - реакции агглютинации и преципитации) и непрямые – с участием корпскулярных носителей (реакции непрямой агглютинации).

Сложными считаются многокомпонентные серологические реакции, такие как реакция связывания комплемента (РСК).

Большинство из перечисленных реакций имеют несколько методов постановки. В настоящее время учет результатов многих серологических реакций проводится с помощью автоматизированных систем, что обеспечивает стандартизацию получаемых результатов.

Каждая серологическая реакция характеризуется двумя основными параметрами - специфичностью и чувствительностью.

*Специфичность* – это способность к взаимодействию между комплементарными антигеном и антителом. Высокоспецифичные реакции не дают ложноположительных результатов или они минимальны.

*Чувствительность* указывает на наименьшее количество (концентрацию) антигена или антител, которое можно определить с помощью серологической реакции. Если реакция обладает высокой чувствительностью, то ложноотрицательные результаты отсутствуют или минимальны.

**Фазы реакции.** В любой серологической реакции выделяют две фазы: специфическую невидимую и неспецифическую видимую.

**Первая - специфическая фаза** реакции (невидимая) происходит в результате взаимодействия находящихся на поверхности антигена эпитопов с активными центрами специфических антител, полученных путем иммунизации животных данным антигеном. На этом этапе ведущую роль играют межмолекулярные силы – водородные, Ван дер Ваальса, Кулона.

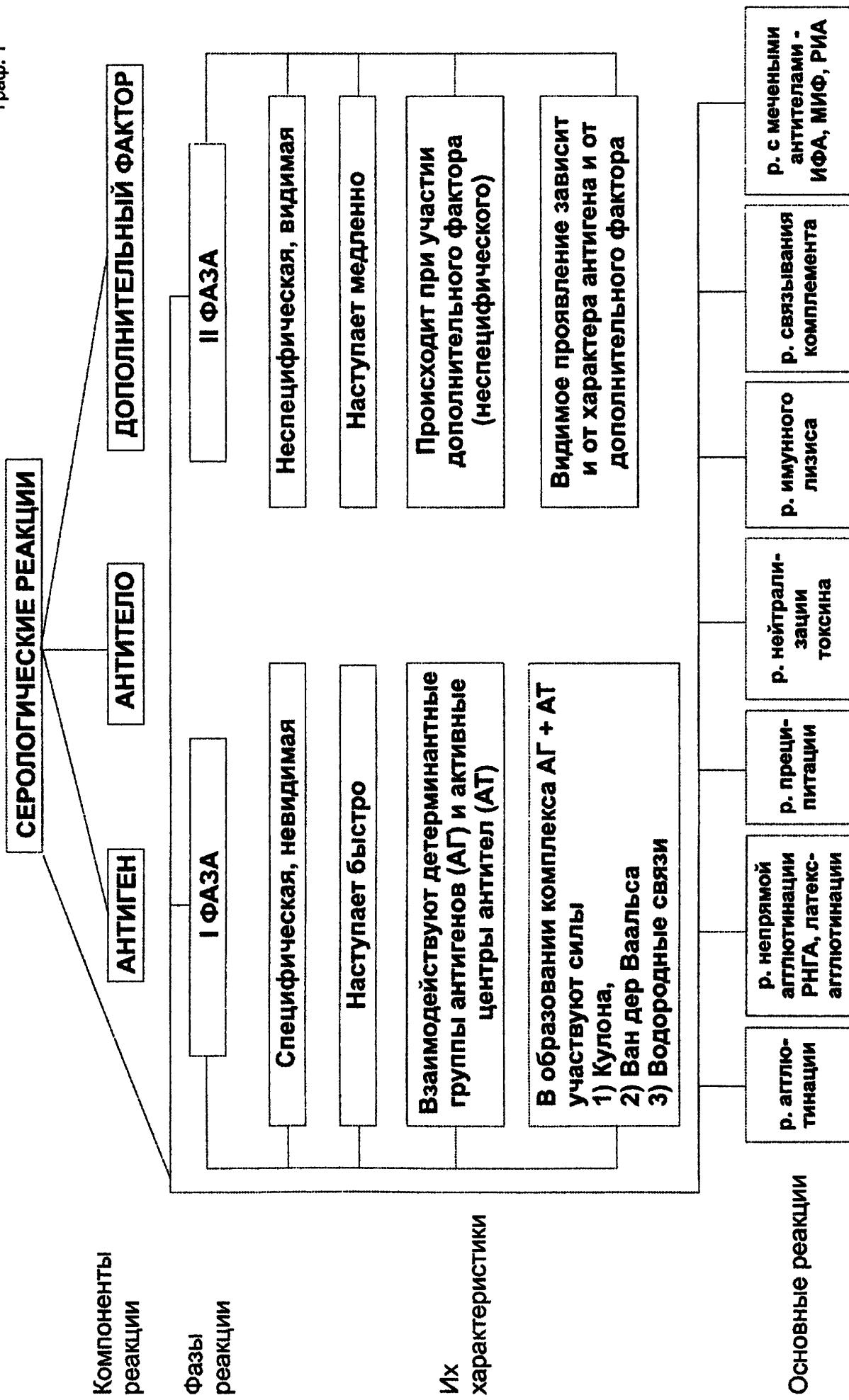
**Вторая - неспецифическая фаза** реакции, (видимая), более медленная, происходит при участии дополнительного неспецифического фактора (электролита, комплемента). Видимый результат, особенно в реакции преципитации, обычно получают лишь в случае эквивалентного соотношения антигенов и антител. Если же один из ингредиентов находится в избытке, а второго недостаточно, то положительный результат может не проявиться.

**Практическое применение.** Серологические реакции широко используют в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний (иммунодиагностике). Их применяют в двух направлениях:

- Для серологической диагностики - обнаружения антител в сыворотке больного (неизвестных антител) с помощью известного антигена – диагностикума (получаемого из соответствующего известного микроба-возбудителя), а также для определения неизвестного антигена в сыворотке или других жидкостях обследуемого с помощью известных антител (специфической диагностической иммунной сыворотки).
- Для серологической идентификации возбудителя - определения серогруппы, вида, серологического варианта (серовара) у выделенного микробы (неизвестного антигена) с помощью специфической иммунной диагностической сыворотки, содержащей известные антитела.

**Задание:** По ходу изучения серологических реакций, рассмотреть график 1 и заполнить в альбоме сводную таблицу 2 для каждой отдельной реакции.

Граф. 1



Цель постановки  
реакции

- А) определение неизвестных антигенов с помощью известных антител  
Б) Определение неизвестных антигел в сыворотке с помощью известных антигенов

Таблица 2

***Серологические реакции***

(в таблицу занести следующие реакции: реакция агглютинации, РНГА, латекс-агглютинация, реакция преципитации, реакция нейтрализации токсина антитоксином, бактериолиз, иммунный гемолиз, РСК, ИФА, МИФ)

Наименование реакции											
Наименование и характеристика ингредиентов реакции:											
1. антиген											
2. антитело											
3. дополнительный (неспецифический) компонент											
Механизм реакции											
Методы постановки											
Внешнее проявление реакции											
Титр реакции (определение)											
Цели постановки											

**2. Реакция агглютинации**

***Реакция агглютинации – это склеивание корпуккулярных антигенов (агглютиногенов) – микробов, других клеток или частиц, носителей антигена, под воздействием специфических антител с образованием видимых глазом аггломератов – хлопьев; реакция происходит только в присутствии электролита (физиологического раствора - 0,85% раствор NaCl).***

В реакции агглютинации участвуют антитела-агглютинины класса IgM, а также IgG.

В основе реакции агглютинации лежит механизм образования «решетки»: в 1-ой фазе реакции поливалентные (полидетерминантные) антигены и двухвалентные (и более) антитела образуют комплексы по типу решетки; во 2-ой фазе в присутствии электролита снижается заряд комплексов {Аг-Ат}, уменьшается растворимость и образуются видимые аггломераты (хлопья), выпадающие в осадок.

Различают **O- и Н-агглютинацию** в зависимости от природы участвующих в реакции поверхностных антигенов бактериальных клеток. Жгутиковые бактерии вызывают при взаимодействии со специфическими антителами Н-агглютинацию, которая протекает быстро с образованием рыхлых крупных хлопьев. Бактерии без жгутиков образуют мелкозернистый осадок (O-агглютинация) и реакция протекает медленнее.

Применяют два метода постановки реакции агглютинации: пластинчатый (на предметном стекле) и развернутый в пробирках.

**а) Реакция агглютинации на предметном стекле.**

Обычно ее применяют для идентификации неизвестной выделенной чистой культуры бактерий. Эта реакция является *ориентировочной*, если ее ставят с диагностической видовой агглютинирующими сывороткой, и *окончательной* – при постановке ее с адсорбированными монорецепторными агглютинирующими сыворотками или моноклональными антителами.

**Методика постановки реакции.** Ингредиенты: испытуемая культура бактерий на скошенном мясо-пептонном агаре, диагностическая агглютинирующая сыворотка, физиологический раствор. Диагностические сыворотки получают от животных (кроликов, коз и др.), гипериммунизированных соответствующим видом микроорганизмов.

На предметное стекло наносят каплю диагностической сыворотки (разведена физиологическим раствором 1:10 - 1:20) и каплю физиологического раствора (контроль). Испытуемую культуру осторожно берут петлей с поверхности скошенного агара и вносят сначала в контрольную каплю физиологического раствора, а затем в каплю диагностической сыворотки. Склейивание бактерий происходит в течение первых минут наблюдения. При покачивании стекла, в капле с диагностической сывороткой образуются хлопья, а жидкость становится более прозрачной. Контрольная капля остается равномерно мутной.

**Задание.** Поставить реакцию агглютинации на предметном стекле, результат зарисовать. Отметить характер ее внешнего проявления (O- или Н-агглютинация).

**б) Развернутая реакция агглютинации в пробирках.**

Эту реакцию ставят для серологической диагностики (выявления антител в испытуемой сыворотке) и реже – для серологической

идентификации возбудителя. Ингредиенты: сыворотка больного, диагностикум – взвесь известных убитых микробов и физиологический раствор.

**Методика постановки реакции.** В штативе устанавливают 7 пробирок, первые 5 пробирок – опытные, 6-я и 7-я пробирки – контрольные. В опытных пробирках готовят серийные 2-кратные разведения испытуемой сыворотки (1:50, 1:100, 1:200 и т.д.) в объеме 1,0 мл. В каждую опытную пробирку вносят по 3 капли диагностикума.

Контроли: 6-ая пробирка – контроль антигена (1,0 мл физиологического раствора + 3 капли диагностикума), 7-ая – контроль сыворотки (содержит сыворотку в исходном разведении 1:25).

Штатив с пробирками помещают на 2 часа в термостат при 37°C, после чего проводят предварительный учет реакции. Окончательный учет проводят на следующий день, после выдерживания пробирок при комнатной температуре. Определяют титр сыворотки и делают заключение.

*Положительный результат* – образование хлопьев и просветление жидкости. Хлопья постепенно выпадают в осадок, жидкость над ними становится прозрачной. *Отрицательный результат*: содержимое пробирок равномерно мутное.

Контроли: в контроле антигена содержимое пробирки равномерно мутное; в контроле сыворотки – содержимое прозрачное, без осадка.

*Титром сыворотки считается наибольшее (последнее) разведение сыворотки, в котором еще наблюдается четкая реакция агглютинации.*

Развернутую реакцию агглютинации применяют в серодиагностике инфекционных заболеваний, при которых формируются антибактериальный иммунитет гуморального типа, связанный с выработкой антител-агглютининов. Реакции агглютинации применяются для серодиагностики брюшного тифа и паратифов А и В (реакция Видаля), бруцеллеза (реакции Хеддльсона, Райта) и др.

**Задание:** Учесть опыт развернутой реакции агглютинации, определить титр сыворотки. Заполнить таблицу. Сделать заключение.

Таблица 3

**Развернутая реакция агглютинации**

№№ пробирок	1	2	3	4	5	6	7
Разведения испытуемой сыворотки. Диагностикум	1:50 3 капли	1:100 3 капли	1:200 3 капли	1:400 3 капли	1:800 3 капли	Контроль антигена 3 капли	Контроль сыворотки (1:25)
Результат: (зарисовать)							

Заключение:

### 3. Реакции непрямой (пассивной) агглютинации

В серологических реакциях, называемых реакциями непрямой (пассивной) агглютинации, использует корпускулярные носители - эритроциты, частицы латекса или бентонита, на поверхности которых адсорбируют молекулы антигена известной специфичности, например растворимые антигены или гаптены, получаемые из бактерий, их токсины, вирусы и др. Такие биопрепараты называются *антигенными диагностиками*. При наличии в исследуемой сыворотке специфических антител к адсорбированным на носителях антигенам, эти антитела вызывают склеивание корпускул диагностикума между собой. Образуются видимые невооруженным глазом аггломераты (хлопья, состоящие преимущественно из носителей сорбированных антигенов).

Для выявления антигенов в исследуемых материалах используют аналогичные носители, на поверхности которых адсорбированы антитела определенной специфичности, их называют *иммуноглобулиновыми (антителными) диагностиками*.

В зависимости от применяемых носителей (эритроциты, шарики латекса, клетки стафилококков) различают следующие разновидности реакций непрямой агглютинации: реакцию непрямой гемагглютинации, латекс-агглютинацию, коагглютинацию.

Реакции непрямой агглютинации и реакция прямой агглютинации имеют общий механизм – образующиеся комплексы {Аг-Ат}

связываются между собой по типу «решетки». В присутствии электролита, вследствие снижения заряда и уменьшения растворимости, происходит агглютинация комплексов, образуются хлопья, позволяющие визуально учесть результат реакции.

Реакции непрямой агглютинации обладают высокой специфичностью и чувствительностью. Они универсальны, так как на поверхности носителей могут быть адсорбированы антигены или антитела любой специфичности.

**а) Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).** В качестве антигенного диагностикума в ней применяют эритроциты (0-1 группы человека или барана), на которых после их предварительной обработки танином или формальдегидом, адсорбируют растворимые антигены бактерий, бактериальные токсины или гаптены микроорганизмов. Такие эритроциты (их называют сенсибилизованными) приобретают новую антигенную специфичность сорбированных антигенов, а вместе с ней и способность агглютинироваться сыворотками, содержащими антитела против данных антигенов.

Эритроцитарные антигенные диагностикумы используют в РНГА для серодиагностики - выявления антител в сыворотке больного.

**Методика постановки РНГА.** Реакцию ставят на 96-луночных полистероловых планшетках. Исследуемую сыворотку предварительно инактивируют при 56°C в течение 30 минут для уничтожения комплемента, готовят двукратные разведения (от 1:20 до 1:12000 и более) и разливают в лунки по 0,1 мл, к каждому разведению добавляют по 0,1 мл эритроцитарного диагностикума.

Контроли РНГА - сенсибилизованные эритроциты (диагностикум) с физиологическим раствором (К1); несенсибилизованные эритроциты с физиологическим раствором (К2); несенсибилизованные эритроциты с исследуемой сывороткой (К3).

После 2 часов инкубации в термостате при 37°C или при комнатной температуре учитывают реакцию и определяют титр исследуемой сыворотки.

Положительный результат – осадок эритроцитов в лунке имеет форму «зонтика» с зубчатыми краями и покрывает почти всю лунку. Отрицательный результат – эритроциты оседают в центре в виде компактного диска с ровными краями («пуговка»).

*За титр РНГА принимают максимальное разведение сыворотки, дающее положительную реакцию в виде зонтика.*

**Задание.** Учесть опыт РНГА с исследуемой сывороткой, определить ее титр, сделать заключение, результат занести в таблицу 4, зарисовать.

Таблица 4

**Реакция непрямой гемагглютинации**

Разведение исследуемой сыворотки	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>
Результат: (нарисовать)										

**Заключение:**

РНГА применяется для серодиагностики многих инфекционных заболеваний (брюшного тифа, паратифов А и В, дизентерии, холеры, бруцеллеза, вирусных гепатитов, клещевого энцефалита, крымской геморрагической лихорадки, малярии и др.), а также в диагностике неинфекционной патологии.

РНГА характеризуется высокой чувствительностью и позволяет определять малое количество (концентрацию) антител, например, удаётся выявлять наличие специфических IgM в начале заболевания.

Реакцию непрямой гемагглютинации ставят также с антителыми эритроцитарными диагностиками. В этом случае на эритроцитах сорбированы специфические иммуноглобулины (известные антитела), а определяют неизвестные антигены возбудителей бактериальных или вирусных инфекций, а также токсины. Такую реакцию называют реакцией обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА).

**б) Латекс-агглютинация** – серологическая реакция, в которой используют в качестве диагностикума полимерные микрошарики из латекса (диаметром 0,5-1 мкм), на поверхности которых адсорбированы известные растворимые антигены (антигенные латекс-диагностикумы), на латекс-частицах также сорбируют специфические антитела (антителные латекс-диагностикумы). Часто латекс-диагностикумы окрашены в яркий цвет.

Механизм латекс-агглютинации аналогичен таковому при РНГА. Реакцию проводят в капле жидкости на предметном стекле или на пластинках с лунками. Частицы латекса контрастно окрашены и образующиеся хлопья через несколько минут хлопья хорошо видны.

Диагностические тесты на основе латекс-агглютинации применяют как экспресс-методы диагностики многих инфекционных заболеваний. Метод чувствителен, специчен и прост в техническом отношении и может проводиться даже в полевых условиях

Латекс-агглютинация ставится, как и другие серологические реакции, для выявления неизвестного антигена в исследуемом материале или антител к микробу-возбудителю в испытуемой сыворотке.

**в) Реакция коагглютинации (КоА)** - близка по механизму к реакции обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА) и латекс-агглютинации. Ее применяют в качестве экспресс-метода диагностики для выявления антигенов в исследуемых клинических материалах.

В этой реакции диагностиком является взвесь клеток *Staphylococcus aureus* штамма *Cowan 1* (размер клеток 0,6-1,2 мкм), нагруженных антителами той или иной специфичности. Способность этого штамма стафилококков к адсорбции антител связана с высоким содержанием в клеточной стенке белка А, который имеет сродство к Fc-фрагменту иммуноглобулинов.

Реакцию коагглютинации ставят на предметном стекле или другой подложке. При соответствии определяемого антигена вирусной или бактериальной природы и антителного стафилококкового диагностикума происходит агглютинация.

### Контрольные вопросы по теме занятия

1. Серологические реакции, их сущность, подразделение в зависимости от характера и участвующих ингредиентов. Практическое применение.
2. Две фазы серологических реакций, их характеристика.
3. Реакция агглютинации, ингредиенты и механизм реакции, способы постановки (назвать), практическое применение.
4. Методика постановки реакции агглютинации на предметном стекле. С какой целью применяется? Какие диагностические сыворотки используют?

5. Методика постановки развернутой реакции агглютинации в пробирках. С какой целью применяется? Определение титра сыворотки.
6. Охарактеризуйте диагностикумы, применяемые в реакции агглютинации. Каковы отличия между О- и Н-агглютинацией.
7. Реакции непрямой (пассивной) агглютинации. Назовите их разновидности, укажите отличия прямой реакции агглютинации от непрямой. Объясните механизм реакции. Практическое применение.
8. Реакция непрямой гемагглютинации, ее сущность, ингредиенты, способ постановки и видимый результат.
9. Эритроцитарные антигены-диагностикумы в РНГА, принцип их получения, применение.
10. Латекс-агглютинация, ее сущность, ингредиенты, применение.
11. Реакция коагглютинации, ее механизм, ингредиенты. Что представляет собой диагностикум в реакции коагглютинации? Практическое применение.

## **Занятие № 14**

**Тема: Серологические реакции (продолжение): реакция преципитации, методы постановки. Реакция нейтрализация токсина антитоксином и ее модификации.**

### **План занятия**

1. Реакция преципитации, ингредиенты, механизм реакции, внешнее проявление. Модификации:
  - а) Реакция кольцепреципитации;
  - б) Реакции преципитации в геле – методы радиальной диффузии по Манчини и встречной диффузии по Оухтерлони;
  - в) Иммуноэлектрофорез.
2. Реакция нейтрализации токсина антитоксином, ее сущность, практическое применение. Модификации.
  - а) Реакции нейтрализации *in vivo* на животных и в организме человека.
  - б) Реакции нейтрализации *in vitro*:
    - реакция флоккуляции;
    - реакция нейтрализации в геле по Оухтерлони.
    - модификации реакции нейтрализации – РОНГА. РНАТ.

### **Методические указания к выполнению практических занятий.**

Рассмотреть теоретический материал – темы 3 и 4, вопросы 12-21. Далее продолжить изучение серологических реакций, начатое на предыдущем занятии. Разобрать сущность и методики постановки реакции преципитации: кольцепреципитацию, метод радиальной и встречной иммунодиффузии, иммуноэлектрофорез.

При разборе реакций нейтрализации обратить внимание, что при взаимодействии биологически активного антигена со специфическими антителами происходит снижение его биологической активности. На занятии разбирается реакция нейтрализации токсина антитоксином, методики постановки, практическое применение.

При разборе серологических реакций с участием комплемента напомнить студентам пути активации и свойства комплемента, обратить внимание, что в этих серологических реакциях учитываются следующие свойства комплемента – способность присоединяться к

комплексу {Аг-Ат} и вызывать лизис корпускулярных антигенов мембраноатакующим комплексом, образующимся при активации.

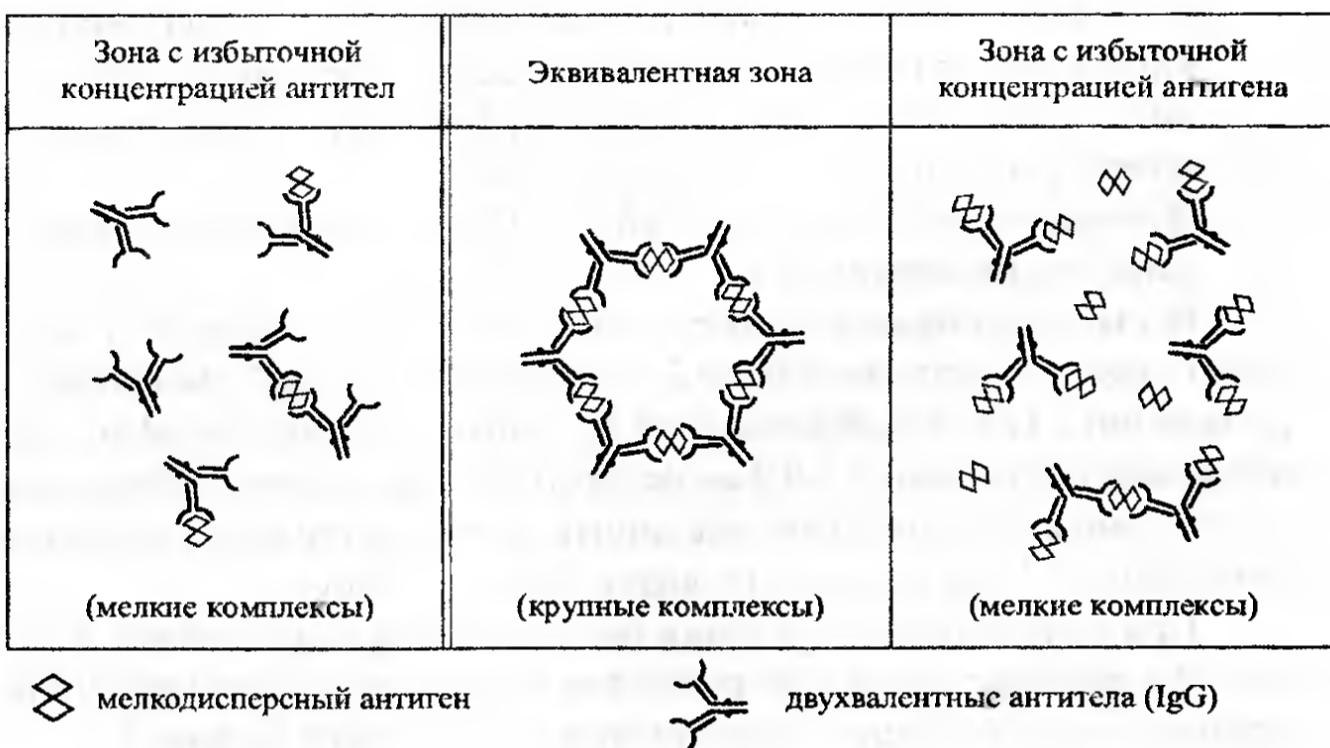
## 1. Реакция преципитации (РП)

**Реакция преципитации** – это осаждение растворимых антигенов (преципитиногенов) специфическими антителами сыворотки в присутствии электролита (0,85% раствора NaCl).

Выпадение нерастворимых крупных комплексов {Аг-Ат} наблюдается при эквивалентном соотношении ингредиентов. (Рис. 5). Механизм реакции заключается в том, что полидетерминантные антигены, представляющие собой прозрачный коллоидный раствор, и двухвалентные антитела (преципитирующие антитела принадлежат к классу IgG) образуют комплексы по типу решетки, в присутствии электролита снижается заряд, уменьшается растворимость и образовавшийся преципитат выпадает в осадок, видимый невооруженным глазом.

Рис. 5

*Величина комплексов {антиген-антитело},  
в реакции преципитации в зависимости от количественного  
соотношения антигенов и антител*



Реакцию преципитации применяют для выявления антигенов по известной иммунной преципитирующей сыворотке или антител с использованием известных антигенов-диагностикумов.

На практике применяют методики постановки реакции преципитации:

- в жидкой среде: реакции кольцепреципитации и флоккуляции;
- в полужидком геле: метод двойной иммуноdifфузии по Оухтерлони, метод радиальной difфузии по Манчини, иммуноэлектрофорез.

### **а) Реакция кольцепреципитации**

Реакцию кольцепреципитации проводят в жидкой среде с прозрачными растворами: диагностической преципитирующей сывороткой с высоким титром антител и коллоидным раствором антигена. При соответствии антигена и антитела на границе двух соединяемых растворов образуется нерастворимый преципитат в виде мутного кольца.

*Методика постановки* (таблица 5).

Ингредиенты:

- диагностическая сыворотка известной специфичности (например, сибиреязвенная)
- исследуемый преципитиноген (например, экстракт, полученный кипячением кусочков меха животных с подозрением на зараженность возбудителем сибирской язвы) в виде прозрачного коллоидного раствора,
- физиологический раствор (0,85% NaCl), которым разводят сыворотку и преципитиноген.

В узкие пробирки (диаметром не более 0,5 см, иначе результат «расплывается») наливают 0,2-0,3 мл преципитирующей сыворотки в разведении 1:10 или 1:20 затем в эти пробирки пастеровской пипеткой осторожно насыпают 0,1-0,2 мл исследуемого преципитиногена (если необходимо определить титр преципитиногена, то его берут в разных разведениях). Учет реакции проводят через 1-5 минут.

При положительной реакции на границе двух прозрачных жидкостей – диагностической сыворотки и исследуемого преципитиногена появляется непрозрачный преципитат в виде мутного кольца.

Ставят положительный и отрицательные контроли (таблица 6):

- положительный контроль (1): на диагностическую сыворотку наносят соответствующий стандартный антиген - на границе образуется мутное кольцо;

- в отрицательных контролях (2,3,4) содержимое пробирок должно оставаться прозрачным вследствие отсутствия специфической системы {Аг-Ат}.

*Титром реакции кольцепреципитации называется то наибольшее разведение преципитиногена, в котором еще образуется кольцо преципитата.*

**Задание:** учесть результат реакции кольцепреципитации, занести в таблицу.

Таблица 5

### Реакция кольцепреципитации

Ингредиенты, мл	Опыг	Контроль 1	Контроль 2	Контроль 3	Контроль 4
Диагностическая преципитирующая сыворотка, 1:10	0,3	0,3	-	0,3	-
Нормальная кроличья сыворотка	-	-	0,3	-	-
Экстракт исследуемого материала	0,3	-	0,3	-	0,3
Стандартный антиген	-	0,3	-	-	-
Физиологический раствор - 0,85% NaCl	-	-	-	0,3	0,3
Результат					

### Заключение:

Метод высокочувствителен и специчен, он позволяет выявить малые количества (концентрации) антигена в исследуемом материале, поэтому его чаще всего применяют для определения антигена по известной преципитирующей сыворотке в диагностике инфекционных заболеваний, в судебной медицине, санитарной практике и т.п. Например, для выявления антигена возбудителя сибирской язвы используют реакцию термопреципитации Асколи. Для этой цели антиген экстрагируют из испытуемого животного сырья кипячением.

### б) Реакция преципитации в геле

**Метод радиальной (простой, одиночной) иммунодиффузии по Манчини.** Этот метод используется в основном в клинической иммунологии для количественного определения имуноглобулинов классов IgG, IgM и IgA в сыворотке крови, секреторных IgA, отдельных компонентов комплемента (C3, C4).

В методе радиальной иммунодиффузии (РИД) используют гель, в котором растворена сыворотка с известными антителами. В застывшем геле вырезают лунки, в которые вносят исследуемые антигены. При соответствии антигенов антителам сыворотки вокруг лунок образуются мутные кольца преципитации.

**Методика постановки.** Расплавленный и немного остуженный 3% агар (с консервантом для предотвращения роста микроорганизмов) смешивают в соотношении 1:1 со специфической иммунной сывороткой. Полученную смесь наливают тонким слоем на обезжиренную стеклянную пластину. В застывшем геле пробойником вырезают лунки (диаметром 3-5 мм), в которые вносят исследуемый антиген. Пластины инкубируют во влажной камере в течение 24-48 часов при комнатной температуре.

В случае положительного результата молекулы антигена радиально диффундируют из лунки и, встретившись с антителами, образуют зону преципитации в виде мутного кольца.

При постоянной концентрации антител в геле наблюдается прямая пропорциональность между концентрацией антигена и площадью зоны преципитации.

Поскольку площадь зоны преципитации прямо пропорциональна квадрату ее диаметра, наблюдается прямая зависимость между логарифмом диаметра преципитата и логарифмом исходного количества антигена в лунке, по которой и определяют концентрацию антигена.

**Метод двойной радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони.** Эта реакция позволяет проводить качественный анализ набора растворимых антигенов или преципитирующих антител в исследуемых системах. Принцип метода состоит в том, что антигены и антитела диффундируют навстречу друг другу из двух пространственно разделенных лунок, вырезанных в геле, молекулы антигенов и антител движутся радиально во всех направлениях. При эквивалентном соотношении между антигеном и антителами сыворотки образуется преципитат в виде белой линии, которая располагается между лунками.

**Методика постановки.** На обезжиренную стеклянную пластину ровным слоем наливают расплавленный 1,5% агар. В застывшем геле на определенном расстоянии друг от друга вырезают лунки (штампами-пробойниками на 4, 5 или 7 лунок диаметром 3-5 мм). В центральную лунку вносят антитела, в лунки по периферии – испытуемые антигены

(или один в разных разведениях для определения титра). Пластины помещают во влажную камеру, иммунодиффузию проводят при комнатной температуре 24-48 часов. В положительном случае образуются линии преципитации между лунками с сывороткой и преципитиногенами, анализируя которые, решают: являются ли антигены серологически идентичными, частично идентичными (родственными) или не идентичными.

Метод Оухтерлони применяют для определения числа антигенов в исследуемом материале, оценки чистоты препаратов при выделении антигенов, для сравнения известных антигенов и антител с неизвестными.

Метод двойной иммунодиффузии применяют и в реакции нейтрализации для выявления токсигенности дифтерийных коринебактерий (стр. 59).

### **в) Метод иммуноэлектрофореза (ИЭФ).**

Это высокочувствительный и специфический качественный метод, позволяющий выявить и различить вещества-антигены, содержащиеся в многокомпонентной системе в низких концентрациях. Метод иммунного электрофореза основан на сочетании электрофореза и преципитации в геле и проводится в два этапа.

*Методика постановки. 1 этап.* Приготовленный на буферном растворе 1-2% расплавленный гель наливают на очищенную и обезжиренную стеклянную пластину, после охлаждения в центре плотного геля вырезают с помощью штампа лунку для антигенов (диаметром 4 мм) и по обе стороны от нее на расстоянии 3-4 см – продольные канавки для преципитирующей сыворотки (40x2 мм).

В лунку вносят исследуемое вещество (смесь антигенов), стеклянную пластину помещают в электрофоретическую камеру и подключают электроды. При электрофорезе отдельные компоненты (антигены) исследуемого вещества распределяются по оси миграции в различных зонах.

*2 этап.* После электрофоретического разделения антигенов в боковые канавки, идущие параллельно линии миграции белков, вносят преципитирующую сыворотку и проводят иммунодиффузию в течение 12-24 часов. Антитела и разделенные электрофорезом антигены диффундируют в геле навстречу друг другу и, образуют дуги преципитации. По их форме (кривизне), числе и положению можно получить представление о составе исследуемой смеси антигенов.

Иммуноэлектрофорез широко применяется как качественный метод для анализа белков в биологических жидкостях, в частности белков сыворотки крови при иммунодефицитных состояниях, цереброспинальной жидкости, мочи, экстрактов из органов, а также для контроля чистоты биологических препаратов.

На практике применяют модификации, представляющие собой комбинации иммуноэлектрофореза с другими методами, например иммуноблотинг, радиоиммуноэлектрофорез и др.

## **2. Реакция нейтрализации токсина антитоксином.**

*Реакциями нейтрализации называются серологические реакции, в которых при взаимодействии биологически активного антигена со специфическими антителами нейтрализуется (снижается) его биологическая активность.*

На практике применяются два типа реакций нейтрализации:

*Реакция нейтрализации токсина антитоксином.* Антигенами в этой реакции выступают белковые токсины бактерий, которые, при взаимодействии с антитоксинами (специфическими антителами), теряют свою биологическую активность.

*Реакция нейтрализации вирусов противовирусной сывороткой.* В этой реакции при взаимодействии с вируснейтрализующими антителами происходит резкое снижение биологической активности вирусов, что выявляется на различных биологических моделях – лабораторных животных, куриных эмбрионах, культурах клеток. Данная реакция рассматривается в разделе «Медицинская вирусология».

*Реакция нейтрализации токсина антитоксином заключается во взаимодействии между экзотоксином (антигеном) и специфической антитоксической сывороткой (антителом – антитоксином), в результате чего образуется комплекс «антigen + антитело», и экзотоксин теряет свои токсические свойства.*

В реакцию нейтрализации могут вступать различные белковые токсины, полностью или частично секрециируемые: столбнячный, дифтерийный, ботулинический, стафилококковый, токсины возбудителей газовой гангрены и др. Токсины могут быть неочищенными – нативными (фильтрат бульонной культуры токсигенных бактерий) и очищенными. Реакцию нейтрализации ставят и с содержащими токсин

исследуемыми материалами, взятыми от больных; перед постановкой теста такой токсин экстрагируют в физиологический раствор.

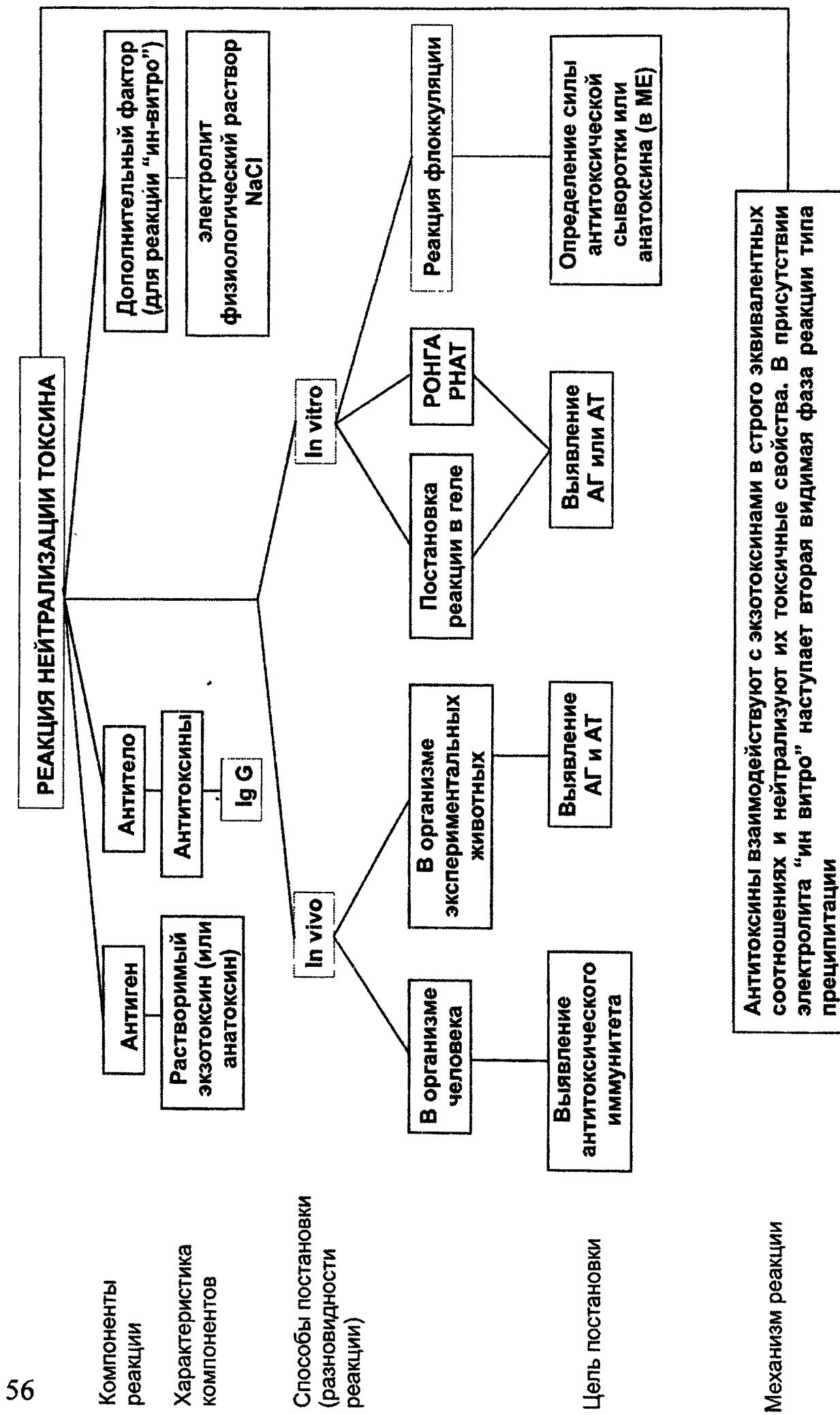
В качестве антигена в реакции нейтрализации может участвовать также и *анатоксин*. Его получают из экзотоксина путем добавления 0,3-0,4% формалина и инкубации в термостате при 37-40°C в течение 28-30 дней. При такой обработке экзотоксин теряет свои токсические свойства, но сохраняет антигенную структуру, а следовательно, и иммуногенность (то есть становится вакциным препаратом). Безвредность анатоксинов проверяют путем введения лабораторным животным.

Второй ингредиент реакции – специфическая антитоксическая сыворотка, содержащая антитела – антитоксины. Ее получают от животных (обычно лошадей), многократно иммунизированных соответствующим анатоксином.

Реакцию нейтрализации ставят *in vivo* и *in vitro*. Ее применяют с диагностическими целями: для выявления в исследуемом материале экзотоксина с помощью известной стандартной диагностической антитоксической сыворотки или для определения наличия антител-антитоксинов с участием известного стандартного диагностикума-токсина. Однако, чаще с помощью реакции нейтрализации определяют степень активности и титр токсинов, анатоксинов или антитоксинов, их измеряют в специальных единицах.

а) Реакция нейтрализации *in vivo* может быть поставлена в двух модификациях – на лабораторных животных и в организме человека.

**Реакция нейтрализации на лабораторных животных.** Для проведения реакции нейтрализации *in vivo* на лабораторных животных исследуемый материал, в котором предполагают присутствие экзотоксина (определяемый антиген) смешивают со специфической антитоксической сывороткой (известные антитела), выдерживают смесь в термостате и затем вводят лабораторным животным (чаще используют мышей или морских свинок). Если произошла реакция нейтрализации (при соответствии экзотоксина и антитоксина), то животные остаются живыми. Контрольным животным вводят тот же исследуемый материал без антитоксической сыворотки, они должны погибнуть от действия экзотоксина. Такие биологические пробы ставят при лабораторной диагностике столбняка, ботулизма, анаэробной раневой газовой инфекции и др.



*Реакции нейтрализации в организме человека.* На принципе реакции нейтрализации токсина антитоксином основаны диагностические кожные пробы Шика и Дика, выявляющие наличие антитоксического иммунитета у детей к дифтерии (проба Шика) и скарлатине (проба Дика). Детям вводят внутркожно (в область предплечья) стандартные малые дозы дифтерийного или скарлатинозного токсина и наблюдают появление или отсутствие воспалительной реакции (покраснение, припухлость) на месте введения. Если в организме имеются соответствующие антитела – антитоксины, произойдет нейтрализация введенного токсина, и воспалительной реакции не будет. В настоящее время эти пробы применяют редко.

### **б) Реакция нейтрализации токсина антитоксином *in vitro***

Существуют различные методы постановки реакции нейтрализации токсина антитоксином *in vitro*: реакция флоккуляции, реакция нейтрализации в геле по Оухтерлони, а также ускоренные методы диагностики – реакция обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА) и реакция нейтрализации антител (РНАТ). В реакции нейтрализации токсина антитоксином выявляют антитела, относящиеся преимущественно к классу IgG.

Реакция флоккуляции наблюдается при соединении в эквивалентных соотношениях экзотоксина (или анатоксина) со специфической антитоксической сывороткой в присутствии электролита, при этом выпадают мелкие хлопья флоккулята. По механизму реакция флоккуляции аналогична реакции преципитации. Образование хлопьев происходит быстрее в пробирке с нейтральной смесью, где количество антитоксина эквивалентно количеству токсина и происходит так называемая «инициальная» флоккуляция, по наступлению которой и учитывают реакцию.

*Постановка опыта определения титра испытуемой антитоксической сыворотки* с помощью реакции флоккуляции (таблица 6). Предварительно по стандартной антитоксической сыворотке с известным количеством антител в 1 мл, измеряемом в международных единицах – МЕ, устанавливают количество Lf (*Limes flocculations*) токсина. 1 Lf токсина – количество токсина (в 1 мл), которое дает инициальную флоккуляцию с 1 МЕ антитоксической сыворотки. В данном примере в 2 мл токсина содержится 40 Lf токсина.

В пять пробирок наливают по 2,0 мл токсина (40 Lf) и возрастающие количества испытуемой антитоксической сыворотки (от 0,2 до 0,6 мл), разведенной 1:10. После инкубации при 45°C в течение 30 мин отмечают пробирку, где раньше всего наступила флоккуляция и, следовательно, имеется соответствие количества токсина количеству международных единиц сыворотки (зона эквивалентности). В пробирках справа от указанной пробирки находятся смеси ингредиентов с преобладанием антитоксина (избыток антител), а в пробирках слева – смеси ингредиентов с превышением антигена (избыток токсина).

*Титром антитоксической сыворотки считается количество МЕ в 1 мл сыворотки.*

Для определения титра испытуемой сыворотки проводится следующий расчет: 2 мл токсина, содержащие 40 Lf, дали инициальную флоккуляцию с 0,4 мл испытуемой сыворотки в разведении 1:10, то есть в этом количестве сыворотки имеется 40 МЕ. Следовательно, в 1 мл неразведенной сыворотки содержится:  $40 : 0,4 \times 10 = 1000$  МЕ/мл, что соответствует титру испытуемой сыворотки.

По такому же принципу проводят титрование антотоксина (по известной антитоксической сыворотке). Силу антотоксина выражают в ЕС – единицах связывания (или иммуногенных единицах – ИЕ): 1 ЕС = 1 Lf.

Таблица 6

*Определение титра антитоксической сыворотки  
в реакции флоккуляции*

№№ пробирок Ингредиенты в мл	1	2	3	4	5
Токсин – 40 Lf в 2 мл	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Испытуемая антитоксическая сыворотка (1:10)	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Пробирки выдерживают на водяной бане при 45°C в течение 30 мин					
Результат:			 + хлопья		
Возможный результат (зарисовать)	-	-	+ хлопья	-	-

**Заключение:**

**Задание.** Учесть результат реакции флоккуляции, рассчитать активность испытуемой антитоксической сыворотки, записать результаты в альбом в виде таблицы.

**Реакция нейтрализации в геле по Оухтерлони** – метод двойной иммуноффузии по Оухтерлони. Эту реакцию ставят для выявления токсигенности чистых культур дифтерийных бактерий (*Corynebacterium diphtheriae*), выделяемых от больных и бактерионосителей.

**Методика постановки.** На поверхность плотной элективной среды для коринебактерий в чашке Петри помещают стерильную полоску фильтровальной бумаги (2,0x8 см), пропитанную антитоксической противодифтерийной сывороткой, содержащей 500 МЕ/мл. По обеим сторонам вдоль бумажной полоски на расстоянии 1,0 см от нее засевают испытуемые штаммы дифтерийной палочки бляшками диаметром 0,8-1,0 см. На этой же чашке проводят посев контрольных культур: заранее токсигенной дифтерийной культуры (положительный контроль) и нетоксигенной дифтерийной культуры (отрицательный контроль).

Результат учитывают через 24 и 48 часов инкубации при 37°C. Если культура является токсигенной, то между полоской бумаги и растущей культурой образуются белые линии преципитации в результате встречной диффузии антител-антитоксинов и продуцируемого культурой токсина. Образующиеся дугообразные линии должны совпадать с линией преципитата контрольной токсигенной культуры (тест на идентичность). У нетоксигенной дифтерийной культуры такие линии отсутствуют.

**Задание.** Зарисовать в альбом опыт определения токсигенности дифтерийных культур по Оухтерлони по демонстрации.

**Модификации реакции нейтрализации токсина антитоксиком – РОНГА и РНАТ.**

С помощью разновидностей РНГА - реакции обратной непрямой гемагглютинации и реакции нейтрализации антител возможно значительно ускорить определение неизвестных антигенов (в нашем примере дифтерийного токсина) или антител-антитоксинов в сыворотке крови, так как результат учитывают а через 2-3 часа.

**Реакция обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА).** Ее ставят с эритроцитарным антителенным диагностиком, который представляет собой взвесь отмытых эритроцитов, нагруженных специфическими

иммуноглобулинами, в нашем примере противодифтерийными антителами. С помощью этой реакции можно быстро обнаружить дифтерийный токсин в исследуемом материале – культуральной жидкости после выращивания в ней дифтерийных бактерий.

**Методика постановки РОНГА.** Реакцию ставят на 96-луночном полистероловом планшете с круглодонными лунками, в которые вносят двукратные разведения культуральной жидкости в физиологическом растворе от 1:8 до 1:512 в объеме 0,1 мл, а затем в каждую лунку добавляют по 0,1 мл эритроцитарного антителенного диагностикума. В данном опыте обязательны контроли:

- культуральная жидкость токсигенного штамма (положительный контроль) – К1;
- культуральная жидкость нетоксигенного штамма (отрицательный контроль) – К2;
- контроль эритроцитарного антителенного диагностикума – К3.

Учет опыта проводят через 2 часа инкубации при 37°C. Визуальные результаты реакции аналогичны РНГА. При положительной реакции (наличии дифтерийного токсина в культуральной жидкости) в лунках образуется осадок эритроцитарного антителенного диагностикума в виде «зонтика», а при отрицательной реакции – компактный осадок диагностикума в виде диска малого диаметра - «пуговки».

В РОНГА определяют титр токсина в исследуемом материале – максимальное разведение изучаемой культуральной жидкости, которое вызывает формирование «зонтика».

РОНГА применяют в диагностике ботулизма для определения серотипа ботулинического токсина (A, B или E). Сначала ее ставят с эритроцитарным антителенным диагностикумом, нагруженным поливалентными противоботулиническими антителами, при положительном результате уточняют серотип ботулотоксина с помощью эритроцитарных диагностикумов, нагруженных моноспецифическими противоботулиническими антителами против серотипов A, B или E.

**Задание.** Учесть опыт РОНГА, зарисовать результаты реакции (таблица 7), определить титр дифтерийного токсина в исследуемом материале.

Таблица 7

**РОНГА для титрования дифтерийного токсина  
в исследуемом материале**

Разведение исследуемой культуральной жидкости	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>
Результат (рисунок)	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●

Заключение:

**Реакция нейтрализации антител (РНАТ)** является разновидностью РНГА и позволяет быстро выявить неизвестный антиген (в нашем примере дифтерийный токсин) или антитела. В реакции участвуют:

- культуральная жидкость, которая, возможно, содержит дифтерийный токсин (определяемый антиген);
- противодифтерийная антитоксическая стандартная сыворотка (известные антитела);
- эритроцитарный антигенный диагностикум, нагруженный дифтерийным токсином (антигеном той же специфичности, что и искомый).

**Методика постановки РНАТ.** Готовят последовательные двукратные разведения культуральной жидкости в физиологическом растворе NaCl и разливают в лунки по 0,1 мл, далее в каждую лунку добавляют антитоксическую противодифтерийную сыворотку (по 2 гемагглютинирующие единицы в объеме 0,1 мл) и выдерживают при 37°C 30 минут, чтобы произошла нейтрализация токсина. Для выявления нейтрализации в лунки вносят эритроцитарный диагностикум, нагруженный дифтерийным токсином, и инкубируют еще 2 часа (таблица 8).

В РНАТ ставят контроли: положительный и отрицательный контроли с культуральной жидкостью заведомо токсигенного и нетоксигенного штаммов, контроль эритроцитарного антигенного диагностикума (эритроциты, нагруженные токсином) и контроль противодифтерийной антитоксической сыворотки (стандартная антитоксическая сыворотка + эритроцитарный антигенный диагностикум).

Если культуральная жидкость содержит токсин, то он связывает специфические антитела антитоксической сыворотки, и добавленный позже эритроцитарный диагностиком, нагруженный тем же токсином, не вступит в реакцию и гемагглютинация не произойдет. В лунках образуется осадок эритроцитов в виде компактного диска- «пуговки», что указывает на положительную реакцию нейтрализации антител. При отсутствии в культуральной жидкости дифтерийного токсина, специфические антитела антитоксической сыворотки остаются свободными и вступят в реакцию с эритроцитарным диагностиком, вызывая гемагглютинацию в лунках (образуется осадок в виде «зонтика»), что свидетельствует об отрицательной реакции нейтрализации антител.

В РНАТ определяют *титр токсина* в исследуемом материале – максимальное разведение изучаемой культуральной жидкости, которое вызывает формирование «пуговки».

**Задание.** Учесть РНАТ, зарисовать результаты реакции (таблица 8), определить титр дифтерийного токсина в исследуемой культуральной жидкости. Рассмотреть график 2.

Таблица 8  
*РНАТ для титрования дифтерийного токсина  
в исследуемом материале*

Разведение исследуемой культуральной жидкости	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	K <sup>+</sup>	K <sup>-</sup>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>
Результат (рисунок)	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●

**Заключение:**

## **Контрольные вопросы по теме занятия**

1. Что представляет собой реакция преципитации? Охарактеризуйте ингредиенты и механизм реакции, назовите способы постановки, практическое применение.
2. Опишите принцип постановки реакции кольцепреципитации и ее видимый результат. Что понимают под титром реакции? Практическое применение.
3. Опишите принцип реакции радиальной диффузии в геле, опишите видимый результат. Практическое применение.
4. Реакция встречной иммунодиффузии в геле по Оухтерлони, принцип постановки, видимый результат. Практическое применение.
5. Понятие об иммуноэлектрофорезе, принцип постановки, видимый результат. Практическое применение.
6. Укажите сходство и различие реакций агглютинации и преципитации.
7. В чем состоит сущность реакции нейтрализации токсина антитоксином? Назовите методы постановки реакции нейтрализации.
8. Что такое анатоксин? Опишите принцип получения и применения.
9. Опишите методику постановки реакции флоккуляции, ее практическое применение.
10. В каких единицах измеряется сила антитоксической сыворотки, сила токсина и анатоксина?
11. Какие Вы знаете модификации реакции нейтрализации с использованием эритроцитарных диагностикумов? Опишите реакцию обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА) и реакцию нейтрализации антител (РНАТ) на примере обнаружения дифтерийного токсина.

## **Занятие № 15**

**Тема: Серологические реакции (продолжение):  
реакции с участием комплемента и реакции с использованием  
меченых антител – МИФ, ИФА, РИА**

**План занятия:**

1. Реакции с участием комплемента:
  - a) Реакции иммунного лизиса: реакция иммунного гемолиза, радиального гемолиза и реакция бактериолиза.
  - b) Реакция связывания комплемента (РСК):
    - учет опыта титрования комплемента;
    - постановка основного опыта РСК.
    - реакция радиального гемолиза эритроцитов в геле (вариант РСК).
  - c) Реакция иммобилизации.
2. Серологические реакции с использованием меченых антител:
  - a) Метод иммунофлюоресценции (МИФ);
  - б) Иммуноферментный анализ (ИФА);
  - в) Радиоиммунный анализ (РИА).
  - г) Иммуноблотинг;

**Методические указания к выполнению практического занятия**

Рассмотреть теоретический материал – тема 5 (вопросы 21-28).

При разборе серологических реакций с участием комплемента напомнить студентам пути активации комплемента, обратить внимание, что в этих реакциях учитываются его способность присоединяться к комплексу {Аг-Ат} и вызывать лизис корпскулярных антигенов мембраноатакующим комплексом, образующимся при активации комплемента.

Рассмотреть серологические реакции с мечеными антителами (или антигенами), которые по чувствительности и специфичности превосходят традиционные реакции и применяются для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний разной этиологии. Ознакомить студентов с принципами постановки ИФА, МИФ и РИА и иммуноблотинга.

## **1. Реакции с участием комплемента.**

Среди серологических реакций выделяют группу тестов, проекающих при обязательном участии системы комплемента (как дополнительного фактора) – это так называемые лизические реакции (реакции иммунного лизиса и связывания комплемента) и реакции с участием компонентов системы комплемента (реакции иммобилизации и иммунного прилипания).

Комплемент – это сложная защитная система сывороточных белков. Она обладает разнообразной биологической активностью – лизической (лизирует бактерии и чужеродные эукариотические клетки), повышает воспалительный ответ, участвует в анафилактических реакциях, усиливает фагоцитоз (опсонизация и хемотаксис), иммунное прилипание, а также взаимосвязана с фибринолитической и кининовой системами крови, влияя на свертываемость крови.

### **а) Реакции иммунного лизиса**

*Иммунный лизис – это разрушение жизнеспособных клеток (корпускулярных антигенов), в присутствии специфических антител и системы комплемента.* В зависимости от участвующих антигенов различают реакции гемолиза, бактериолиза, спирохетолиза и др. В реакциях иммунного лизиса участвуют антитела, относящиеся преимущественно к классам IgM и IgG.

**Реакция иммунного гемолиза** – лизис эритроцитов в присутствии специфических антител (гемолизинов) и комплемента. При образовании комплекса «антigen (эритроциты) + антитело (гемолизины)» происходит присоединение компонентов комплемента (активация по классическому пути). Сформировавшийся мембраноатакующий комплекс воздействует на эритроциты, в мембране эритроцитов образуются поры и наступает гемолиз.

**Методика постановки.** Ингредиентами реакции иммунного гемолиза являются:

- *эритроциты барана*: кровь барана дефибринируют, трижды отмывают физиологическим раствором путем центрифugирования, из осадка эритроцитов готовят 3% взвесь;
- *гемолитическая сыворотка*: ее получают от кролика, иммунизированного эритроцитами барана (4 – 6 раз через день), инактивируют при 56°C 30 минут (для разрушения собственного комплемента),

определяют титр гемолизинов (можно использовать лиофильно высушенную гемолитическую сыворотку);

- **комплемент:** свежая или лиофилизированная сыворотка морской свинки в разведении 1:10.
- **эритроциты собаки** (или другого животного) для контроля специфичности антигена готовят так же, как взвесь эритроцитов барана.

Реакцию ставят по следующей схеме (таблица 9). При положительной реакции наблюдается гемолиз: жидкость в пробирке становится ярко-розового цвета и прозрачной («лаковая кровь»), при отрицательной реакции – жидкость в пробирке бесцветная, на дне – осадок эритроцитов.

Реакцию иммунного гемолиза применяют в реакции связывания комплемента в качестве индикаторной (2-ой) системы (стр. 68, 70).

**Задание:** Учесть реакцию иммунного гемолиза и записать результаты опыта. Обратите внимание, что действие гемолитической сыворотки строго специфично – она вызывает гемолиз только тех эритроцитов, которые были взяты для иммунизации животного.

Таблица 9

*Реакция иммунного гемолиза*

№№ пробирок	1	2	3	4	5
Ингредиенты в мл	Опыт	Контроли			
Эритроциты барана (антиген), 3% взвесь	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Гемолитическая сыворотка против эритроцитов барана (антитело),	0,5	-	0,5	0,5	-
Комплемент (сыворотка морской свинки)	0,5	0,5	-	0,5	-
Эритроциты собаки, 3% взвесь	-	-	-	0,5	-
Физиологический раствор	-	0,5	0,5	-	1,0
Инкубация при 37° в течение 30 минут					
Результат:					

Заключение:

**Реакция радиального гемолиза эритроцитов в геле** является вариантом иммунного гемолиза. В теплый агаровый гель вносят комплемент и эритроциты барана. В застывшей пластине геля вырезают лунки, в которые наливают гемолитическую сыворотку. Вокруг лунок в результате радиальной диффузии антител-гемолизинов образуется зона гемолиза, радиус гемолиза прямо пропорционален титру сыворотки.

Реакция позволяет определять активность комплемента или гемолитической сыворотки.

**Реакция бактериолиза** – лизис бактерий в присутствии специфических антител-бактериолизинов и комплемента.

Иммунный лизис бактерий можно наблюдать как *in vivo*, в организме животного (воспроизведение этого явления в эксперименте называют феноменом Исаева-Пфейффера), так и *in vitro*, в пробирке. Как защитная реакция, бактериолиз наиболее выражен при холере, тифо-паратифозных и сальмонеллезных инфекциях, а также при заболеваниях, вызываемых спирохетами (спирохетолиз).

Реакция бактериолиза применяется редко, потому что многие бактерии, особенно грамположительные, не подвергаются лизису. Реакцию применяют в диагностике лептоспироза, иногда холеры.

**Методика постановка реакции бактериолиза *in vitro*.** Ингредиент: живые бактерии, специфические к ним антитела (иммунная сыворотка), комплемент.

В опытную пробирку вносят взвесь живых бактерий, специфическую иммунную сыворотку и комплемент, в контрольную пробирку – те же бактерии, нормальную сыворотку (без специфических антител) и комплемент. После инкубации в течение 2 часов при 37°C из каждой пробирки делают высеивы по 0,1 мл на чашки Петри с мясо-пептонным агаром. Опыт учитывают после суточной инкубации. На чашке с высевом из опытной пробирки колоний должно быть значительно меньше, чем в контроле (или они отсутствуют).

**Титр реакции бактериолиза** – это максимальное разведение специфической иммунной сыворотки, при котором наблюдается лизис данного вида микроорганизмов в присутствии комплемента.

Определяют титр сыворотки при серодиагностике лептоспироза с помощью метода микроагглютинации и лизиса.

**Задание.** Учесть опыт бактериолиза *in vitro*, оценить результаты и занести в альбом.

## **б) Реакция связывания комплемента**

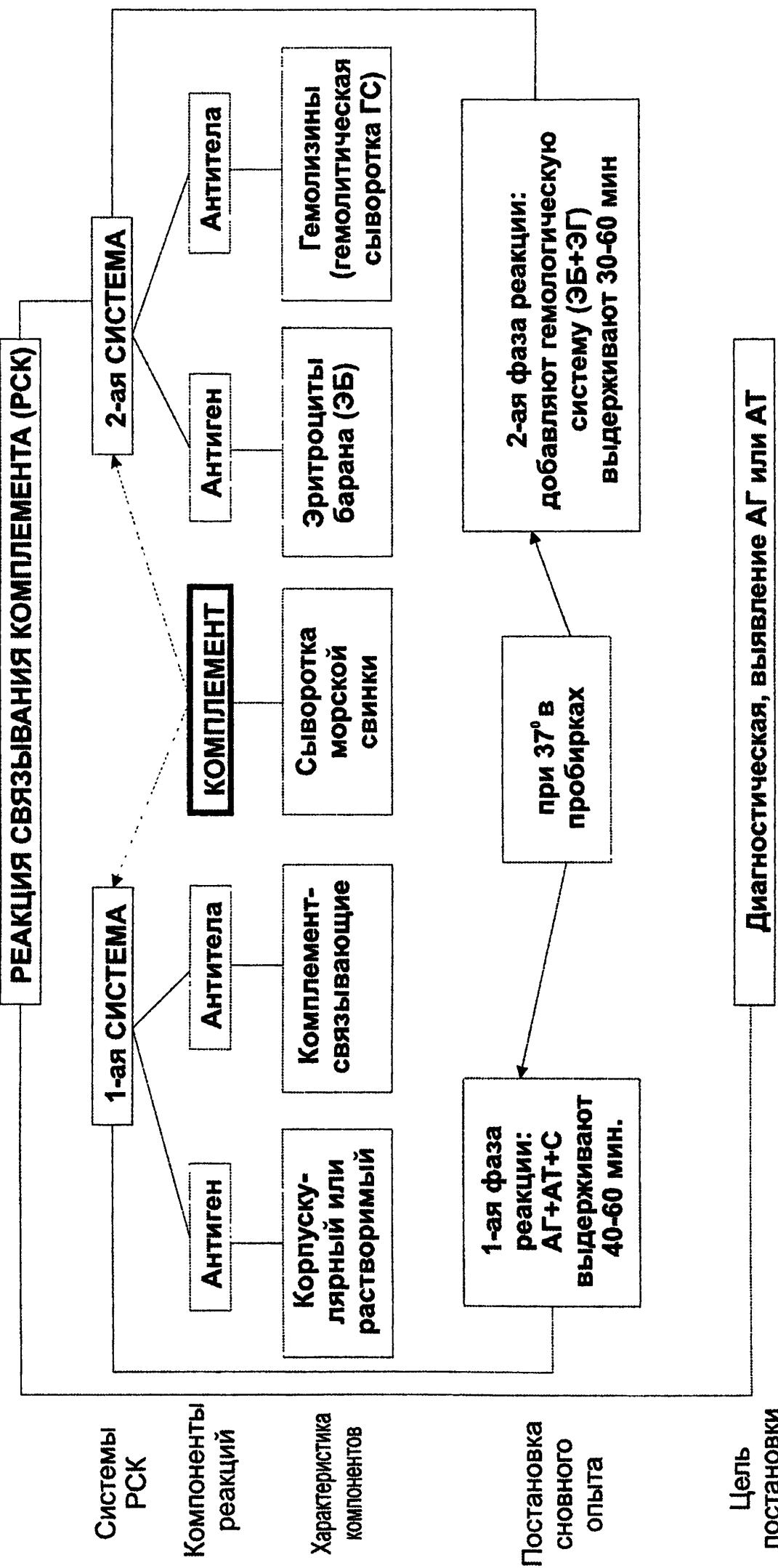
*Реакция связывания комплемента (РСК) – основана на способности комплемента адсорбироваться на любом комплексе «антиген + антитело». РСК – это сложная многокомпонентная серологическая реакция, в которой участвуют две системы «антиген + антитело»: основная и индикаторная, а также комплемент. Соответственно, и сама реакция осуществляется в два этапа (стадии). В РСК выявляют антитела, относящиеся преимущественно к классу IgG, а также IgM.*

*Первая (основная, опытная) система* состоит из определяемого антитела (или антигена) и известного антигена (или антитела), к ним добавляют комплемент. Если антиген и антитело комплементарны друг другу, то образуется комплекс «антиген + антитело», к которому присоединяется комплемент, причем процесс связывания комплемента невидим.

Чтобы выявить наличие или отсутствие связывания комплемента и тем самым подтвердить соответствие антигена и антитела в первой системе или их несоответствие, в РСК участвует *вторая – индикаторная (гемолитическая) система* {Аг-Ат}: «эритроциты барана + гемолитическая сыворотка». Если в первой системе образовался комплекс «антиген + антитело», комплемент с ним связывается и тогда при добавлении индикаторной системы гемолиза не произойдет. Задержка гемолиза указывает на положительную РСК (в пробирке образуется осадок эритроцитов с бесцветной жидкостью над ним).

Если же в первой системе нет соответствия между определяемым и известным ингредиентом, комплекс «антиген + антитело» не образуется, комплемент остается свободным в растворе и при добавлении второй (индикаторной) системы связывается с комплексом «эритроциты барана + гемолитическая сыворотка», вызывая гемолиз эритроцитов. Таким образом, наличие гемолиза (в пробирке - «лаковая кровь») свидетельствует об отрицательном результате РСК.

**Задание:** рассмотреть граф 3.



При соответствии антигена и антитела в 1-й системе они образуют комплекс, к которому 1-ой фазе реакции присоединяется компонент. Связавшийся комплекс не может вызывать гемолиза во 2-ой фазе реакции. Наступает положительная реакция - задержка гемолиза.

Если же соответствия антигена и антитела нет, комплекс ( $A\Gamma + A\Gamma$ ) не образуется, компонент в 1-ой фазе реакции остается свободным и вызывает иммунный гемолиз во 2-ой фазе реакции, присоединяется к комплексу ( $\text{ЭБ} + \text{ЭГ}$ ). Наступает отрицательная реакция - гемолиз.

**Ингредиенты РСК.** В реакции участвуют две системы, опытная и индикаторная. В каждой образуется комплекс {Аг-Ат}, дополнительным неспецифическим компонентом является комплемент, добавляемый к первой системе. Результат реакции зависит от того, к какой системе присоединяется комплемент.

1. Опытная (основная) система содержит:

- исследуемую сыворотку (инактивированную путем прогревания при 56°C в течение 30 минут для разрушения собственного комплемента);
- комплемент (предварительно оттитрованный и взятый в рабочей дозе);
- известный стандартный антиген (корпускулярный или растворимый, оттитрованный на отсутствие антикомплементарной активности);

2. Индикаторная (гемолитическая) система состоит из смеси равных объемов

- гемолитической сыворотки (взятой в тройном титре) и
- 3% взвеси эритроцитов барана.

Смесь выдерживают в термостате при 37° в течение 30 минут для сенсибилизации эритроцитов гемолизинами.

При постановке РСК необходимо соблюдение точных количественных соотношений между ингредиентами реакции, поэтому перед постановкой основного опыта проводится трудоемкая работа по их титрованию.

**Титрование комплемента.** Ответственным моментом реакции является титрование комплемента (реакцию проводят на холода для повышения чувствительности метода). В качестве примера представлена схема титрования комплемента (таблица 10). Если взять в РСК количество комплемента, значительно превышающее рабочую дозу, то всегда будет отрицательный результат, так как комплемента будет в избытке хватать и на первую (основную, невидимую) и на вторую (индикаторную) системы, и в итоге будет наблюдаться гемолиз. И, наоборот, недостаток комплемента (меньше рабочей дозы) всегда приведет к положительному результату (отсутствию гемолиза). Поэтому необходимо точно рассчитывать титр и рабочую дозу комплемента.

*За титр комплемента принимают содержимое пробирки с наименьшим количеством комплемента, которое вызывает полный*

гемолиз эритроцитов в присутствии гемолитической сыворотки. В основной опыт РСК берут рабочую дозу комплемента, которая должна превышать его титр на 20-30%.

**Задание.** Ученье опыт титрования комплемента по демонстрации, определить титр комплемента и его рабочую дозу, заполнить таблицу 10 .

Таблица 10

**Схема титрования комплемента**

№№ пробирок	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Ингредиенты в мл</b>								
Комплемент (1:10)	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	-
Физиологический раствор	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Инкубация при 0-4°C в течение 18 часов								
Результат (зарисовать):								

**Заключение:**

**Методика постановки основного опыта РСК**

Определив титр и рабочую дозу участвующих в опыте ингредиентов, ставят основной опыт РСК (таблица 11). После внесения в пробирку всех ингредиентов проводят первую фазу инкубации при температуре 37°C в течение 30 минут (или на холоде при 0-4°C в течение 18-20 часов, что повышает чувствительность реакции).

Вторую фазу ставят, добавляя в пробирки с первой системой сенсибилизированную гемолитическую систему (эритроциты барана и гемолитическую сыворотку), пробирки встряхивают и инкубируют при 37°C 20-30 минут.

**Положительная реакция** проявляется в виде задержки гемолиза, Степень задержки гемолиза оценивают по степени интенсивности гемолиза и/или величине осадка эритроцитов и выражают в плюсах:

«+ + + +» - резко положительная реакция – полная задержка гемолиза: эритроциты оседают на дно пробирки, жидкость над осадком бесцветна; «+ + +» и «+ +» - положительная реакция – неполная задержка гемолиза: имеется осадок эритроцитов, жидкость окрашена в розовый цвет, более интенсивный при «+ +»; «+» - слабо положительная реакция – неполный гемолиз: незначительный осадок эритроцитов, жидкость окрашена в розовый цвет.

*Отрицательная реакция* – полный гемолиз – жидкость в пробирке ярко-розового цвета (лаковая кровь), осадок отсутствует.

Таблица 11

*Основной опыт реакции связывания комплемента*

№№ пробирок Ингредиенты в мл	1	2	3	4	5	6	7
	опыт	контроли					
Испытуемая сыворотка в разведении 1:5	0,5	-	-	0,5	-	-	-
Антитела	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-
Комплемент, рабочая доза «+» сыворотка (заведомо больного)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
«-» сыворотка (здорового)	-	0,5	-	-	-	-	-
Физиологический раствор	-	-	-	0,5	0,5	1,0	1,5
Пробирки инкубируют при 37° в течение 30 минут							
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Инкубация при 37° в течение 30 минут							
Результат (зарисовать):							

Заключение:

**Задание.** Учесть основной опыт РСК, записать результат опыта в альбом и объяснить, почему произошел или не произошел гемолиз в каждой из семи пробирок.

Вышеуказанная схема постановки РСК является полноценной, так как в ней представлены все варианты контролей.

При подозрении на определенное инфекционное заболевание часто определяют титр антител в РСК. Для выполнения реакции готовят двукратные возрастающие разведения исследуемой сыворотки и ставят два контроля – положительный – с сывороткой заведомо больного и отрицательный – с сывороткой заведомо здорового человека.

Титр РСК – это максимальное разведение исследуемой сыворотки, при котором наблюдается положительный результат в виде задержки гемолиза осадка эритроцитов.

Для подтверждения предполагаемого диагноза титр антител должен быть равным или превышающим диагностический.

РСК является высокочувствительной и специфичной реакцией с широким диапазоном применения. Она используется в серодиагностике инфекционных заболеваний различной этиологии: бактериальных, вирусных, микоплазменных, риккетсиозных, микозах и др. В последнее время роль РСК снижается в связи с появлением современных высокочувствительных серологических экспресс-методов диагностики с применением меченых антител и молекулярно-генетических методов.

Реакция радиального гемолиза в геле является вариантом РСК. В незастывший агаровый гель добавляют комплемент и эритроциты барана, на которых сорбирован определенный антиген (вируса гриппа, краснухи и др.). В пластине застывшего агара вырезают лунки, куда вносят исследуемую сыворотку. При наличии в сыворотке антител к данному антигену вокруг лунок появляется зона радиального гемолиза, радиус которого прямо пропорционален титру антител в сыворотке.

Реакция радиального гемолиза применяется в серодиагностике вирусных инфекций, она проста в постановке, нечувствительна к вирусным ингибиторам, позволяет титровать испытуемые сыворотки крови по диаметру зоны гемолиза, не прибегая к серийным разведениям.

## в) Реакция иммобилизации

Реакция иммобилизации позволяет выявить наличие специфических антител-иммобилизинов в испытуемой сыворотке. В качестве антигена используют взвесь живых микробов с активной подвижностью, например возбудителя сифилиса (*Treponema pallidum*) или холеры (*Vibrio cholereae*).

Для постановки реакции смешивают испытуемую сыворотку крови, культуру возбудителя и комплемент. После инкубации готовят нативные препараты «раздавленная капля» и в темнопольном микроскопе подсчитывают количество подвижных и неподвижных микробных клеток. Тест считается положительным, если процент иммобилизации выше 50%, сомнительным при 30-50% и отрицательным – ниже 20%. Контроли ставят с сывороткой здорового человека и с инактивированным комплементом.

Реакция имеет ограниченное применение и используется в диагностике сифилиса и, иногда, холеры.

## **2. Серологические реакции с использованием меченых антител или антигенов**

Молекулы иммуноглобулинов способны прочно соединяться с некоторыми химическими веществами (метками), при этом они не теряют свою антителенную специфичность и способность связываться с антигеном. В качестве метки используют:

- красители, флюoresцирующие при облучении их коротковолновым светом (ультрафиолетовым, сине-фиолетовыми лучами), например изотиоционат флюоресцеина;
- молекулы фермента, главным образом пероксидазу хрена и щелочную фосфатазу;
- радиоактивные изотопы, наиболее часто используют радиоактивный йод ( $^{125}\text{I}$  или  $^{131}\text{I}$ ).

В некоторых серологических реакциях метят молекулы антигенов, а не антител. Различают: метод иммунофлюоресценции (МИФ), иммуноферментный анализ (ИФА) и радиоиммунологический анализ (РИА).

Реакции с меченными антителами или антигенами имеют в настоящее время широкое распространение, они по чувствительности значительно превышают традиционные серологические реакции и могут применяться в диагностике инфекционных заболеваний различной этиологии. В принципе, при наличии диагностических тест-систем можно определить антигены любого возбудителя и антитела к ним.

### **а) Метод иммунофлюоресценции (МИФ)**

Метод иммунофлюоресценции основан на использовании иммунных сывороток, в которых специфические антитела конъюгированы с флюорохромными красителями. Такими сыворотками обрабатывают микропрепараты, которые предположительно содержат искомые антигены (микроорганизмы), и затем изучают их в люминесцентном микроскопе. При соответствии между антигеном и люминесцирующей сывороткой образуются комплексы {антigen + антитело}, их облучение УФ- или сине-фиолетовыми лучами определенной длины волны в люминесцентном микроскопе вызывает яркое свечение комплекса. Используя иммерсионный объектив, обычно выявляют люминесцирующие по периферии микроорганизмы с типичной морфологией. Все прочие объекты на микропрепарate, например, клетки ткани организма-хозяина, другие микроорганизмы, которые не взаимодействуют с иммунной люминесцирующей сывороткой, остаются неокрашенными и создают темный (черный) фон

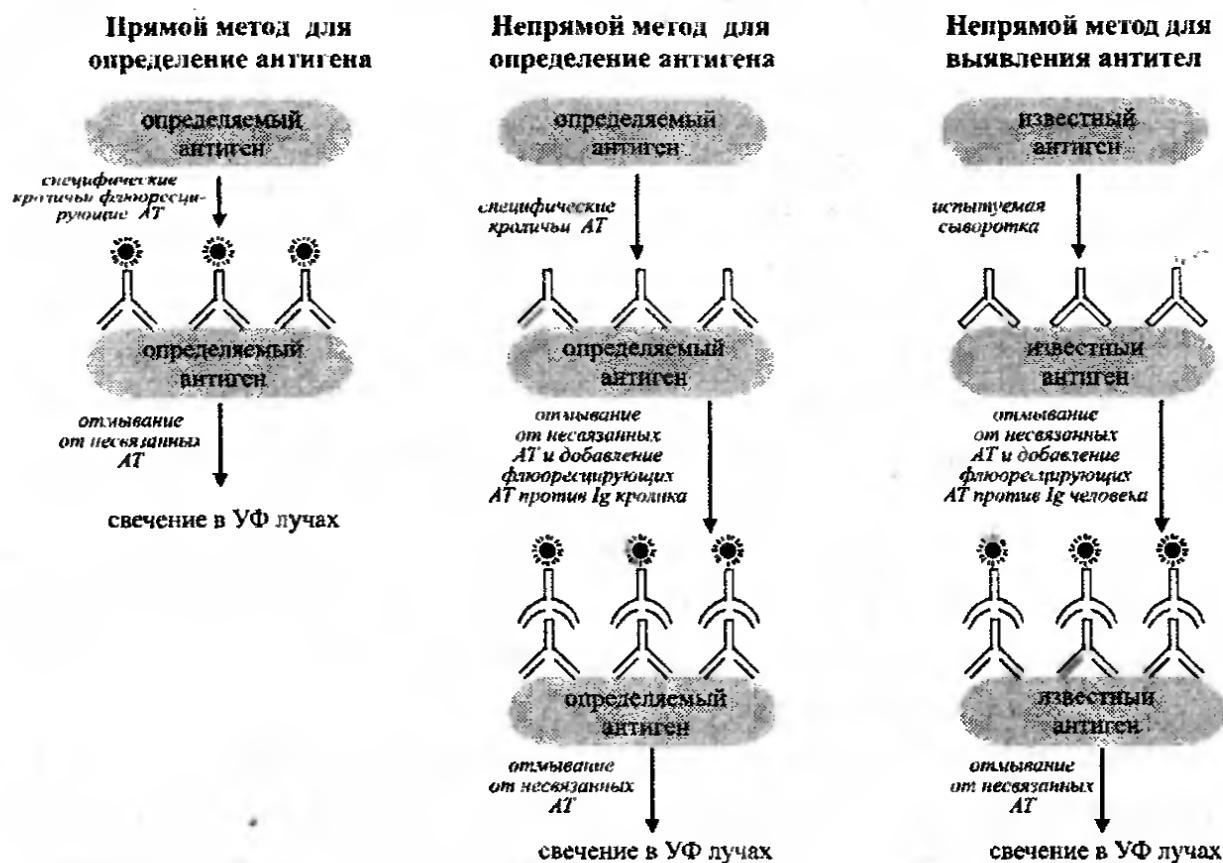
Иммунофлюоресцентный метод сочетает морфологическое исследование с серологическим и позволяет быстро (за 1-2 часа) обнаружить, идентифицировать и даже определить концентрацию различных микробных антигенов в исследуемом материале, особенно в зараженных клетках и тканях. Возможно применение данного метода и для обнаружения антител.

Люминесцирующие (флюоресцирующие) сыворотки готовят из иммунных диагностических сывороток, которые чаще всего получают путем иммунизации кроликов, (можно иммунизировать и других животных). Из сывороток выделяют и концентрируют глобулиновую фракцию, содержащую специфические антитела, или применяют моно-клональные антитела, получаемые путем гибридомной технологии. Антитела конъюгируют с флюорохромным красителем, при этом титр антител значительно снижается. Чаще всего используют флюоресцеинизотиоционат (ФИТЦ), который в люминесцентном микроскопе дает ярко-зеленое свечение.

При микробиологических исследованиях используют прямой и непрямой методы иммунофлюоресценции (Рисунок 6).

Рис. 6.

## Иммунофлюоресценция



**Прямой МИФ.** Готовят препарат, который, возможно, содержит исследуемые антигены (мазок, отпечаток или срез из зараженных тканей, органов, крови, мокроты и др.). Препарат фиксируют жидким фиксатором, обрабатывают (окрашивают) специфической люминесцирующей антимикробной сывороткой 15-30 минут во влажной камере. Тщательно отмывают препарат от несвязавшихся люминесцирующих антител и высушивают. Готовый микропрепарат рассматривают в люминесцентном микроскопе, возбуждая свечение флюорохромного красителя в комплексе {антigen + меченое антитело} с помощью волны света строго определенной длины. Сияющие ярко-зеленые изображения микроорганизмов свидетельствуют об образовании иммунных комплексов, что позволяет их идентифицировать (положительный результат). Если виден лишь черный фон или неспецифическая люминесценция, дают отрицательный ответ.

Прямой метод используют для быстрого обнаружения (индикации) антигена, он технически прост и специфичен, но по коммерческим соображениям не всегда может быть применен, так как для выполнения этого метода требуется большой набор различных диагностических люминесцирующих сывороток, приготовление которых - сложный и

дорогостоящий процесс. Поэтому вместо прямого метода обычно используют более трудоемкий непрямой метод.

**Непрямой МИФ.** Микропрепарат, приготовленный и фиксированный как в прямом методе, сначала обрабатывают обычной специфической, не меченой диагностической сывороткой, полученной путем иммунизации кролика. После инкубации мазок отмывают буферным раствором от не связавшихся антител, окрашивают люминесцирующей антиглобулиновой сывороткой против глобулинов кролика, инкубируют во влажной камере и снова промывают. При люминесцентной микроскопии будут видны светящиеся изображения антигенов, если они соответствуют диагностической иммунной сыворотке, так как в этом случае к комплексу {антigen + иммунная кроличья сыворотка} присоединяется антikроличья люминесцирующая сыворотка, которая и обеспечивает зеленое свечение.

Следовательно, при непрямом методе иммунная диагностическая кроличья сыворотка является антителом для определяемого антигена и одновременно антигеном для антиглобулиновой люминесцирующей сыворотки против глобулинов кролика.

Антиглобулиновые сыворотки получают путем иммунизации одного вида животного (обычно крупного) сывороточным белком другого вида животного. Например, осла иммунизируют иммуноглобулиновой фракцией сыворотки кролика и получают ослиную антиглобулиновую сыворотку против глобулинов кролика, которую конъюгируют с люминесцирующим красителем. На таком же принципе основано получение люминесцирующей антиглобулиновой сыворотки против глобулинов человека.

Непрямой метод, хотя и более сложен по технике, но отличается высокой специфичностью, а главное, для определения разных антигенов достаточно иметь одну люминесцирующую антиглобулиновую сыворотку – против глобулинов кролика.

Непрямой МИФ дает возможность *выявления антител в исследуемых сыворотках человека*. Для этого готовят микропрепарат с эталонными (известными) микроорганизмами, исследуемую сыворотку больного наносят на мазок, инкубируют, отмывают, а затем на этот препарат наносят люминесцирующую антиглобулиновую сыворотку против глобулинов человека. Появление яркого свечения эталонных микроорганизмов указывает на наличие соответствующих антител в исследуемой сыворотке. Например, так осуществляется серодиагностика

сифилиса (одна из подтверждающих серологических реакций).

Метод иммунофлюоресценции (обе его модификации) широко применяется для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний различной этиологии.

**Задание.** Зарисовать в альбом схематическое изображение прямого и непрямого иммунофлюоресцентного метода.

### **б) Иммуноферментный анализ**

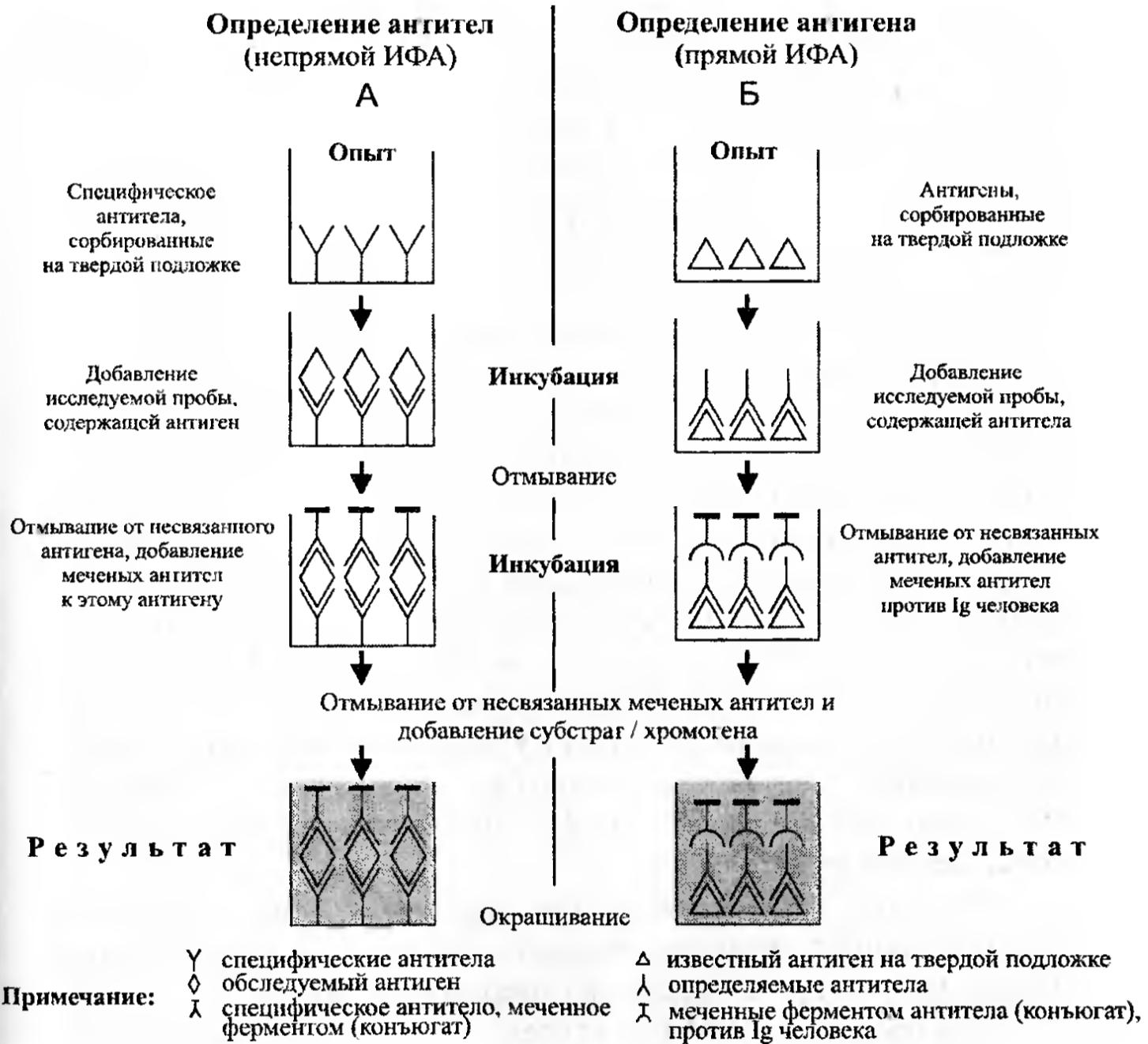
**Иммуноферментный анализ (ИФА)** – один из широко применяемых и наиболее чувствительных серологических методов, пределы его чувствительности позволяют выявлять искомые антигены или антитела в минимальных концентрациях.

ИФА основан на использовании антител или антигенов, меченых ферментами (в медицинской литературе часто встречается его английская аббревиатура **ELISA** – Enzyme-linked immunosorbent assay). В качестве метки применяют ферменты пероксидазу, щелочную фосфатазу или  $\beta$ -галактозидазу. Для получения видимого результата добавляют субстрат и хромоген. Продукты, образуемые при взаимодействии фермента и субстрата, окисляют хромоген, который приобретает цветную окраску. Интенсивность окраски реакции определяют при помощи специальных спектрофотометров (ИФА-ридеров), измеряющих оптическую плотность окрашенных продуктов реакции, она прямо пропорциональна количеству образовавшихся иммунных комплексов.

Методы ИФА непрерывно совершенствуются и модифицируются, имеются стандартные тест-системы для диагностики инфекционных заболеваний разной этиологии с подробными инструкциями по выполнению всех этапов исследования. Наиболее часто используется твердофазный иммуноферментный анализ в разных модификациях в зависимости от целей исследования. Для качественного исследования применяют прямой «сэндвич»-метод и непрямой, для количественного определения антигенов или антител используют конкурентный метод. Для твердофазного метода применяют 96-луночные полистероловые планшеты, полистероловые шарики и нитроцеллюлозные полоски (карточки-гребешки и др.).

Рис. 7

### Твердофазный иммуноферментный анализ



## Прямой метод ИФА («сэндвич-метод») для обнаружения антигена

В нем используют специфические антитела против искомого антигена, сорбированные на твердой фазе (полистероле).

**Постановка опыта.** В плоскодонных лунках полистероловых пластин сорбируют специфические антитела к определяемому антигену, они прочно прикрепляются ко дну и стенкам лунки и не удаляются при отмывании. В эти же лунки вносят исследуемый антиген. При инкубации на твердой фазе образуется комплекс {Ат-Аг}. После инкубации лунки несколько раз промывают буферным раствором для удаления не связавшихся ингредиентов. Затем в лунки вносят меченные ферментом антитела, называемые конъюгатом, против искомого антигена. Полистероловые пластины вновь инкубируют и затем тщательно промывают лунки для удаления не связавшегося конъюгата. Образуется комплекс {АТ-Аг-Ат<sup>фермент</sup>}. Далее в лунки вносят смесь субстрата с хромогеном. При расщеплении ферментом субстрата образуются соединения, окисляющие хромоген и он из бесцветной формы переходит в окрашенную, что указывает на положительную реакцию. Например, для фермента пероксидазы субстратом является пероксид водорода, а хромогеном 5-аминосалициловая кислота (можно применять и другие хромогены). Пероксидаза разлагает  $H_2O_2$  на воду и атомарный кислород, который окисляет 5-аминосалициловую кислоту и она приобретает коричневую окраску, учитываемую визуально. Степень интенсивности окраски содержимого лунок указывает на количество образовавшихся комплексов {Аг-Ат}. Точный результат определяют с помощью спектрофотометра.

При отрицательной реакции цвет хромогена в лунках не меняется, так как внесенные в лунки ингредиенты не вступили во взаимодействие и были удалены при промывании буферным раствором.

При постановке ИФА ставят следующие контрольные тесты: положительный и отрицательные контроли; контроль конъюгата; контроль хромоген-субстратной смеси.

Основной недостаток прямого метода – необходимость иметь множество конъюгатов (меченых ферментом антител) разной специфичности. Подобно люминесцирующим сывороткам, конъюгаты готовят из моноклональных антител или иммуноглобулинов, полученных путем многократной иммунизации кроликов возбудителями

бактериальных и вирусных инфекций. Моноклональные антитела и концентрированные иммуноглобулины конъюгируют с ферментом с помощью глютаральдегида.

### **Непрямой метод ИФА для выявления антител в исследуемой сыворотке**

В лунках планшета сорбируют известный (специфический) антиген и добавляют испытуемую сыворотку больного. После инкубации не связавшиеся иммуноглобулины сыворотки тщательно отмывают буферным раствором. Далее добавляют конъюгат - меченные ферментом пероксидазой антитела против глобулинов человека, которые присоединяются к антителам испытуемой сыворотки (иммуноглобулины сыворотки - антиген для меченой антителой сыворотки). Образовавшийся комплекс {Аг-Ат-Ат<sup>Фермент</sup>} выявляется после инкубации с субстратом - пероксидом водорода и хромогеном. По интенсивности окраски определяют количество сорбированных на антигене антител испытуемой сыворотки визуально и, окончательно, с помощью спектрофотометра. При отрицательной реакции (отсутствие в испытуемой сыворотке искомых антител) содержимое лунок бесцветное.

Следует отметить, что исследование каждого образца испытуемой сыворотки проводится в нескольких разведениях и в нескольких (обычно трех) лунках. Как правило, одновременно тестируют образцы исследуемых сывороток от большого числа обследуемых лиц, так как постановка одиночных анализов является экономически нерентабельной. При проведении непрямого метода ИФА ставят контроли, аналогичные контролям прямого ИФА.

Непрямой метод более чувствителен, чем прямой.

Для постановки непрямого ИФА используют коммерческие тест-системы нескольких поколений, которые постоянно совершенствуются, их чувствительность повышается благодаря все более специфичным антигенам, нанесенным на твердую фазу. Например, в тест-системах четвертого поколения на твердую фазу нанесена смесь из антигенов и антител. Они предназначены для одновременного выявления циркулирующих в крови антигенов и антител. Такие тест-системы используются при ранней диагностике ВИЧ-инфекции.

**Конкурентный метод ИФА** - наиболее чувствителен и специфичен. Он применяется как для определения антигена, так и для выявления антител в испытуемых сыворотках.

В опыте для выявления антигена участвуют три компонента – связанные с твердой фазой специфические антитела против искомого антигена, исследуемый на присутствие антигена материал и конъюгат (антиген, идентичный искомому, связанный с ферментом). Между исследуемым антигеном (его вносят в лунки первым) и конъюгатом имеет место конкуренция за связь с фиксированными антителами. После промывания лунок и удаления не связавшихся компонентов реакции, добавляют субстрат с хромогеном и определяют по интенсивности окраски количество связавшегося конъюгата. Чем больше антигена содержится в исследуемом материале, тем меньше конъюгата будет связано с антителами.

**Задание.**

1. Зарисовать альбоме схему прямого и непрямого метода ИФА.
2. Учесть и зарисовать результат постановки ИФА на полистероловом планшете.

**в) Радиоиммунологический анализ**

**Радиоиммунологический анализ (РИА)** основан на выявлении комплексов {антиген-антитело} с помощью радиоактивной метки, введенной в состав одного из ингредиентов реакции – антигена или антитела. Для приготовления конъюгата - меченого ингредиента – используют радиоактивный йод или тритий ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ). Результаты реакции учитывают с помощью счетчиков радиоактивности.

Существуют различные модификации РИА, чаще используют твердофазный метод, который по своей технике во многом сходен с твердофазным ИФА. В качестве твердой фазы используют плоские пластины адсорбента, лунки полистероловых планшетов и др. В практических лабораториях, осуществляющих диагностику инфекционных заболеваний, применяются стандартные коммерческие наборы, с помощью которых можно определять неизвестные антигены или антитела в исследуемых материалах. Твердофазный РИА можно проводить прямым, непрямым и конкурентным методами, наиболее удобен непрямой метод.

Радиоиммунологический анализ – один из наиболее чувствительных серологических методов. РИА позволяет выявить минимальные количества искомых антигенов или антител – до 0,1-10 нг/мл белка. Однако широкое применение РИА ограничивается рядом недостатков: дороговизной применяемой аппаратуры, реактивов и обязательным наличием специально оснащенной лаборатории для работы с радиоактивными изотопами. Для снижения стоимости исследований необходимо проведение одновременно больших серий проб, что значительно удлиняет сроки выдачи результатов.

### г) Иммуноблотинг

**Иммуноблотинг (Вестернблот)** – это иммунологический анализ смеси различных компонентов (отдельных микробных антигенов или антител к разным антигенам и/или антигенным эпитопам возбудителя). Он сочетает в себе три метода: электрофорез смеси антигенов в полиакриламидном геле, электроперенос разделенных белков с геля на подложку и определение их с помощью ИФА или РИА.

Иммуноблотинг проводится в три этапа:

1. Разделение смеси биологических макромолекул (например, компонентов вириона или белков сыворотки крови) на отдельные фракции с помощью электрофореза в полиакриламидном геле;
2. Перенос (блотинг) разделенных фракций из геля на твердую подложку (блот) путем наложения пластины полиакриламидного геля на активированную бумагу или нитроцеллюлозную мембрану в специальной камере под воздействием электрического поля;
3. Выявление на подложке искомых макромолекул (антигенов или антител) с помощью прямого или непрямого ИФА или РИА.

В диагностических лабораториях иммуноблотинг применяют для подтверждения диагноза различных инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной этиологии, например ВИЧ-инфекции, сифилиса, хламидиоза, хеликобактериоза, кампилобактериоза и др.

Используют коммерческие диагностические тест-системы, которые содержат набор ингредиентов, необходимых для диагностики конкретной инфекции. Первые два этапа иммуноблотинга – электрофорез антигенов известного возбудителя и перенос их на подложку – уже выполнены фирмой, выпускающей тест-системы. В диагностический

набор входят узкие полоски-«стрипсы», вырезанные из подложки, с уже нанесенными антигенами возбудителя.

В диагностической (иммунологической) лаборатории проводят третий этап иммуноблотинга – непрямой ИФА. Полоску-«стрип» с нанесенными антигенами помещают в специальную ванночку и последовательно инкубируют с сывороткой больного, конъюгатом (меченные ферментом антитела против иммуноглобулинов человека) и субстратно-хромогенной смесью. После каждого этапа инкубации полоску много-кратно отмывают буферным раствором для удаления не связавшихся реагентов. При положительной реакции на полоске-«стрипе» появляются поперечные окрашенные линии, соответствующие по локализации разным антигенам возбудителя. При отрицательной реакции полоски не окрашиваются. При каждой постановке реакции ставят положительный и отрицательный контроли.

Иммуноблотинг позволяет выявлять спектр антител в сыворотке больного или дифференцированно выявлять антитела к отдельным эпитопам возбудителя, что повышает достоверность диагностики. Определение в изучаемой сыворотке характерных спектров антител и динамика изменения этих показателей имеет прогностическое значение. Метод может быть использован также для определения эпитопов изучаемых антигенов по известным сывороткам.

### **Контрольные вопросы по теме занятия**

1. Комплément, его компоненты, свойства, пути активации. Использование комплемента в серологических реакциях.
2. Реакции иммунного лизиса, механизм, роль комплемента.
3. Реакция бактериолиза: ингредиенты, механизм, метод постановки *in vitro*, видимый результат. Практическое применение.
4. Реакция иммунного гемолиза: механизм, ингредиенты, схема постановки реакции и оценка результатов. Практическое применение.
5. На какой иммунологической закономерности основана реакция связывания комплемента (РСК)? Назовите и охарактеризуйте две системы {антigen-антитело}, участвующие в РСК.
6. Охарактеризуйте ингредиенты, участвующие в РСК. В чем заключается подготовительная работа перед постановкой основного опыта РСК? Что называется титром комплемента и его рабочей дозой?

7. Опишите схему постановки основного опыта РСК. Объясните механизм положительной и отрицательной РСК. Как выглядят результаты?
8. Какие биопрепараты используют в РСК? Опишите их состав и способ получения.
9. Практическое применение РСК. Что называется титром РСК?
10. Опишите метод радиального гемолиза эритроцитов (вариант РСК). Практическое применение.
11. Объясните сущность реакции иммобилизации, ее практическое применение.
12. На чем основаны серологические реакции с меченными антителами или антигенами? Перечислите используемые метки и виды реакций, их общая оценка.
13. На чем основан иммунофлюоресцентный метод (МИФ)? Назовите две методики МИФ.
14. Охарактеризуйте прямой метод иммунофлюоресценции, применение.
15. Охарактеризуйте непрямой метод иммунофлюоресценции, его преимущества, применение.
16. На чем основан принцип иммуноферментного анализа (ИФА)? Как подразделяются методы иммуноферментного анализа?
17. Что представляют собой реагенты, применяемые для иммуноферментного анализа?
18. Опишите принцип постановки прямого метода ИФА для определения испытуемого антигена (нарисуйте схему присоединения ингредиентов реакции).
19. Опишите принцип постановки непрямого метода ИФА для выявления антител (нарисуйте схему присоединения ингредиентов реакции).
20. Коммерческие тест-системы для ИФА, их характеристика, значение.
21. На чем основан принцип радиоиммунного анализа (РИА). В чем его отличия от ИФА. Недостатки метода.
22. Иммуноблотинг. Опишите его сущность, этапы постановки. Укажите его преимущества по сравнению с непрямыми ИФА.

## **Занятие № 16**

**Тема: Диагностические биопрепараты, применяемые в серологических реакциях.**

**Практическое использование серологических реакций для диагностики инфекционных заболеваний**

**План занятия:**

1. Биопрепараты, содержащие известные антитела. Диагностические иммунные сыворотки и иммуноглобулины.
  - а) Неадсорбированные и адсорбированные агглютинирующие сыворотки, их сравнительная характеристика. Получение адсорбированных агглютинирующих сывороток по методу Кастеллани.
  - б) Моноклональные антитела, их характеристика. Гибридомная технология получения моноклональных антител.
2. Диагностикумы – препараты, содержащие известные антигены:
  - а) Бактериальные диагностикумы (корпускулярные и растворимые);
  - б) Дагностикумы, содержащие антигены, адсорбированные на корпускулярных носителях.
3. Иммуноглобулиновые (антителные) диагностикумы.
4. Применение серологических реакций в инфекционной патологии:
  - а) Определение возбудителя (антigena) на раннем этапе инфекционного заболевания.
  - б) Определение периода инфекционного заболевания по динамике синтеза различных классов антител.
  - в) Применение парных сывороток в диагностике инфекционных заболеваний.
5. Практическая работа:
  - а) Серологическая идентификация выделенной бактериальной культуры в РА.
  - б) Разбор биопрепараторов, применяемых в серологических реакциях.
  - в) Решение ситуационных задач.

## **Методические указания к выполнению практического занятия**

Рассмотреть теоретический материал – темы 6 и 7, вопросы 29-36.

Изучить диагностические биопрепараты, используемые в серологических реакциях (см. граф 4). Диагностические сыворотки, их подразделение, принципы получения, цели применения. Адсорбированные монорецепторные агглютинирующие сыворотки, их отличия от неадсорбированных агглютинирующих сывороток. Метод адсорбции агглютининов по Кастелани.

Разобрать гибридомную технологию получения моноклональных антител. Отличие монорецепторных диагностических сывороток от моноклональных антител.

Изучить препараты-диагностикумы. Диагностикумы бактериальные и корпуксуллярные диагностикумы-носители мелкодисперсных антигенов.

Иммуноглобулиновые (антительные) диагностикумы – препараты, содержащие специфические антитела, сорбированные на корпуксуллярных носителях. Практическое применение.

Для закрепления материала по серологическим реакциям и используемым в них биопрепаратам рекомендуется выборочно решить ситуационные задачи.

### **1. Биопрепараты, содержащие известные антитела**

Биопрепараты, содержащие известные специфические антитела, называются иммунными сыворотками. В зависимости от целей применения, эти биопрепараты подразделяют на *диагностические и лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины*.

*Диагностические сыворотки содержат известные антитела, их применяют в серологических реакциях для определения (идентификации) выделенного возбудителя инфекционного заболевания или его токсина, а также для выявления неизвестных антигенов непосредственно в исследуемом материале из организма больного (кровь, ликвор, моча, мокрота и др.) или из объектов окружающей среды (пищевые продукты, почва, материалы от животных и др.).*

Диагностические сыворотки (таблица 12) обычно получают путем многократной иммунизации (гипериммунизации) животных (кроликов, баранов и других животных) различными антигенами - звесью микробов или выделенными из них и очищенными микробными антигена-

ми, анатоксинами, чужеродными сывороточными белками и другими корпускулярными и растворимыми антигенами. Схемы и способы иммунизации варьируют в зависимости от свойств вводимого антигена, особенностей формирования иммунитета у данного вида животного и необходимого титра антител в получаемой иммунной сыворотке. В зависимости от способа получения различают неадсорбированные нативные (видовые) и адсорбированные сыворотки, освобожденные от групповых антител.

### **а) Неадсорбированные и адсорбированные агглютинирующие сыворотки.**

Способы получения неадсорбированных и адсорбированных диагностических сывороток рассматриваются на примере агглютинирующих сывороток, которые выпускаются в виде нативных (неадсорбированных) и адсорбированных по методу Кастеллани.

*Неадсорбированные (видовые, нативные) сыворотки* обладают высоким титром (1:25000 и выше), но недостаточно специфичны. Видовые сыворотки содержат несколько типов антител соответственно набору антигенов того вида бактерий, которым проводилась иммунизация животного. Кроме специфических антител, в нативных сыворотках могут быть и групповые (неспецифические) антитела, за счет которых происходит агглютинация не только с гомологичными бактериями (которыми проводилась иммунизация), но и с родственными бактериями, имеющими общие групповые антигены. Групповая агглютинация наблюдается как в реакции агглютинации на стекле, так и при постановке развернутой агглютинации в пробирках. В последнем случае она бывает положительной с меньшими разведениями сыворотки, чем специфическая реакция агглютинации с гомологичным антигеном. Особенно часто групповая агглютинация встречается у представителей рода *Salmonella*, к которым относятся возбудители брюшного тифа (*Salmonella typhi*), паратифа В (*Salmonella paratyphi B*) и многие другие.

*Адсорбированные монорецепторные сыворотки.* Чтобы избежать групповой агглютинации, из нативных видовых сывороток получают адсорбированные монорецепторные сыворотки, пользуясь методом адсорбции антител по Кастеллани.

Для этой цели к видовой иммунной сыворотке добавляют густую взвесь родственных бактерий, содержащих групповые антигены, анти-

тела против которых требуется извлечь из сыворотки. После инкубации в термостате эту смесь центрифугируют, в результате чего образовавшиеся комплексы между групповыми антигенами и антителами оказываются в осадке и удаляются, а в надосадочной жидкости остаются специфические антитела.

Нередко, для устранения всех групповых антител сыворотку последовательно (в несколько этапов) инкубируют с разными видами родственных микроорганизмов, и тогда в надосадочной жидкости остаются антитела к рецепторам только одной специфичности. Такая сыворотка называется монорецепторной (моновалентной) адсорбированной агглютинирующей сывороткой. Для некоторых целей в серологических реакциях применяют поливалентные адсорбированные сыворотки – в них содержатся антитела двух или более известных специфичностей.

Адсорбированные сыворотки характеризуются строгой специфичностью, титры их обычно низкие (1:40 – 1:320), их применяют в реакции агглютинации на стекле. Результат реакции считается окончательным (а не ориентировочным, как в реакции агглютинации на стекле с видовой неадсорбированной сывороткой).

Диагностические сыворотки подразделяются в зависимости от серологических реакций, в которых они участвуют, на *агглютинирующие* (неадсорбированные и адсорбированные), *преципитирующие*, *гемолитические* и *антитоксические*.

Из иммунных сывороток готовят диагностические иммуноглобулины – концентрированные биопрепараты, содержащие специфические антитела. Иммуноглобулины – технологически более совершенные препараты по сравнению с сыворотками, имеют высокий титр антител и дают более точные результаты исследования.

Диагностические иммуноглобулины, меченные флюорохромами, ферментами или радиоактивными изотопами используют для экспресс-диагностики в реакциях МИФ, ИФА, РИА для выявления возбудителей или их антигенов, а также антител (антиглобулиновые сыворотки).

Диагностические сыворотки и иммуноглобулины выпускают в ампулах лиофильно высушеными, реже – в жидком виде. Лиофилизация – это высушивание биопрепараторов из замороженного состояния с помощью специального вакуумного оборудования. Лиофилизованные препараты более стабильны и хранятся дольше по сравнению с жидкими.

В таблице 13 указаны наименования диагностических сывороток и иммуноглобулинов, применяемые реакции, примеры биопрепараторов.

## б) Моноклональные антитела

*Моноклональные антитела – это высокоспецифичные антитела, продуцируемые одним клоном антителообразующих клеток. Они однородны по своему составу и способны связываться только с одной детерминантой (эпитопом) антигена. Этим они выгодно отличаются от менее специфичных и неоднородных антител (поликлональных), получаемых путем иммунизации животных антигенами.*

Моноклональные антитела получают с помощью гибридомной технологии, позволяющей нарабатывать их в неограниченном количестве. Для этой цели из селезенки иммунизированных определенным антигеном мышей выделяют антителообразующие клетки – В-лимфоциты (короткоживущие). Их соединяют с миеломными клетками, которые были выделены из мышиной опухоли (миеломы). Эти клетки обладают способностью к непрерывному размножению в культуре клеток, но не вырабатывают антитела. Проводят слияние В-клеток и миеломных клеток и получают гибридные клетки – гибридомы, обладающие свойствами обеих родительских клеток: способностью к антителообразованию и к непрерывному делению. Клетки-гибридомы культивируют в специальной среде, где не могут размножаться исходные негибридные клетки, и производят клонирование, то есть получают различные клоны клеток путем их размножения из одной исходной гибридомной антителообразующей клетки. Каждый клон содержит однородные гибридомные клетки, продуцирующие идентичные антитела одной специфичности, способные связываться с единственной антигенной детерминантой, то есть моноклональные антитела. К вирусному, микробному или другим антигенам получают несколько моноклональных антител (спектр или панель моноклональных антител), к разным эпитопам исследуемого антигена.

Вместо адсорбированных сывороток для серологической идентификации возбудителя все чаще используют моноклональные антитела к групповым, видовым, типовым антигенам. Меченные моноклональные антитела (иммуноглобулины) применяют в современных коммерческих тест-системах ИФА, МИФ, РИА для диагностики многих вирусных, бактериальных инфекций и в других исследованиях (вместо меченных иммуноглобулинов, получаемых из иммунных сывороток животных).

Таблица 12

**Диагностические иммунные сыворотки и иммуноглобулины**

Наименование и применение	Примеры
Агглютинирующие неадсорбированные (видовые, нативные) сыворотки	Брюшнотифозная, паратифозная В, дизентерийная Зонне, бруцеллезная, туляремийная
Агглютинирующие адсорбированные сыворотки (моновалентные, поливалентные).	Поливалентные и монорецепторные сыворотки сальмонеллезные, холерные, менингококковые, эшерихиозные и другие. Иммуноглобулины диагностические адсорбированные эшерихиозные, чумные.
Преципитирующие сыворотки	Сибиреязвенная, противочумная, менингококковая, антиглобулиновая против белков человека и различных видов животных
Гемолитическая сыворотка (в РСК)	Против эритроцитов барана
Комплемент ( в РСК)	Сыворотка морской свинки (лиофилизированная)
Антитоксические стандартные сыворотки, в реакции нейтрализации	Противодифтерийная, противостолбнячная, противобутулические (А, В, Е), альфа-антитоксическая стафилококковая
Люминесцирующие иммуноглобулины, меченные ФИГЦ: а) для прямого МИФ	Брюшнотифозный, дизентерийные, сальмонеллезные группы А, В, Д, холерные, бруцеллезные, туляремийный, сибиреязвенный, легионеллезный и другие.
б) для непрямого МИФ	Иммуноглобулины кроличьи против IgG, IgA, IgM человека. Иммуноглобулины ослиные против глобулинов кролика.
Иммуноглобулины, меченные ферментами: а) для прямого ИФА	Антихламидийный, против Нbs-антигена вируса гепатита В, антитропонемный, против капсулного антигена чумной палочки и другие.
б) для непрямого ИФА – для выявления антител в испытуемых сыворотках	Кроличьи иммуноглобулины против антител классов IgG, IgM, IgA человека, меченные пероксидазой для диагностики сифилиса, хеликобактериоза, кампилобактериоза, туберкулеза. Лайм-боррелиоза и др.
	Ослиные иммуноглобулины против сывороточных глобулинов кролика, меченные пероксидазой.

## **2. Диагностикумы - биопрепараты, содержащие известные антигены.**

**Диагностикумы** – это биопрепараты, используемые как известные антигены при постановке серологических реакций с целью выявления специфических антител в исследуемых сыворотках (антигенные диагностикумы).

К диагностикумам относятся также биологические препараты с адсорбированными на корпускулярных носителях известными антителами – антителные (иммуноглобулиновые) диагностикумы.

Диагностикумы антигенные содержат взвеси инактивированных микроорганизмов или полученные из них коллоидные растворы и подразделяются на корпускулярные и растворимые (таблица 13). Диагностикумы (антителы) готовят из многих возбудителей кишечных инфекций, бруцелл, гонококков, туляремийных, коклюшных бактерий, хламидий, микоплазм, риккетсий и вирусов. Они участвуют в реакциях агглютинации, непрямой гемагглютинации, преципитации, реакции связывания комплемента, реакции нейтрализации, иммуноферментном анализе и др. С их помощью выявляют специфические антитела в исследуемых сыворотках.

### **a) Бактериальные корпускулярные и растворимые диагностикумы**

**Корпускулярные диагностикумы** – это стандартные препараты с определенным содержанием инактивированных микробных тел, они стабильны, длительно сохраняются и не представляют опасности при работе. Такие диагностикумы получают из штаммов микробов с типичными свойствами. Их инактивируют физическим воздействием (нагреванием или ультразвуком) или, что чаще, обработкой различными химическими веществами (формалином, фенолом, этиловым спиртом, ацетоном).

Коммерческие диагностикумы производят с полным набором антигенов микробной клетки и с отдельными антигенами (O-, H-, Vi-брюшнотифозные диагностикумы).

Корпускулярные бактериальные диагностикумы применяются, главным образом, в реакции агглютинации для выявления специфических антител(агглютининов) в исследуемых сыворотках.

*Растворимые диагностикумы*, которые обычно называют растворимыми антигенами, содержат дезинтегрированные микробы в виде коллоидных растворов. Их получают из микробных клеток путем экстракции, обработки ферментами, детергентами и другими воздействиями.

Для повышения специфичности растворимых антигенов из них извлекают наиболее активные фракции, в том числе поверхностные антигены. Разработаны способы получения высокоспецифичных антигенных комплексов и их отдельных эпитопов путем химического и биологического синтеза и с участием генно-инженерных методов. К растворимым антигенам относят также белковые токсины и получаемые из них анатоксины.

Растворимые антигены применяют в реакциях преципитации (РП), нейтрализации (РН), РСК для выявления антител в испытуемых сыворотках. Они являются специфическими компонентами, сорбированными на носителях (эритроцитах, частицах латекса и других инертных корпускулах) для создания соответствующих антигенных диагностикумов. Растворимые антигены (меченные или без меток) входят в состав диагностических тест-систем для ИФА и РИА.

#### **б) Диагностикумы, содержащие антигены, адсорбированные на корпускулярных носителях**

*Эритроцитарные антигенные диагностикумы* – это сенсибилизированные известными антигенами эритроциты. Их получают из формализованных эритроцитов, на которые адсорбируют растворимые микробные антигены – лизаты микробов или извлеченные из них антигенные комплексы. Для стандартизации результатов серологических исследований диагностикумы из поверхностных антигенов возбудителей получают генно-инженерными методами.

*Эритроцитарные антигенные диагностикумы* применяют в реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА) для выявления специфических антител в сыворотках больных.

*Латекс-диагностикумы антигенные* – представляют собой полимерные микрочастицы (шарики) из латекса, на поверхности которых адсорбированы известные растворимые микробные антигены. Латекс-диагностикумы используют для выявления специфических антител в исследуемых сыворотках.

### **3. Иммуноглобулиновые (антительные) диагностикумы**

Иммуноглобулиновые (антительные) диагностикумы содержат антитела, адсорбированные на носителях и выполняют функцию известных антител. Они более специфичны, чем диагностические сыворотки и обеспечивают высокую диагностическую точность исследований. Их используют для выявления антигенов возбудителя в исследуемых материалах от больных или объектах внешней среды без выделения патогена в чистой культуре. Известны эритроцитарные, латекс- и Ко-диагностикумы (таблица 13). Их применяют в реакциях непрямой агглютинации различного типа.

*Иммуноглобулиновые эритроцитарные диагностикумы.* Эти препараты готовят из формализированных эритроцитов, на которые адсорбируют известные антитела. Применяются в модифицированной РНГА – реакции обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА) для серодиагностики инфекционных заболеваний разной этиологии.

*Иммуноглобулиновые латекс-диагностикумы* – содержат латекс-частицы с адсорбированными на них специфическими антителами. Латекс-агглютинацию применяют в экспресс-диагностике для обнаружения антигенов возбудителя в исследуемых материалах. Реакция ставится на стекле или другой подложке и учитывается в течение нескольких минут.

*Иммуноглоублиновые диагностикумы для коагглютинации* - биопрепараты, содержащие взвесь инактивированных клеток *Staphylococcus aureus* штамма Cowan 1, на поверхности которых адсорбированы специфические антитела. Применяются в реакции коагглютинации.

Таблица 13

*Диагностикумы*

Наименование	Цели применения, серологические реакции	Примеры биопрепаратов
Диагностикумы корпускулярные и растворимые бактериальные 1. С полным набором видовых антигенов  2. Содержащие отдельные антигены  3. Растворимые диагностикумы	Выявление и определение титра антител в исследуемых сыворотках в реакции агглютинации  Выявление и определение титра антител в испытуемых сыворотках в РИ, РП, РСК	1. Коклюшный, паракоклюшный, паратифозный В, бруцеллезный, туляремийный и др.  2. Сальмонеллезные О-, Н-, Vi- диагностикумы, холерный О- диагностикум и др.  3. Антиген кардиолипиновый, трепонемный ультраозвученный антиген, токсин стандартный дифтерийный, хламидийный и микоплазменный антигены
Диагностикумы эритроцитарные антигенные  иммуноглобулиновые (антительные) эритроцитарные диагностикумы	Выявление и титрование антител в исследуемых сыворотках в РНГА.  Определение уровня антитоксинов для контроля эффективности вакцинации и выявления групп повышенного риска в РН, РНАТ	О-, Vi-брюшнотифозные, шигеллезные Зонне и Флекснера, менингококковые групповые, туляремийный, чумный, трепонемный и др.  Дифтерийный, столбнячный..
Латекс-диагностикумы 1.антigenные  2.Иммуноглобулиновые (антительные) латекс- диагностикумы	Латекс-агглютинация для: 1.Выявление антигена в исследуемых сыворотках  2.Выявление и идентификация антигенов в исследуемом материале	Легионеллезный, менингококковый и др.  О-, Н-, Vi-сальмонеллезные, дизентерийные Флекснера и Зонне, псевдотуберкулезный, хеликобактериозный и др.
Диагностикумы иммуноглобулиновые (антительные) для коагглютинации	Реакция коагглютинации для выявления и идентификации антигенов в исследуемом материале	Стрептококковые групповые и др.

## **4. Практическое применение серологических реакций**

Серологические реакции обладают высокой специфичностью и чувствительностью и позволяют точно и быстро поставить диагноз инфекционного заболевания путем определения возбудителя (антигена) или выявления специфических антител.

*Выявление антигенов.* Кроме серологической идентификации возбудителя, выделенного путем бактериологического исследования, на ранних этапах инфекционного заболевания с помощью серологических реакций выявляют возбудителя или его антигены непосредственно в исследуемом материале, что позволяет в короткие сроки поставить диагноз. С этой целью часто применяют реакции с меченными антителами (МИФ, ИФА, РИА) и другие методы (латекс- и коагглютинацию и др.).

*Обнаружение специфических антител* к возбудителям заболевания позволяет поставить диагноз, а также определить период инфекционного заболевания.

### **а) Определение периода инфекционного заболевания по динамике синтеза различных классов антител**

*Антитела класса IgM* - наиболее «ранние» из всех классов иммуноглобулинов, так как появляются на первом этапе иммунного ответа. Антитела этого класса находится в основном в кровеносном русле, они играют важную защитную роль при бактериемии, способствуя элиминации возбудителя. IgM - поливалентны, поэтому они превосходят другие классы антител в реакциях агглютинации и лизиса. Обычно специфические IgM-антитела появляются к концу 1-ой недели инфекционного заболевания, достигают максимального титра через 2-3 недели и исчезают в период реконвалесценции. Для дифференциальной диагностики первичного инфицирования от реинфекции применяют ИФА на выявление класса IgM против конкретного возбудителя (рис. 4 стр. 27).

*Иммуноглобулины класса IgG* – основные антитела иммунного ответа гуморального типа. К этому классу относится большинство антител против бактерий, их токсинов, вирусов и других антигенов. IgG содержатся не только в сосудистом русле, но и легко проникают в экстраваскулярное пространство. Уровень IgG начинает увеличиваться в сыворотке больного позже по сравнению с IgM (не ранее чем через 2-3 недели от начала инфекции), но определяются более продолжительное

время, часто в течение нескольких лет. При реинфекции развивается вторичный иммунный ответ, обусловленный В-клетками памяти: резко возрастает уровень IgG, подъем специфических IgM-антител несущественен. Для определения IgG применяют реакции преципитации, РСК, а также ИФА на выявление класса IgG против соответствующего возбудителя.

*Иммуноглобулины класса IgA* обуславливают местный иммунитет на поверхности слизистых оболочек. Антитела этого класса (димерная форма - sIgA) обычно выявляют в секретах слизистых эпителия (грудное молоко, молозиво, слюна, секреты кишечного, респираторного и урогенитального трактов) с помощью ИФА.

Серологические реакции могут применяться для определения стадии хронической инфекции. например в диагностике гепатита В, инфекционного мононуклеоза и др. При этих заболеваниях сначала обнаруживают антитела к наиболее доступным для иммунной системы антигенам (секретируемым, расположенным на поверхности микроорганизма или инфицированной вирусом клетки). Позже, когда иммунная система взаимодействует с более глубоко расположенными или высвободившимися антигенами при распаде возбудителя, выявляют антитела против внутренних белков и ферментов патогена. Спектр антител, образуемых к разным антигенам конкретного возбудителя инфекционного заболевания, выявляют в реакции иммуноблотинга (наиболее часто при диагностике ВИЧ-инфекции).

### **б) Применение парных сывороток в диагностике инфекционных заболеваний.**

При постановке реакций с целью обнаружения антител необходимо не только выявить их, но и установить титр антител, который должен быть не ниже «диагностического титра». Для каждой серологической реакции при определенном инфекционном заболевании был эмпирически установлен свой диагностический титр. Например, для развернутой реакции агглютинации при брюшном тифе и бруцеллезе диагностический титр равен 1:200, при туляремии – 1:100. Таким образом, обнаружение антител в таком титре (и выше) позволяет диагностировать эти заболевания.

Но более надежным способом является обнаружение нарастания титра антител против антигенов возбудителя в течение заболевания.

Для этой цели проводят исследование «парных сывороток» больных: 1-ую сыворотку берут в начале болезни (при поступлении больного в стационар), а вторую – обычно через 10-14 дней после первой. Обе сыворотки исследуют одновременно в серологической реакции и устанавливают титр обеих сывороток. Используют реакции РСК, РНГА или реакцию агглютинации. Повышение титра антител во 2-ой сыворотке в 4 и более раза по сравнению с 1-ой сывороткой подтверждает диагноз инфекционного заболевания

*Серологическая диагностика инфекционных заболеваний с целью выявления антител* – сравнительно поздний метод диагностики – обычно позволяет обнаружить антитела не ранее конца 1-ой недели заболевания (при некоторых заболеваниях – сифилисе, Лайм-боррелиозе, ВИЧ-инфекции – значительно позднее), поэтому данный метод нередко имеет ретроспективное значение.

## 5. Практическая работа

### Задание 1:

Применение агглютинирующих видовых неадсорбированных и адсорбированных монорецепторных сывороток для серологической идентификации чистой культуры. Применяемые реагенты:

- О-брюшнотифозный диагностикум, содержит 9, 12 антигенные рецепторы;
- паатифозный А диагностикум, содержит 1, 2, 12 антигенные рецепторы;
- видовая (нативная) агглютинирующая брюшнотифозная сыворотка, титр 1:32000, содержит антитела к 9, 12 антигенным рецепторам;
- адсорбированная монорецепторная агглютинирующая сыворотка, содержит антитела к 9 антигенному рецептору.

- a) Учесть опыт развернутой реакции агглютинации с брюшнотифозной видовой кроличьей неадсорбированной сывороткой и диагностикумами *S.typhi* и *S.paratyphiA*, обратить внимание, что титр специфической реакции агглютинации высокий (идет до титра или половины титра сыворотки), а титр групповой реакции агглютинации значительно ниже. Результаты записать в альбом, таблица 14.

Таблица 14

**Опыт серологической идентификации чистой культуры сальмонелл с использованием неадсорбированной видовой сыворотки**

№№ пробирок	1	2	3	4	5	6	7	8
Разведения видовой брюшнотифозной сыворотки	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	Каг	Ксыв.
О-Брюшнотифозный диагностикум							-	-
Паратифозный А диагностикум							-	-

**Заключение:**

- б) Поставить реакцию агглютинации на стекле, используя в качестве антигенов брюшнотифозный и паратифозный А диагностикумы, в качестве антитела монорецепторную адсорбированную агглютинирующую сыворотку. Сделать заключение, результат зарисовать.

**Задание 2.**

Изучить предлагаемые на занятии диагностические биопрепараты, записать их в таблицу 15 и заполнить ее по схеме:

Таблица 15

**Биопрепараты, применяемые в серологических реакциях**

Наименование биопрепарата	Состав	Серологическая реакция, в которой применяется биопрепарат	Цель применения
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
и т.д.			

### **Задание 3.**

Для закрепления знаний по серологическим реакциям рекомендуется выборочно решить предложенные ниже ситуационные задачи, ход решения записать в альбом.

#### **Задача №1**

Для обнаружения инфицированности вирусом ВИЧ сыворотку больного Б., 28 лет, обследовали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

*Задание:*

1. Объясните сущность этого метода.
2. Какие ингредиенты необходимы для обнаружения антител в сыворотке к вирусу ВИЧ?
3. Как будет выглядеть положительная реакция?
4. Объясните, какие контроли ставятся в этой реакции.

#### **Задача №2**

В лабораторию поступила видовая агглютинирующая кроличья брюшнотифозная сыворотка. Необходимо из сыворотки удалить групповые антитела.

*Задание:*

1. Каким методом из сыворотки можно удалить групповые антитела, как называется этот метод?
2. Объясните сущность данного метода.
3. Как будет называться сыворотка после удаления групповых антител?
4. Какими методами можно идентифицировать выделенную культуру бактерий, используя видовую агглютинирующую сыворотку и сыворотку после удаления групповых антител? Объяснить.
5. Охарактеризовать антигены, используемые в реакциях агглютинации.

#### **Задача №3**

При исследовании отделяемого зева больного ребенка О., 7 лет, выделена культура дифтерийных бактерий. Для определения токсигенности данной культуры применен метод Оухтерлони.

*Задание:*

1. Объясните сущность используемого метода.

2. Охарактеризуйте ингредиенты, применяемые для постановки метода.
3. Опишите и объясните, как выглядит положительный результат.
4. Какие ещё реакции можно использовать для обнаружения дифтерийного токсина?

#### **Задача №4**

В лабораторию поступила кровь больного А., 40 лет, с подозрением на брюшной тиф, болен 2 недели. Была поставлена реакция агглютинации.

*Задание:*

1. Объясните механизм реакции агглютинации.
2. Какие ингредиенты используются для постановки реакции?
3. Как внешне проявляются положительная и отрицательная реакции?
4. Как определяют титр реакции?
5. Объясните, чем отличается антиген, используемый в реакции агглютинации, от антигена в реакции преципитации?

#### **Задача №5**

В лабораторию поступило производственное сырье (необработанная шерсть) для исследования на обсемененность возбудителем сибирской язвы.

*Задание:*

1. Какую серологическую реакцию следует применить для обнаружения сибираязвенного антигена?
2. Что необходимо сделать с исследуемым материалом перед постановкой реакции?
3. Какие ингредиенты будут использованы для постановки реакции?
4. Опишите технику постановки реакции.
5. Как будет выглядеть положительный или отрицательный результат? Объясните, почему. Какой механизм лежит в его основе?

#### **Задача №6**

В лабораторию при пастеровской станции поступил исследуемый материал (мозг погибшей собаки). Для обнаружения вируса бешенства был использован метод иммунофлюоресценции.

**Задание:**

1. Какие два метода иммунофлюоресценции могут быть применены?
2. Объясните сущность и отличие каждой из методик.
3. Какие биопрепараты используют для их постановки и как их получают?
4. Объясните, с какими целями может быть поставлен иммунофлюоресцентный метод?

**Задача №7**

В лабораторию поступила сыворотка крови женщины, перенесшей воспаление придатков. Для исключения урогенитального хламидиоза была поставлена реакция связывания комплемента (РСК).

**Задание:**

1. Объясните сущность РСК.
2. Назовите и опишите ингредиенты, используемые для РСК
3. В чем заключается подготовительная работа перед постановкой основного опыта РСК?
4. Объясните, как проявляется положительная и отрицательная реакция.

**Задача №8**

В лабораторию поступил материал от больного ребенка, 2-х лет, с подозрением на коклюш, болен 2 недели. Для подтверждения диагноза была поставлена реакция связывания комплемента (РСК).

**Задание:**

1. Какой материал был взят от больного и что можно обнаружить в нем?
2. Объясните сущность РСК.
3. Опишите ингредиенты, используемые в РСК, и как они готовятся перед основным опытом?
4. Что такое титр комплемента и его рабочая доза?
5. Объясните, как оценивается положительная и отрицательная реакция?
6. Что такое титр реакции?

**Задача №9**

В лабораторию поступила кровь от работницы столовой для выявления брюшнотифозного носительства. Была поставлена РНГА с

брюшнотифозным Vi-диагностикумом.

*Задание:*

1. Охарактеризуйте РНГА, какой механизм лежит в её основе?
2. Назовите ингредиенты для постановки данной реакции и объясните, как их получают?
3. Как оценивается положительный и отрицательный результат и почему?
4. Дайте определение титра реакции.
5. С какой целью ещё можно использовать РНГА?

### **Задача №10**

В лабораторию Института вакцин и сывороток поступила лечебно-профилактическая противодифтерийная сыворотка для определения её активности.

*Задание:*

1. Какую реакцию следует использовать для этой цели?
2. Какие ингредиенты следует подготовить для её постановки?
3. Как будет оцениваться положительный результат и почему?
4. В каких единицах определяют активность антитоксической противодифтерийной сыворотки?
5. Назовите известные Вам антитоксические лечебно-профилактические сыворотки.

### **Задача №11**

В лабораторию поступил ликвор от больного Д., 10 лет, с клиническими признаками менингоэнцефалита, ребенок болен 3 дня. Для подтверждения диагноза была поставлена латекс-агглютинация.

*Задание:*

1. С какой целью была поставлена латекс-агглютинация?
2. Какие ингредиенты были использованы для постановки реакции? Охарактеризуйте их свойства.
3. Опишите механизм латекс-агглютинации.
4. Как внешне проявляются положительная и отрицательная реакции?

### **Задача №12**

В лабораторию поступила сыворотка больного У., 56 лет, страдающего 3 недели атипичной пневмонией. Лаборатория послала за-

прос на вторую сыворотку пациента для проведения исследования с парными сыворотками для подтверждения диагноза микоплазменной пневмонии.

**Задание:**

1. Через какой срок должен быть проведен забор второй сыворотки?
2. Объясните, с какой целью исследуют парные сыворотки.
3. Какие реакции Вы выберете для проведения серологической диагностики? Обоснуйте Ваши предложения.
4. Как ставится положительный диагноз при исследовании парных сывороток?

**Контрольные вопросы по теме занятия**

1. Как подразделяют иммунные сыворотки в зависимости от цели их применения?
2. Что представляют собой диагностические сыворотки, как их подразделяют, цели применения?
3. Чем отличаются адсорбированные агглютинирующие сыворотки от неадсорбированных?
4. Опишите способ получения адсорбированных монорецепторных агглютинирующих сывороток, приведите примеры таких сывороток.
5. Что представляют собой моноклональные антитела, в чем их преимущества по сравнению с монорецепторными сыворотками? С какой целью их применяют?
6. Опишите принцип гибридомной технологии для получения моноклональных антител.
7. Что такое диагностикумы, как их подразделяют, с какой целью применяют?
8. Как получают корпукулярные диагностикумы, в какой серологической реакции их применяют? Приведите примеры.
9. Охарактеризуйте растворимые диагностикумы. С какой целью и в каких серологических реакциях их применяют?
10. Что представляют собой эритроцитарные диагностикумы, их подразделение. Как называется серологическая реакция, в которой их используют для определения титра антител? Приведите примеры таких диагностикумов.

11. Что представляют собой антителные эритроцитарные диагностикумы. В какой реакции и с какой целью их применяют? Приведите примеры
12. Что представляют собой латекс-диагностикумы и диагностикумы для коагглютинации? Приведите примеры.
13. С какой целью определяют титр антител в исследуемых сыворотках больных инфекционным заболеванием?
13. Каким образом по наличию того или иного класса специфических антител можно определить период инфекционного заболевания или его рецидив? Какие серологические реакции применяют с этой целью?
14. Какой класс иммуноглобулинов обеспечивает местный иммунитет? Как оценивают состояние местного иммунитета?
15. Что такое «парные сыворотки»? Как можно, исследуя парные сыворотки, поставить положительный диагноз инфекционного заболевания?

## **Занятие № 17**

**Тема: Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний. Иммунные сыворотки и иммуноглобулины.**

**План занятия:**

1. Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний.
2. Лечебно-профилактические гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины: состав, принципы получения. Практическое применение. Примеры.
3. Лечебно-профилактические гомологичные иммуноглобулины, Принципы получения. Практическое применение. Примеры.
4. Осложнения, возникающие при применении сывороточных препаратов. Причины. Способы их предотвращения.

### **1. Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний**

Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний направлена на создание искусственного активного или пассивного адаптивного иммунитета с помощью введения иммунобиологических препаратов, содержащих специфические антигены или антитела.

Иммунопрофилактику проводят для защиты от инфекционных заболеваний здоровых людей или групп населения, иммунотерапию – для прекращения уже развившегося инфекционного процесса.

Иммунопрофилактика и иммунотерапия может быть *активной*, стимулирующей иммунную систему на выработку иммунного ответа путем иммунизации вакцинами (антigenами) и *пассивной* – с помощью введения иммунных лечебно-профилактических сывороток или иммуноглобулинов (готовые антитела) с целью замещения функций иммунной системы.

Активную иммунопрофилактику – вакцинацию населения – применяют очень широко, активную иммунотерапию – значительно реже (для лечения некоторых хронических инфекций).

Пассивную иммунопрофилактику проводят в экстренных случаях при непосредственной угрозе заражения (особенно детей), пассивную иммунотерапию – для лечения уже возникшей инфекции.

Обе формы иммунопрофилактики и иммунотерапии характеризуются специфичностью и направлены, соответственно, на предотвращение или прекращение конкретного инфекционного заболевания.

Применяют и неспецифическую иммунопрофилактику и иммунотерапию – путем введения неспецифических иммуномодулирующих препаратов которые, воздействуя через регуляторные механизмы организма, стимулируют или угнетают иммунную систему. В качестве иммуномодуляторов применяют вещества химической или биологической природы, способные стимулировать (иммуностимуляторы) или угнетать (иммуносупрессанты) иммунные реакции, например препараты генно-инженерного, растительного, микробного и синтетического происхождения (полиоксидоний, интерфероны и др.). В основном применяют иммуностимулирующие препараты, иногда иммуносупрессанты (для подавления иммунных реакций при аллергии, аутоиммунных заболеваниях и трансплантационном иммунитете).

*Лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины*, рассматриваемые на этом занятии, применяют для экстренной профилактики (серопрофилактики) заболеваний с коротким инкубационным периодом и лечения (серотерапии) уже развившихся инфекционных заболеваний. При этом создается искусственный пассивный гуморальный иммунитет, который возникает через несколько часов после введения иммунной сыворотки и исчезает через 2-4 недели.

Лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины по происхождению подразделяют на *гетерологичные* (животного происхождения) и *гомологичные*, полученные от человека (см. граф 4).

## **2. Гетерологичные (ксеногенные) сывороточные препараты**

Сыворотки получают путем гипериммунизации лошадей (редко волов и коз) соответствующими антигенами - анатоксинами, бактериями или вирусами. От этих животных можно получить много крови и, соответственно, сыворотки, биохимический состав этих сывороток относительно близок к сыворотке человека, что снижает силу аллергических реакций. Гетерологичные сыворотки проще получать в большом количестве и они дешевле, чем гомологичные.

Из цельных (нативных) сывороток готовят очищенные и концентрированные препараты. Для этой цели удаляют балластные белки и

концентрируют фракции иммуноглобулинов, это повышает безопасность сывороток. Используют разные методы очистки: обработка ферментами, диализ («Диаферм-3»), хроматография, осаждение и др.

Более безопасными, очищенными от балластных белков (содержат не более 20% сывороточных белков) и концентрированными препаратами являются гетерологичные иммуноглобулины. Их получают из иммунных сывороток методом спирто-водного осаждения при температуре ниже 0°C или другими способами. Иммуноглобулины животного происхождения сохраняют свою чужеродность, но в меньшей степени, чем цельные сыворотки.

Гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины имеют ряд недостатков.

Препараты содержат чужеродные для человека белки, их введение вызывает сенсибилизацию организма человека и при повторном применении у пациента может возникнуть анафилактический шок, однократное введение препарата в большой дозе может вызвать сывороточную болезнь. Поэтому вводить сыворотки необходимо с большой осторожностью, перед их применением у пациента проверяют наличие гиперчувствительности к белкам лошадиной сыворотки с помощью внутркожной пробы.

Чужеродные иммуноглобулины циркулируют в крови короткое время (10-15 дней), так как организм вырабатывает против них антитела, вызывающие их разрушение. Защитное действие гетерологичных иммуноглобулинов (пассивный иммунитет) продолжается лишь в течение 1-2-х недель.

Гетерологичные сывороточные препараты подразделяются на антитоксические, антибактериальные и антивирусные (таблица 16).

Наибольшее практическое значение имеют *антитоксические сыворотки* – единственное специфическое средство, способное нейтрализовать токсическое действие экзотоксинов в организме больного. Особенно эффективно раннее введение сыворотки, так как антитела-антитоксины способны нейтрализовать токсин только до его адсорбции на клетке-«мишени».

Антитоксические сыворотки, полученные из крови лошадей, гипериммунизированных соответствующим анатоксином, подвергают концентрации и очистке от балластных веществ методом «Диаферм», который включает высаливание альбуминов сернокислым аммонием, ферментативное расщепление неиммунных глобулинов и диа-

лиз. Полученную сыворотку титруют (обычно используют реакцию флоккуляции) для определения её антитоксической активности, измеряемой в международных единицах - МЕ. Применяют следующие антитоксические гетерологичные сыворотки: *противодифтерийная, противостолбнячная, противоботулические* (поливалентная и моновалентные препараты типов А, В, Е и др.), *противогангренозные* (как поливалентная, так и моновалентные препараты против Clostridium perfringens типа А, Clostridium novii, Clostridium septicum) и другие.

*Антибактериальные сыворотки* с развитием антибиотико- и химиотерапии почти утратили своё значение и применяются редко, при некоторых инфекционных заболеваниях, например при сибирской язве.

*Антивирусные сыворотки* оказывают хороший эффект только при раннем введении – в первые 3-4 дня после возможного заражения вирусным агентом. Они нейтрализуют внеклеточные вирусы, препятствуют их прикреплению к клеткам, и нейтрализуют вирусы, выходящие из клеток. Более позднее введение противовирусной сыворотки неэффективно, так как вирус реплицируется внутри пораженных клеток, в которые антитела проникнуть не могут.

*Иммунные препараты, содержащие секреторные IgA.* Их получают из молозива коров, они содержат секреторные иммуноглобулины против условно-патогенных бактерий, применяют препараты местно или *per os*.

Гетерологичные сывороточные препараты содержат высокую концентрацию специфических антител, которая достигается много-кратной иммунизацией животных. Они применяются для экстренной профилактики и лечения при отсутствии гомологичных иммуноглобулинов (человека) соответствующей специфичности, эффективность их зависит от срока заболевания и дозы введенной сыворотки.

Таблица 16

**Гетерологичные лечебно-профилактические сыворотки и иммуноглобулины**

Наименование препарата	Применение
1. Сыворотка противостолбнячная лошадиная очищенная концентрированная	Для экстренной профилактики столбняка и лечения в максимально ранние сроки заболевания
2. Сыворотка противодифтерийная лошадиная очищенная концентрированная	Лечение дифтерии, доза сыворотки зависит от тяжести и локализации поражения
3. Сыворотки противоботулические типов А, В, Е, лошадиные очищенные концентрированные	Для экстренной профилактики и лечения в максимально ранние сроки с момента появления первых симптомов ботулизма
4. Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная очищенная концентрированная ( <i>C.perfringens</i> t.A, <i>C.novyi</i> , <i>C.septicum</i> )	Для экстренной профилактики и лечения газовой гангрены
5. Иммуноглобулин противолептоспирозный из сыворотки крови волов содержит антитела против шести серологических групп лептоспир	Лечение лептоспироза с первого дня заболевания
6. Иммуноглобулин противосибиреязвенный лошадиный	Для экстренной профилактики и лечения сибирской язвы у людей немедленно после установления диагноза
7. Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади	Для экстренной профилактики бешенства при отсутствии человеческого антирабического иммуноглобулина
8. Иммуноглобулин против клещевого энцефалита из сыворотки лошадей	Для экстренной профилактики клещевого энцефалита при отсутствии специфического иммуноглобулина человека в случае присасывания клещей в очагах клещевого энцефалита
9. Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл содержит очищенную фракцию глобулинов иммунного молозива коров	Применяют рег ос для лечения диарейных заболеваний, а также гнойно-воспалительных заболеваний, вызванных <i>S.typhimurium</i> , <i>S.enteritidis</i> , <i>S.dublin</i> , <i>P.mirabilis</i> , <i>P.vulgaris</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>P.aeruginosa</i>

### **3. Гомологичные (аллогенные) сывороточные препараты**

Гомологичные препараты представлены иммуноглобулинами, иногда плазмой, их получают от здоровых людей, специально иммунизированных доноров или реконвалесцентов, перенесших соответствующее инфекционное заболевание.

Иммуноглобулины человека (ИГЧ) получают из сыворотки или плазмы крови, удаляя балластные глобулиновые фракции и концентрируя этиловым спиртом при температуре ниже 0°C. Препараты представляют собой 10% раствор белка, в котором не менее 95% приходится на гамма-фракцию, содержащую преимущественно антитела иммуноглобулины. Препараты не содержат консервантов, они проверены на отсутствие антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусу гепатита С и к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsA).

Гомологичные коммерческие иммуноглобулиновые препараты выпускают для внутримышечного, внутривенного и перорального введения.

В большинстве случаев ИГЧ вводят внутримышечно, реакция на введение, как правило, отсутствует.

Для лечения тяжелых бактериально-септических и вирусных инфекций применяют ИГЧ для внутривенного введения с хорошей клинической переносимостью. Препараты лишены антикомплементарной активности, не способны к агрегированию, имеют измененные структуры Fc-фрагментов, ответственных за прикрепление к клеточным мембранам. В России зарегистрированы несколько препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения зарубежного производства.

Иммуноглобулины для перорального применения используют для лечения диареи, энтероколитов, вызванных патогенными и условно-патогенными бактериями. В состав препаратов входит белковая фракция сыворотки крови, содержащая антитела классов IgM, IgG, IgA в смеси с пектином, предохраняющим иммуноглобулины от разрушения в ЖКТ.

В зависимости от способа введения, пассивный иммунитет возникает сразу (при внутривенном введении) или через несколько часов – при внутримышечном введении иммуноглобулинов. В организме реципиента, гомологичные иммуноглобулины сохраняют свою активность в течение 4-5 недель.

Изготавливают 2 типа иммуноглобулинов: нормальный и иммуноглобулины направленного действия (таблица 17).

**Иммуноглобулин человека нормальный.** Для его изготовления используют сыворотку или плазму, полученную не менее чем от 1000 здоровых людей. Препарат содержит широкий спектр антител различной специфичности и отражает состояние коллективного иммунитета контингента доноров. Нормальный иммуноглобулин человека выпускается для внутримышечного и внутривенного введения.

Иммуноглобулин человека нормальный применяется:

- для экстренной профилактики кори, гриппа, вирусного гепатита, коклюша, менингококковой инфекции, полиомиелита;
- для лечения гипо- и агаммаглобулинемии;
- в период реконвалесценции инфекционных заболеваний для повышения резистентности организма.

**Иммуноглобулины человека направленного действия** имеют повышенный титр соответствующих антител (гипериммунные иммуноглобулины), их получают из сыворотки или плазмы иммунизированных доноров или реконвалесцентов путем очистки и концентрации методом фракционирования этиловым спиртом при температуре ниже 0°C. Эти препараты весьма эффективны при целенаправленной экстренной профилактике и терапии гриппа, клещевого энцефалита, бешенства, ветряной оспы и опоясывающего лишая, гепатита А, гепатита В, японского энцефалита, цитомегаловирусной инфекции, столбняка, стафилококковой и синегнойной инфекции и др.

Препараты иммуноглобулинов содержат, как правило, специфические антитела преимущественно класса IgG, однако при некоторых инфекциях ведущая защитная роль принадлежит другим классам иммуноглобулинов, поэтому выпускают препараты, с повышенной концентрацией определенного класса иммуноглобулинов: «октагам» (содержит повышенную концентрацию IgG), «пентаглобулин» (обогащен классом IgM) и «интраглобулин» (обогащен классом IgA).

**Препараты иммунной плазмы** получают из крови доноров, иммунизированных соответствующей вакциной, они содержат специфические антитела в высоком титре. Плазму назначают лицам всех возрастов, вводят внутривенно. Применяют иммунную плазму для лечения синегнойной, стафилококковой, протейной инфекций.

Таблица 17

**Гомологичные иммуноглобулины**

Наименование препарата	Применение
1. Иммуноглобулин человека нормальный для внутримышечного введения	Предназначен для профилактики кори, гепатита А, коклюша, гриппа, менингококковой инфекции, полиомиелита, для лечения гипо- и агамаглобулинемии и для повышения резистентности организма в период реконвалесценции
2. Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения	Для лечения тяжелых форм бактериально-септических и вирусных инфекций, а также послеоперационных осложнений, сопровождающихся септицемией
3. Иммуноглобулин противостолбнячный человека	Для экстренной профилактики столбняка
4. Иммуноглобулин человека противококлюшный антитоксический	Для лечения токсических форм коклюша
5. Иммуноглобулин человека против гепатита В (Гепатект для в/в)	Для профилактики гепатита В новорожденным от матерей, положительных на HBsAg, и лицам, случайно инфицированным кровью, позитивной на HBsAg
6. Иммуноглобулин человека для профилактики бешенства (ИМОГАМ РАБИС)	Для профилактики бешенства одновременно с первой дозой антирабической вакцины
7. Иммуноглобулин против клещевого энцефалита человеческий	Для экстренной профилактики и лечения клещевого энцефалита
8. Циготект – иммуноглобулин с высоким содержанием антител к вирусу цитомегалии	Для лечения и экстренной профилактики цитомегалии
9. Иммуноглобулин стафилококковый человека, выпускают препараты для в/м и в/в введения	Лечение заболеваний стафилококковой этиологии. Препарат для в/в введения предназначен для лечения заболеваний, сопровождающихся бактериемией и септицемией
10. Центаглюбин – иммуноглобулин с высоким содержанием антител класса IgM	Для лечения тяжелых бактериальных инфекций
11. Сыворотка молозивная человека очищенная (Чигайн) получают от здоровых рожениц на 2-3-е сутки после родов, содержит антитела класса IgA в высокой концентрации	Для профилактики и лечения у новорожденных ОРВИ, конъюнктивитов и омфалитов, молочницы и стоматитов, гнойничковых заболеваний кожи
12. Плазма синегнойная человеческая и плазма антисинегнойная антитоксическая	Препараторы вводят в/в для лечения гнойно-воспалительных и септических инфекций, вызванных синегнойной палочкой,

## **4. Осложнения, возникающие при применении гетерологичных сывороточных препаратов**

**Сывороточная болезнь** – аллергическое заболевание, возникающее после однократного (первичного) парэнтального введения в организм больших доз гетерологичных сывороточных препаратов. Заболевание развивается, как правило, через 7-12 дней и характеризуется лихорадкой, полиморфными кожными высыпаниями с сильным зудом, болью в суставах, отеками и увеличением лимфатических узлов. Продолжительность заболевания составляет от нескольких дней до 2-х недель и прекращается после выведения антигена (сывороточного белка).

В основе сывороточной болезни лежит иммунологическая реакция гиперчувствительности III типа (иммунокомплексная). Введение чужеродных белков вызывает выработку специфических антител, которые связывают эти белки с образованием иммунных комплексов (ИК). При избытке антигена образуется большое количество нерасторимых ИК. Чаще всего эти комплексы откладываются на клетках эндотелия мелких сосудов и других клетках, вызывая их повреждения. Это приводит к тромбозам, кровоизлияниям, отекам. В участках поврежденных сосудов и тканей развивается воспалительный процесс с участием комплемента (анафилотоксины С3a и С3b), тромбоцитов, гранулоцитов, провоспалительных цитокинов, что ведет к дальнейшему повреждению органов и тканей.

**Анафилактический шок** – острое проявление аллергии, угрожающее жизни организма и развивающееся при повторном введении чужеродных антигенов (белков, сывороток, вакцин, лекарственных препаратов, ядов насекомых и др.).

Анафилактический шок начинается остро, почти мгновенно и может протекать молниеносно. Различают четыре степени развития заболеваний по тяжести. При крайне тяжелой форме заболевания с потерей сознания (коллапс), больной может погибнуть в течение 5-30 минут от удушья (острой сердечно-сосудистой недостаточности, острого бронхоспазма) или через 24-48 часов и позже в связи с необратимыми изменениями жизненно важных органов.

В основе развития анафилактического шока лежит реакция гиперчувствительности немедленного типа (1 тип – анафилактический), вызываемая иммуноглобулинами класса Е (IgE). При первичном контакте

организма с антигеном (например, с белком лошадиной сыворотки) образуются специфические антитела класса IgE, они прикрепляются своими Fc-фрагментами к рецепторам тучных клеток и базофилов. Повторно введенный в сенсибилизированный организм антиген связывается с фиксированными на клетках молекулами IgE, образуя комплексы {IgE-Аг}, это приводит к выбросу (высвобождению) из гранул тучных клеток и базофилов медиаторов аллергии – гистамина, брадикинина, серотонина, и других субстанций аллергии. Медиаторы вызывают расширение кровеносных сосудов, что ведет к падению артериального давления, повышают проницаемость капилляров, способствуя развитию отеков, вызывают спазм гладкой мускулатуры и другие общие и местные проявления анафилаксии.

Для предотвращения аллергических реакций на гетерологические сывороточные препараты пациенту в обязательном порядке ставят кожную пробу. За 1 час до введения полной дозы сыворотки внутривенно вводят 0,1 мл этого препарата, разведенного 1:100. Через 20 минут учитывают результат. Проба считается положительной, если в месте введения развивается гиперемия диаметром больше 1 см. При отрицательной кожной пробе (отсутствии гиперемии или ее диаметр менее 1 см) пациенту вводят подкожно 0,1 мл неразведенной сыворотки, при отсутствии у него в течение 30-45 минут местных и общих реакций, вводят всю назначенную дозу сыворотки.

При положительной реакции на внутривенное и подкожное введение сыворотки, препарат назначают только по жизненным показаниям после нескольких этапов гипосенсибилизации. Считается, что введение малых доз сыворотки (по Безредке) оказывает некоторое десенсибилизирующее действие.

### **Контрольные вопросы по теме занятия**

1. Общие принципы иммунопрофилактики и иммунотерапии.
2. Что представляют собой лечебно-профилактические сыворотки, каково их назначение?
3. Как подразделяются лечебно-профилактические сыворотки? Приведите примеры разных типов препаратов.
4. Как получают антитоксические гетерологические сыворотки, способы их очистки и концентрации?

5. Назовите несколько примеров антитоксических сывороток, как измеряют их активность, каков принцип действия?
6. Укажите преимущества и недостатки гетерологичных иммунных препаратов.
7. Как получают гомологичные сыворотки и иммуноглобулины? Приведите примеры биопрепаратов.
8. Что представляет собой нормальный человеческий иммуноглобулин, как его получают, с какой целью применяют?
9. Назовите примеры гомологичных противовирусных иммуноглобулинов направленного действия, охарактеризуйте их действие.
10. Какие осложнения могут возникнуть у реципиента при введении сывороточных препаратов? Какие меры следует принимать для их предупреждения?
11. Что такое сывороточная болезнь, каков ее механизм, сроки возникновения и клинические проявления
12. Анафилактический шок, его механизм и клинические проявления

## **Занятие № 18**

**Тема: Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний (продолжение). Вакцины. Аллергены.**

**План занятия:**

1. Вакцины, их характеристика, подразделение. Общие требования к вакцинным препаратам.
2. Живые вакцины, принципы получения, состав, свойства, преимущества и недостатки. Примеры.
3. Инактивированные (убитые) корпскулярные вакцины, характеристика. Методы получения. Примеры.
4. Химические вакцины, характеристика. Адьюванты. Принципы получения. Примеры.
5. Анатоксины. Характеристика. Методы получения. Примеры. Ассоциированные вакцины, примеры.
6. Генно-инженерные (рекомбинантные) вакцины, характеристика. Принципы получения. Примеры.
7. Национальный календарный план профилактических прививок.
8. Инфекционные аллергены, применение. Примеры

### **1. Общая характеристика вакцин**

**Вакцины – иммунобиологические препараты, изготавляемые из живых аттенуированных или инактивированных микроорганизмов, токсинов, микробных антигенов и используемые для создания специфического активного искусственного иммунитета.**

В основном вакцины применяют с профилактической целью, значительно реже – с лечебной (при хронических, затяжных инфекционных заболеваниях).

Впервые вакцинацию (*vaccinus* – коровий) для защиты людей от натуральной оспы с помощью прививки коровьей оспы осуществил Эдуард Дженнер в 1796 г. В память о нем Л. Пастер предложил все препараты, применяемые для создания противоинфекционного иммунитета, называть *вакцинами*.

Л. Пастер сформулировал *фундаментальный принцип вакцинации*: для создания напряженного иммунитета против высоковирулентных микроорганизмов можно применять препараты из тех же микроорганизмов, но с ослабленной путем определенного воздействия вирулент-

ностью. Метод снижения вирулентности возбудителей инфекционных заболеваний был назван *аттенуацией*, а культуры с ослабленной вирулентностью – *аттенуированными штаммами*. Л.Пастер получил разработанным им методом аттенуации несколько вакцин: против куриной холеры, сибирской язвы и бешенства (вакцина была создана до открытия вирусов).

**Подразделение вакцинных препаратов.** Все вакцинныe препарата, применяемые в настоящее время, можно разделить по составу на корпускулярные (живые и инактивированные), растворимые (химические и анатоксины) и генно-инженерные; по назначению – на профилактические и лечебные (см. граф 4).

Различают несколько поколений вакцин:

- вакцины первого поколения – корпускулярные вакцины, состоящие из целых микроорганизмов живых или убитых;
- вакцины второго поколения - препараты, состоящие из отдельных фракций возбудителей или продуктов их жизнедеятельности – химические вакцины и анатоксины;
- вакцины третьего поколения – рекомбинантные вакцины, получаемые генно-инженерными методами.

В стадии разработки находятся и другие более совершенные типы вакцин.

**Основные требования к вакцинным препаратам:**

- высокая иммуногенность и создание достаточно стойкого иммунитета;
- остаточная вирулентность для аттенуированных штаммов и стабильность их свойств;
- безвредность;
- ареактивность (отсутствие выраженных побочных реакций);
- гипоаллергенность (минимальное сенсибилизирующее действие);
- отсутствие в препарате контаминирующих микроорганизмов;
- доступность стоимости производства.

Многие современные вакцины не полностью отвечают этим требованиям, поэтому продолжается исследовательская работа как по их совершенствованию, так и по созданию принципиально новых вакцинных препаратов.

**Вакцинация.** Эффективность вакцинации зависит от биологических свойств возбудителей и изготовленных из них препаратов, способов введения вакцин и иммунореактивности макроорганизма.

Вакцинныe препараты могут вводиться в организм человека парэнтально (внутримышечно, подкожно, внутрикожно, в скарифицированную кожу), перорально, интраназально, а также в свечах и клизмах.

Для выработки прочного и длительного иммунитета необходим достаточный контакт макроорганизма и антигена, поэтому во многих случаях применяется повторная вакцинация (ревакцинация), причем сроки очередного введения конкретной вакцины зависят от свойств данного биопрепарата. Требуется определенный период времени для развития гуморального и/или клеточного иммунного ответа.

Не у всех вакцинированных лиц возникает достаточная степень невосприимчивости, у некоторых людей по тем или иным причинам иммунореактивность снижена, может развиться иммунодефицитное состояние, что препятствует формированию полноценного иммунитета.

Эффективность иммунизации зависит от типа и качества применяемой вакцины и способности возбудителя заболевания вызывать стойкий постинфекционный иммунитет.

Вакцины для сохранения полноценных свойств требуют строгого соблюдения особых условий хранения и транспортировки.

## **2. Живые вакцины, принципы получения, характеристика**

Живые вакцины готовят из вакцинных штаммов бактерий, риккетсий, вирусов, полученных различными методами селекции. Вакцинныe штаммы являются аттенуированными (ослабленными), сохранившими незначительную остаточную вирулентность и не способны вызвать клинически выраженную инфекцию. Их получают путем снижения вирулентности микроорганизма при культивировании в неблагоприятных условиях (при пониженнной или повышенной температуре, на питательных средах с определенными добавками) или путем пассажей на маловосприимчивых животных, в куриных эмбрионах и клеточных культурах, выделением аттенуированных мутантов от больных или из внешней среды, воздействием мутагенов. В аттенуированных штаммах

инактивированы или репрессированы гены, ответственные за образование факторов вирулентности.

Вакцинныe штаммы обладают способностью «приживаться» в организме человека или животного. Аттенуированные микроорганизмы размножаются в месте введения, проникают в лимфоузлы, попадают во внутреннюю среду организма. Возникает «вакцинная инфекция» без выраженных клинических симптомов, но с развитием иммунного ответа и формированием иммунологической памяти. После завершения вакцинального процесса организм приобретает постvakцинальный иммунитет, (клеточный и/или гуморальный) по своей напряженности приближающийся к постинфекционному.

К преимуществам живых вакцин относятся высокая иммуногенность (формируется длительный и напряженный иммунитет), простота способа введения (как правило, однократно – накожно, внутрикожно, перорально, интраназально). При естественных путях введения аттенуированный штамм микроорганизма формирует и местный иммунитет, обусловленный синтезом секреторного IgA на слизистых оболочках.

*Недостатки живых вакцин.* Получение живых вакцин – длительный и трудоемкий процесс. Они требуют особого режима хранения, постоянного нахождения при низкой температуре (2–8°C) и очень чувствительны к его нарушению. Не исключена опасность реверсии вакцинного штамма в вирулентный, как на стадии производства (поэтому необходим постоянный контроль), так и в организме вакцинированного. На практике реверсия возникает крайне редко. После вакцинации возможно развитие осложнений. У лиц, страдающих иммунодефицитами, живая вакцина может вызывать тяжелое течение вакцинной инфекции, а также обострение других хронических заболеваний. Поэтому для таких категорий людей использование живых вакцин противопоказано и следует применять инактивированную вакцину (например, при специфической профилактике полиомиелита).

После введения живой вакцины бактериальной природы в течение продолжительного времени (до 2 – 2,5 месяцев) нельзя принимать антибиотики.

В настоящее время применяют живые вакцины для профилактики:  
**бактериальных инфекций:** туберкулезная (БЦЖ), сибирязвенная, чумная, туляремийная, бруцеллезная;

**вирусных инфекций:** полиомиелитная, гриппозная, коревая, паротитная, краснушная, против желтой лихорадки;

**риккетсиозов** – вакцина против Ку-лихорадки и сыпного тифа.

Подавляющее большинство живых вакцин выпускают в сухом виде – лиофильно высушенными с добавлением стабилизаторов (например, в желатиново-сахарозной среде), что способствует сохранению жизнеспособности вакцинного штамма. Исключением является живая полиомиелитная вакцина, выпускаемая в жидким виде.

### Примеры живых вакцин

**Вакцина туберкулезная (БЦЖ)** – из вакцинного штамма Кальметта и Герена (*Bacille Calmette-Guerin*). Штамм БЦЖ получен из вида *Mycobacterium bovis* путем длительного пассирования (230 пересевов в течение 13 лет) на картофельно-глицериновой среде с добавлением желчи. БЦЖ является делеционным мутантом, лишенным фактора патогенности – воска Д, но сохранившим остаточную вирулентность.

Вакцина выпускается для внутрикожного применения в виде двух препаратов – БЦЖ и БЦЖ-м (со сниженной антигенной нагрузкой), содержит штамм БЦЖ-1, лиофильно высушенный в 1,5% растворе натрия глютамиата.

Вакцинацию проводят в роддоме всем новорожденным на 3-7 день после рождения внутрикожно. Ревакцинацию проводят лицам с отрицательной туберкулиновой пробой в 7, 14 лет и далее с интервалом в 5 лет.

**Вакцина сибирязвенная СТИ** получена отечественными учеными Гинсбургом и Тамариным методом селекции из стареющих культур *Bacillus anthracis*, выращенных на сывороточной среде, она представляет собой делеционный мутант *B.anthracis*, потерявший способность образовывать капсулу. Вакциниальный препарат содержит споры аттенуированного бескапсульного штамма СТИ-1.

Вакцина выпускается для накожного (скарификационного) и подкожного применения в лиофилизированном виде.

Вакцинацию людей против сибирской язвы проводят по эпидемиологическим, эпизоотическим и профессиональным показаниям.

**Полиомиелитная пероральная живая вакцина Себина (Sebin) 1,2,3 типов, жидкая.** Содержит аттенуированные штаммы вирусов полиомиелита типов 1,2,3 Себина, выращенных на культуре клеток почек зеленых мартышек.

Полиомиелитная живая вакцина моделирует инфекционный процесс с развитием длительного гуморального (антитела класса IgG) и местного иммунитета (антитела класса IgA).

Вакцина включена в государственный календарный план прививок. Детей вакцинируют, начиная с 3-х месячного возраста и до 6 лет.

**Вакцина гриппозная аллантоисная очищенная живая сухая** (Жданов и др.) для интраназального применения. Препарат состоит из вакцинных штаммов вируса гриппа, аттенуированных путем пассивирования на куриных эмбрионах. Вакцину получают из вирусодержащей аллантоисной жидкости куриного эмбриона, очищенной методом ультрацентрифугирования. Лиофилизированная вакцина выпускается в виде монопрепаратов, содержащих вакцинныe штаммы вирусов гриппа H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> и B, вводится интраназально.

Применяется по эпидемиологическим показаниям в осенне-зимний период.

### **3. Инактивированные корпускулярные вакцины, принципы получения, характеристика**

Инактивированные (убитые) корпускулярные вакцины содержат микробные клетки или вирионы (корпускулярные бактериальные и цельновирионные вакцины). Для их приготовления используют, вирулентные микроорганизмы, содержащие протективные антигены, активность которых должна сохраняться после инактивирующего воздействия факторов физической (нагревание, ультрафиолетовое излучение) или химической природы (спирт, формальдегид, фенол, ацетон, глутаровый альдегид и др.) или комбинацией обоих факторов.

Инактивированные вакцины, как правило, вызывают иммунный ответ гуморального типа. Они создают менее напряженный иммунитет с меньшей длительностью, чем живые вакцины, не индуцируют местный иммунитет, требуется их 2-3х-кратное введение, частое проведение повторных курсов иммунизации, что позволяет создать достаточно прочный иммунитет, предохраняя привитых от заболевания или уменьшая его тяжесть. Убитые корпускулярные вакцины обладают выраженной токсичностью и аллергенностью. Их важнейшее преимущество по сравнению с живыми – они никогда не вызывают инфекционное заболевание.

**Примеры инактивированных корпускулярных вакцин, применяемых для профилактики инфекционных заболеваний:**

**Вакцина брюшнотифозная спиртовая сухая** содержит инактивированные этиловым спиртом и лиофильно высушенные бактерии *S.typhi*. Применяется для профилактики брюшного тифа.

**Вакцина холерная корпускулярная инактивированная сухая** содержит взвесь равных количеств *Vibrio cholerae* сероваров Огава и Инаба классических или Эльтор, инактивированных нагреванием или формалином, лиофильно высушенных. Предназначена для активной профилактики холеры по эпидпоказаниям.

**Лептоспирозная вакцина инактивированная жидкая.** Препарат представляет собой смесь убитых нагреванием культур лептоспир четырех серологических групп – *L.icterohaemorrhagia*, *L.grippotyphosa*, *L.rotonota*, *L.hebdomadis*.

Вакцина предназначена для плановой профилактики лептоспироза взрослых с профессиональным риском заражения и населения по эпидпоказаниям.

**Вакцина антирабическая (против бешенства) культуральная инактивированная сухая.** Препарат содержит вирусы бешенства (вакциниальный штамм Внуково-32), выращенные в культуре клеток, инактивированные УФ-светом, очищенные и лиофильно высушенные.

Вакцина предназначена для активной профилактики и лечения (в инкубационном периоде) бешенства людей, подвергшихся нападению, укусам или ослонению кожных покровов подозрительных на бешенство или неизвестных животных.

**Инактивированная гриппозная вакцина (ИГВ).** Препарат представляет собой взвесь вирусов гриппа H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> и В, выращенных на 10-11-дневных куриных эмбрионах, инактивированных формалином и ультрафиолетовым облучением, концентрированную и очищенную ультрацентрифугированием или хроматографией.

Препарат вводится парентерально (подкожно) или интраназально для профилактики гриппа в осенне-зимний период.

**Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая.** Препарат состоит из очищенной и концентрированной взвеси вируса клещевого энцефалита штамма «Софьян» или «205», инактивированной формальдегидом и лиофилизированной.

Препарат предназначен для профилактики населения против клещевого энцефалита и для вакцинации доноров с целью получения специфического иммуноглобулина

**Вакцина гепатита А культуральная концентрированная очищенная инактивированная адсорбированная жидкая («ГЕП-А-ин-ВАК»).** Препарат содержит очищенную и концентрированную взвесь вируса гепатита А штамма ЛБА-86, инактивированную формальдегидом и адсорбированную на гидроксида алюминия.

Вакцина предназначена для активной профилактики вирусного гепатита А.

**Примеры лечебных инактивированных корпускулярных вакцин.** Инактивированные вакцины применяют для лечения некоторых длительно текущих инфекций в качестве иммуностимулирующей терапии.

**Вакцина бруцеллезная лечебная жидкая из взвеси бруцелл *Brucella melitensis* и *Brucella abortus*, убитых нагреванием;**

**Вакцина гонококковая инактивированная** – из нескольких свежевыделенных штаммов от больных с различными клиническими формами гонореи;

**Вакцина стафилококковая инактивированная** – взвесь из нескольких штаммов стафилококков, консервант – фенол;

**Герпетическая инактивированная сухая вакцина** – из вирусов герпеса простого типов I и II, выращенных на культуре фибробластов куриного эмбриона; инактивирована формалином, лиофилизирована.

**Аутовакцины.** Инактивированные вакцины для лечения вяло и длительно текущих инфекций иногда готовят из штаммов возбудителей, выделенных от больных. Такие препараты называются аутовакцинами и их применяют, например, для лечения стафилококковых инфекций.

## **4. Химические вакцины, их характеристика**

Химические – субклеточные, субвирионные и молекулярные вакцины содержат протективные антигенные комплексы микроорганизмов, в значительной степени очищенные от балластных веществ. Их получают из белковых, полисахаридных или липидных фракций микробных клеток, в некоторых случаях используют рибосомальные фракции.

Аналогами бактериальных химических вакцин являются вирусные субъединичные вакцины, содержащие отдельные структурные компоненты вирионов.

Химические вакцины обладают иммуногенностью и хорошо переносятся, у них низкая реактогенность и аллергенность, они менее токсичны, чем корпускулярные вакцины (цельноклеточные или цельновирионные).

Это препараты высокой степени очистки, что снижает их иммуногенность. Поэтому в химические вакцины добавляют специальные вещества - *адьюванты*, неспецифически усиливающие иммуногенность вакцинных антигенов .

Стимулирующее действие адьювантов может проявляться в создании «депо» антигена, замедляющее его всасывание, индукции воспалительной реакции, усиления реакции со стороны лимфатических узлов, ускорения транспорта антигенов к иммунокомпетентным клеткам, стимуляции цитокинов и др.

Адьюванты, добавляемые к вакцине, должны распадаться в организме. В качестве адьювантов применяют минеральные соединения (соли алюминия или кальция, например гидроксид алюминия), растительные вещества (сапонины), микробные препараты (корпускулярные или субъединичные структуры), синтетические вещества (полиоксидоний) или сложные искусственные адьювантные системы (липосомы, микрокапсулы).

Адьюванты вводят одновременно с вакцинным антигеном или незадолго до его введения.

**Примеры химических вакцин:**

***Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная жидкая (ВИ-АНВАК).*** Препарат содержит раствор капсулного полисахарида, извлеченного из культуры *Salmonella typhi*, очищенного ферментативными и физико-химическими методами. Для активной профилактики

брюшного тифа вакцина вводится как самостоятельная вакцина или совместно с брюшнотифозной спиртовой корпускулярной вакциной.

**Вакцина менингококковая групп A и C полисахаридная сухая.** Препарат содержит очищенные капсульные специфические полисахариды *Neisseria meningitidis* серогрупп А и С. Применяется для активной профилактики менингококковой инфекции, вызванной менингококками серогрупп А и С по эпидпоказаниям или в очагах менингококковой инфекции.

**Вакцина сыпнотифозная химическая сухая** содержит очищенный и концентрированный поверхностный (протективный) растворимый антиген риккетсий Провацека. Применяется по эпидпоказаниям.

**Вакцина холерная (холероген-анатоксин + О-антитела)** сухая и жидккая. Препарат содержит очищенный холероген-анатоксин и соматический О-антитела, полученные из штамма *Vibrio cholerae* 569B, серовара Инаба, инактивированный формалином. Вакцина применяется по эпидпоказаниям.

**Вакцина гриппозная тривалентная полимер-субъединичная жидккая (Гриппол).** Высокоочищенный белковый препарат, содержащий только поверхностные антигены вируса гриппа (гемагглютинин и нейраминидаза) трех подтипов вирусов гриппа – H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> и В. В состав вакцины входит водорастворимый полимерный иммуностимулятор – полиоксидоний (искусственный адьювант) обеспечивающий повышение иммуногенности и большую стабильность антигенов.

Вакцинацию проводят в осенне-зимний период, подкожно.

## 5. Анатоксины, принцип получения, свойства

**Анатоксины.** Их нередко относят к молекулярным вакцинам. Анатоксины получают из бактериальных экзотоксинов путем 3-5-недельного воздействия 0,3-0,4% формалина при температуре 37-40°C. При совместном действии этих факторов экзотоксин теряет свою ядовитость, сохраняя антигенные и иммуногенные свойства. Полученные анатоксины подвергают очистке от балластных веществ (питательной среды, продуктов метаболизма и распада микробных клеток), концентрируют и адсорбируют на гидроксида алюминия, что существенно повышает их иммуногенность. У анатоксинов относительно низкая реактогенность, поэтому мало противопоказаний к применению. Очи-

щенные адсорбированные анатоксины выпускают в жидким виде. Их применяют для создания антитоксического иммунитета против таких инфекций, как дифтерия, столбняк, газовая анаэробная инфекция, ботулизм, стафилококковая и синегнойная инфекции и другие, возбудители которых выделяют экзотоксины, играющие первостепенную роль в патогенезе заболеваний (протективные антигены).

**Примеры анатоксинов:**

*Анатоксин дифтерийный очищенный адсорбированный (АД-анатоксин).* Препарат содержит очищенный дифтерийный анатоксин, сорбированный на алюминия гидроксиде.

*Анатоксин столбнячный очищенный адсорбированный (АС-анатоксин).* Препарат содержит очищенный столбнячный анатоксин, сорбированный на алюминия гидроксиде.

*Анатоксин дифтерийно-столбнячный очищенный адсорбированный (АДС-анатоксин) жидкий.* Препарат состоит из смеси дифтерийного и столбнячного анатоксинов, сорбированных на алюминия гидроксиде. Препарат применяется для плановой вакцинации детей и вакцинации взрослых по эпидпоказаниям.

*Препараты анатоксинов дифтерийного, столбнячного, дифтерийно-столбнячных очищенные, с уменьшенным содержанием антигенов, жидкие (АД-М-, АС-М- и АДС-М-анатоксины).* Препараты применяют для плановой и экстренной профилактики дифтерии и столбняка.

*Анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный.* Препарат содержит очищенный анатоксин, сорбированный на алюминия гидроксиде. Применяется для вакцинации групп населения с повышенным риском заболевания, а также для иммунизации доноров с целью получения антистафилококковой плазмы и антистафилококкового иммуноглобулина. .

*Анатоксин синегнойной палочки адсорбированный жидкий.* Препарат представляет собой обезвреженный формалином и теплом экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa*. Предназначен для профилактики синегнойной инфекции.

*Трианатоксин очищенный адсорбированный.* Препарат содержит смесь очищенных бутулинических анатоксинов типов А, В и Е, сорбированных на гидроксиде алюминия. Предназначен для активной профилактики ботулизма.

**Тетраанатоксин очищенный адсорбированный.** Препарат содержит смесь ботулинических анатоксинов типов А, В, Е и столбнячного анатоксина. Предназначен для активной профилактики ботулизма и столбняка.

Для создания напряженного антитоксического иммунитета препараты анатоксинов обычно вводят двукратно, в последующем проводят ревакцинацию. В результате формируется иммунологическая память, поэтому повторное введение анатоксина людям, привитым 10 лет назад более, индуцирует быстрое образование антитоксических антител в достаточно высоких титрах, что используется для экстренной профилактики столбняка.

**Ассоциированные (комплексные) вакцины.** Представляют собой сочетание различных типов вакцин и предназначены для одновременной иммунизации против разных инфекций. Они могут состоять из однородных препаратов (например, нескольких анатоксинов) или различных типов вакцин. Наиболее эффективны и совместимы вакцины, сходные по физико-химическим свойствам. Если ассоциированная вакцина состоит из разных типов вакцин, то особое внимание при разработке уделяется количеству каждого из составляющих ее монопрепараторов. Отдельные компоненты такой вакцины должны быть взяты в дозировках, не создающих конкуренции, чтобы иммунитет формировался ко всем антигенам с одинаковой интенсивностью.

Применение комплексных вакцин приводит к снижению инъекционной нагрузки (уменьшению числа инъекций, связанных с ними стрессов и дополнительных рисков возникновения осложнений), а также понижению экономических затрат.

#### **Примеры ассоциированных профилактических вакцин.**

**Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая — АКДС-вакцина.** Препарат состоит из взвеси убитых коклюшных палочек (*Bordetella pertussis*) и очищенных дифтерийного и столбнячного анатоксинов, сорбированных на алюминия гидроксила.

Вакцина предназначена для плановой профилактики коклюша, дифтерии и столбняка детям в возрасте от 3-х месяцев.

**Инфанрикс АКДС-вакцина.** Ацеллюлярная (бесклеточная) вакцина, содержит сорбированные на гидроксиде алюминия дифтериный и столбнячный анатоксины и три компонента возбудителя коклюша (*Bordetella pertussis*) - коклюшный анатоксин, филаментозный гемагглютинин и пертактин.

Препарат обладает меньшей реактогенностью и более высокой эффективностью по сравнению с АКДС-вакциной.

*Триивакцина против кори, эпидемического паротита и краснухи – MMR, живая сухая (США).* Препарат содержит смесь живых аттенуированных штаммов вирусов кори, паротита и краснухи. Применяется для активной иммунизации детей.

*Вакцина «Tetrapok 05».* Ассоциированная цельноклеточная коклюшно-дифтерийно-столбнячно-полиомиелитная вакцина - состоит из очищенных дифтерийного и столбнячных анатоксинов, сорбированных на гидроксиде алюминия, инактивированных коклюшных бактерий и инактивированной полиомиелитной вакцины серотипов 1, 2 и 3.

## 6. Генноинженерные вакцины

Получение вакцин с помощью методов генетической инженерии - новый перспективный путь создания усовершенствованных биопрепараторов.

Основной принцип получения генноинженерных вакцин: из генома возбудителя инфекционного заболевания с помощью высокоспецифических ферментов – рестрикционных эндонуклеаз вырезают гены, отвечающие за синтез протективных антигенов этого возбудителя. Полученные гены встраивают в геном других, легко культивируемых, микроорганизмов (например, в *E.coli* или в дрожжевые клетки). Изучают экспрессию этих генов и отбирают наиболее эффективные клоны микроорганизмов, производящие новые протективные антигены. Такие клоны размножают, накапливая необходимый антиген в больших количествах. Препарат подвергают очистке с помощью физических и химических методов для освобождения от питательной среды и продуктов метаболизма культивируемого микроорганизма. В результате получают рекомбинантную вакцину, содержащую специфический протективный антиген (ее относят к инактивированным вакцинам). Для повышения иммуногенности в состав вакцины вводят адьювант. Развивающийся после введения генноинженерной вакцины иммунитет относительно кратковременный, и для его поддержания на должном уровне необходима ревакцинация. Таким методом получена и применяется генноинженерная вакцина для профилактики гепатита В.

*Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая жидкая.* Препарат содержит поверхностный антиген (подтип ayw) вируса

гепатита В - Hbs-антиген (протективный антиген HBV), выделенный из рекомбинантного штамма-продуцента *Saccharomyces cerevisiae*. сорбированный на гидроксиде алюминия.

Вакцина включена в государственный календарный план профилактических прививок. Первая вакцинация проводится в роддоме на 3-й день после рождения ребенка.

Другой вариант генно-инженерных вакцин – векторные вакцины (например, на основе осповакцины, вакцины БЦЖ и других), когда в вакциниальный штамм включают ген, контролирующий образование протективных антигенов других возбудителей. При вакцинации такой рекомбинантной вакциной создается иммунитет против двух и более инфекций. Например, получена рекомбинантная осповакцина с антигенами вириуса бешенства, клещевого энцефалита и др. Такие векторные живые вакцины прошли экспериментальную проверку и находятся в стадии клинических испытаний.

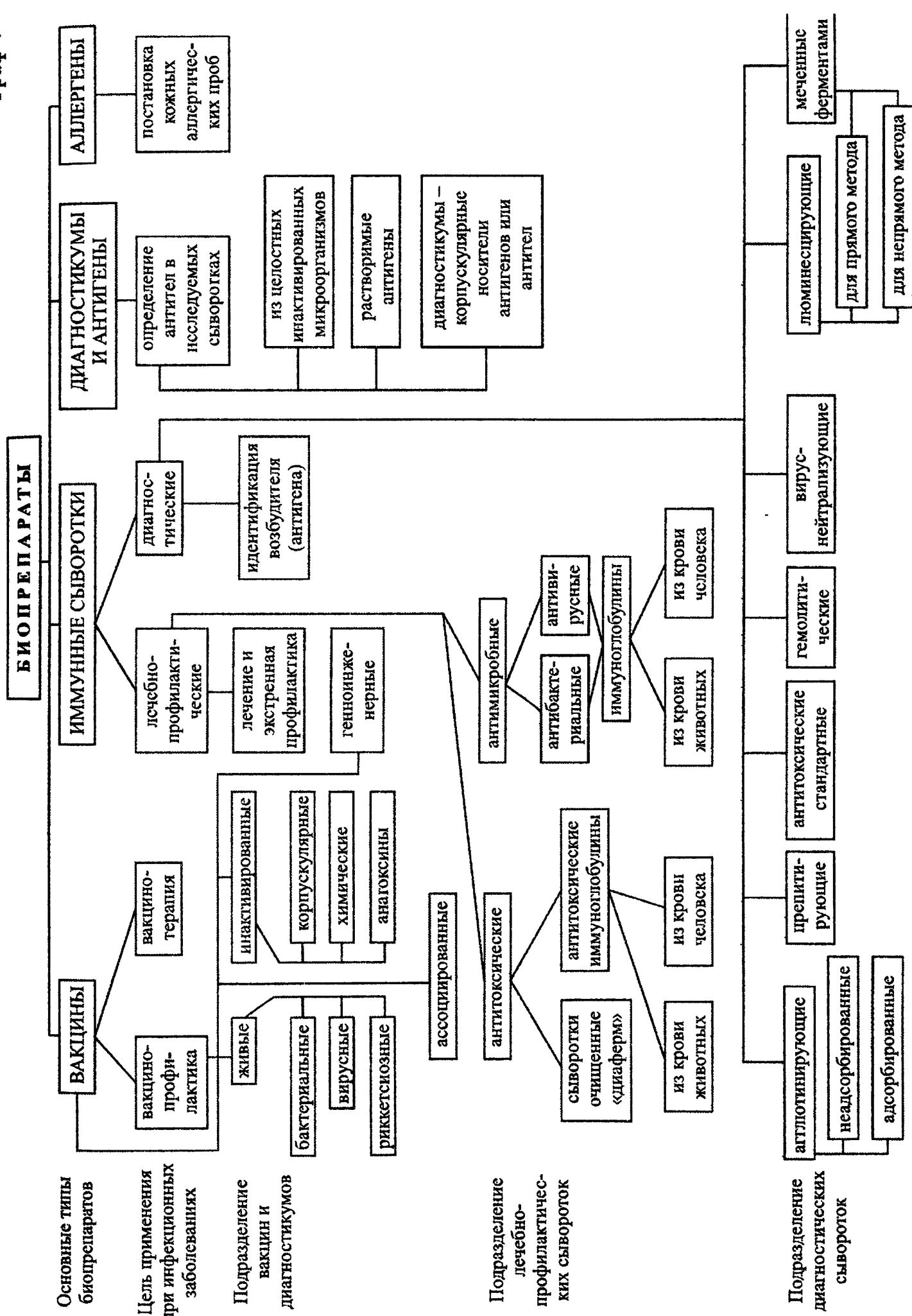
## **7. Национальный календарь профилактических прививок**

Согласно нациальному календарю прививок РФ всем детям в обязательном порядке проводится вакцинация против 10 нозологических форм – туберкулеза, вирусного гепатита В, дифтерии, коклюша, столбняка, полиомиелита, кори, краснухи, эпидемического паротита, гриппа (для определенных групп населения).

Против 13 нозологических форм вакцинация проводится только по эпидемиологическим показаниям – туляремия, чума, бруцеллез, сибирская язва, бешенство, лептоспироз, клещевой энцефалит, лихорадка Ку, желтая лихорадка, брюшной тиф, менингококковая инфекция, вирусный гепатит А, холера.

Задание: Рассмотреть национальный календарный план прививок России (таблица 18) и сравнить его с региональным календарем по г. Москве (таблица 19).

## Граф 4



**Национальный календарный план прививок России**  
**Приказ №162 от 16.04.2007г. МЗ РФ**

Таблица 18

Прививки против	Сроки вакцинации	Сроки ревакцинации			Примечание
		1	2	3	
Гепатита В	Новорожденные (первые 12 часов жизни)	1 мес	6 мес	-	Детям, родившимся от матери-носителей вируса гепатита В, вакцинация проводится по схеме 0-1-2-12 месяцев
Туберкулеза	3-7 день жизни	7 лет	14 лет		Ревакцинация проводится только туберкулиннегативным лицам
Коклюша Дифтерии Столбняка (АКДС)	3 месяца 4,5 месяца 6 месяцев	18 месяцев	7 лет АДС	14 лет АДС	Взрослым каждые 10 лет от момента последней вакцинации, АДС
Полиомиелита	3 месяца 4,5 месяца 6 месяцев	18 месяцев	20 месяцев	14 лет	Вакцинация проводится одновременно с АКДС (АДС) вакциной
Кори Краснухи Эпидемического паротита	12 месяцев	6 лет			

Таблица 19.

*Региональный календарь профилактических прививок по г. Москве*  
*Приказ №9 от 16.01.2009г. руководителя департамента здравоохранения г. Москвы!*

Прививка против	Сроки вакцинации	Сроки ревакцинации			Примечания
		1	2	3	
Гепатита В	Новорожденные дети (первые 24 часа жизни)	3 мес.	6 мес.		Детей, рожденных от матерей, носителей HBs-Ag, вакцинируют по схеме 0-1-2-12 мес.
Туберкулеза	Новорожденные дети (3-7 день жизни)	8 лет	14 лет		Новорожденных вакцинируют БЦЖ-М (сниженная антигенная нагрузка). Ревакцинация проводится БЦЖ-вакциной только туберкулиннегативным детям
Коклюша, дифтерии, столбняка	3 мес. 4,5 мес. 6 мес.	18 мес.	7 лет АДС	14 лет АДС	Вакцинация в 3; 4,5; б и ревакцинация в 18 мес. проводят АДС-АКаДС-вакциной. Ревакцинацию в 7 и 14 лет проводят АДС-анатоксином.
Полиомиелита	3 мес. 4,5 мес. 6 мес.	20 мес.	14 лет		Вакцинация детей первого года жизни проводится ИПВ (инактивированной полиомиелитной вакциной), последующие ревакцинации проводятся ОПВ (оральной атенуированной полиомиелитной вакциной)
Гемофильной инфекции	7 мес. или 18 мес.				Рекомендуется вакцинировать детей закрытых детских учреждений 3-х кратно или в 18 мес. однократно
Кори, краснухи, эпидемического паротита	12 мес.		6 лет		
Пневмококковой инфекции	24 мес.				Рекомендуется вакцинировать детей из групп риска (часто болеющих и страдающих заболеваниями бронхолегочной системы)
Ветряной оспы	24 мес.				Рекомендуется вакцинировать детей, ранее не болевших ветряной оспой
Гепатита А	3-6 лет				Рекомендуется вакцинировать детей, посещающих детские дошкольные учреждения
Рака шейки матки	12-13 лет				Рекомендуется вакцинировать девочек субъединичной вакциной вируса папилломы человека

## **8. Инфекционные аллергены**

**Инфекционные аллергены** применяют для диагностики инфекционных заболеваний путем постановки кожно-аллергических проб. Это биопрепараты, содержащие антигены возбудителей и предназначенные для выявления гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ, IV тип), которая возникает при многих инфекционных заболеваниях (стр. 29-30).

При постановке кожно-аллергических проб (обычно на внутренней поверхности предплечья) аллерген вводят внутркожно с помощью шприца или накожно – путем втирания в скарифицированный участок кожи. Через 24-48-72 часа на месте введения возникает воспалительная реакция с покраснением, образованием инфильтрата. Положительной считается интенсивная реакция с определенным размером инфильтрата для каждого аллергена.

Аллергические пробы обладают специфичностью, но бывают положительными также у переболевших ранее и привитых, что осложняет интерпретацию результатов кожной пробы.

Аллергены, используемые в диагностике инфекционных заболеваний, – это стандартные препараты, выпускаемые промышленностью. Их готовят из очищенных фильтратов бульонных культур возбудителей (или вакцинных штаммов), иногда из взвесей убитых бактерий или выделенных из них антигенов или белковых фракций.

**Примеры инфекционных аллергенов:**

**Туберкулин PPD** (Purified protein derivate) – сухой очищенный белок микобактерий туберкулеза;

**Альт-туберкулин Коха** – концентрированный фильтрат бульонной культуры микобактерий туберкулеза (сконцентрированный до 1/10 объема) – только для накожной пробы;

**Бруцеллин** – аллерген бруцеллезный жидкий для внутрикожного применения – раствор полисахаридно-белкового комплекса, полученного из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19ВА путем уксусного гидролиза;

**Антрааксин** – аллерген сибириязвенный жидкий для внутрикожной пробы – из вегетативных клеток сибириязвенного вакцинного штамма СТИ, освобожденных от балластных белков и подвергнутых слабому кислотному гидролизу;

**Тулярин** - аллерген туляремийный жидкий для внутрикожной пробы – взвесь убитых нагреванием бактерий туляремийного вакцинного штамма;

**Актинолизат** – фильтрат бульонной культуры лизированных штаммов актиномицет.

### **Контрольные вопросы по теме занятия**

1. Что такое вакцины? Какие требования предъявляют к вакцинным препаратам?
2. Подразделение вакцин, краткая характеристика каждого типа.
3. Какой принцип заложен в основу получения живых вакцин, какой ученый его предложил?
4. Что такое аттенуированный штамм, каким требованиям он должен отвечать, как взаимодействует с макроорганизмом?
5. Приведите примеры живых вакцин
  - а) против бактериальных инфекций;
  - б) против вирусных инфекций;
  - в) против риккетсиозов.
6. Что представляет собой вакцина БЦЖ?
7. Преимущества и недостатки живых вакцин.
8. Преимущества и недостатки убитых вакцин.
9. Что такое инактивированные вакцины, как их подразделяют?
10. Охарактеризуйте инактивированные корпскулярные вакцины, способы их инактивации, приведите примеры.
11. Что представляют собой химические вакцины? Приведите примеры.
12. В каких случаях вакцины применяют для иммунотерапии? Приведите примеры таких вакцин.
13. Что такое аутовакцины? Приведите примеры таких вакцин.
14. Что представляют собой антоксины? Их получение, применение, примеры.
15. Что представляют собой ассоциированные (комбинированные) вакцины? Приведите примеры.
16. Генноинженерные вакцины, принципы получения, пример такой вакцины.
17. Инфекционные аллергены, принцип их использования в диагностике инфекционных заболеваний. Приведите примеры.

## Литература

1. Л.Б.Борисов – Медицинская микробиология, вирусология, иммунология – Учебник. Издание 2-е, дополненное и переработанное. - М. МИА. 2001 г.
2. Под ред. А.А.Воробьева – Медицинская микробиология, вирусология и иммунология – Учебник. 2-е издание, исправленное и дополненное. – М. МИА. 2008 г.
3. Г.Н.Дранник – Клиническая иммунология и аллергология. – М. МИА. 2003 г.
4. П.Е.Игнатов – Иммунитет и инфекция. Возможности управления. - М. Время. 2002 г.
5. Под ред. А.М. Королюка, В.Б.Сбойчакова – Медицинская микробиология. Учебное пособие. 2-е издание. - С.Пб. ЭЛБИ-СПб. 2002 г.
6. А.И.Коротяев, С.А.Бабичев – Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. - Учебник. 3-е издание, исправленное и дополненное. - С.Пб. «Специальная литература». 2002 г.
7. Под ред. А.С.Лабинской, Л.П.Блинковой, Е.Г.Волиной – Руководство по медицинской микробиологии. Книга 1. Общая и санитарная микробиология. – М. БИНОМ. 2008 г.
8. Н.В.Медуницаин, В.И.Покровский – Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней – Учебное пособие. - М. «ГОЭТАР-Медиа». 2005 г.
9. Д.Мейл, Дж.Бростофф, Д.В.Рот, А.Ройтт – Иммунология – М. Логосфера. 2007 г.
- 10.Под ред. Н.А.Озерецкого, Г.И.Останина – Бактерийные, сывороточные и вирусные лечебно-профилактические препараты. Аллергены. Дезинфекционно-стерилизационные режимы поликлиник. – Справочник практического врача. – С.Пб. «Фолиант». 1998 г.
- 11.О.К.Поздеев – Медицинская микробиология – Учебник. 2-е издание, исправленное. - М.ГОЭТАР-МЕД. 2004 г.
- 12.Е.Е.Потемкина, Р.З.Позднякова, Л.М.Манукян – Пособие по лабораторной клинической иммунологии с курсом практических занятий. – М. Изд-во РУДН. 2003 г.
- 13.Под ред. В.В.Теца – Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М. Медицина. 2002 г.

14. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtmann, Shiv Pillai – Cellular and Molecular Immunology, 6/E. – 2007 г.
15. D. Greenwood, R.C.B. Slack, J.F. Peutherer – Cellular and Molecular Immunology: Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. – 2002 г.
16. P.R. Murray, K.S. Rosenthal, G.S. Kobayashi, M.A. Pfaller – Medical Microbiology. 4th Edition – 2002 г.

# **Содержание**

## **Противоинфекционный иммунитет**

1. Противоинфекционный иммунитет, сущность и принципы формирования.....	4
2. Антигены, их основные свойства. Антигены бактерий .....	6
3. Антитела. Классы иммуноглобулинов, их строение и функции .....	11
4. Иммунная система организма, ее центральные и периферические органы.....	17
5. Адаптивный иммунный ответ.....	19
6. Особенности гуморального и клеточного иммунного ответа .....	26
7. Формы иммунного ответа .....	30
8. Контрольные вопросы по теоретической иммунологии .....	33

## **Занятие № 13**

1. Серологические реакции, сущность, подразделение .....	37
2. Реакция агглютинации.....	40
3. Реакции непрямой (пассивной) агглютинации .....	43
а) Реакция непрямой гемагглютинации .....	44
б) Латекс-агглютинация.....	45
в) Коагглютинация (КоА) .....	46
4. Контрольные вопросы по теме занятия .....	46

## **Занятие № 14**

1. Реакция преципитации .....	49
а) Реакция кольцепреципитации.....	50
б) Реакция преципитации в геле .....	51
в) Метод иммуноэлектрофореза .....	53

2. Реакция нейтрализации токсина антитоксином .....	54
а) Реакция нейтрализации <i>in vivo</i> .....	55
б) Реакция нейтрализации <i>in vitro</i> .....	57
3. Контрольные вопросы по теме занятия.....	63

### **Занятие № 15**

1. Реакции с участием комплемента:.....	65
а) Реакции иммунного лизиса.....	65
б) Реакция связывания комплемента (РСК) .....	68
2. Серологические реакции с использованием меченных антител или антигенов.....	74
а) Метод иммунофлюоресценции (МИФ) .....	75
б) Иммуноферментный анализ (ИФА) .....	78
в) Радиоиммунологический анализ (РИА) .....	82
г) Иммуноблотинг .....	83
3. Контрольные вопросы по теме занятия .....	84

### **Занятие № 16**

1. Биопрепараты, содержащие известные антитела .....	87
а) Неадсорбированные и адсорбированные диагностические сыворотки .....	88
б) Моноклональные антитела .....	90
2. Диагностикумы – биопрепараты, содержащие известные антигены.....	92
3. Иммуноглобулиновые (антителные) диагностикумы.....	94
4. Практическое применение серологических реакций .....	96
5. Ситуационные задачи .....	100
6. Контрольные вопросы по теме занятия .....	104

## **Занятие № 17**

1. Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний .....	106
2. Гетерологичные (ксеногенные) сывороточные препараты .....	107
3. Гомологичные (аллогенные) сывороточные препараты.....	111
4. Осложнения, возникающие при применении гетерологичных сывороточных препаратов .....	114
5. Контрольные вопросы по теме занятия .....	115

## **Занятие № 18**

1. Общая характеристика вакцин.....	117
2. Национальный календарь профилактических прививок .....	130
3. Инфекционные аллергены .....	133
4. Контрольные вопросы по теме занятия .....	134
<b>Литература .....</b>	<b>136</b>