

**ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ  
КАФЕДРА «МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ  
И ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ»**

***Н. Н. Митрофанова  
В.Л. Мельников***

**ИММУНОЛОГИЯ**

*Учебно-методическое пособие  
для студентов медицинских вузов*

**ПЕНЗА 2013**

Учебно-методическое пособие для студентов медицинских вузов «Иммунология» составлено в соответствии с программой для студентов 2 курса специальности «Лечебное дело» по иммунологии 2010 г.

По каждой теме сформулирована цель занятия. Имеется план и методика выполнения различных экспериментальных работ. Приведены современные методы диагностики различных инфекций.

Руководство рекомендовано для самостоятельной подготовки студентов к практическим занятиям.

#### Р е ц е н з е н т ы :

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой  
аллергологии и иммунологии ГБОУ ДПО «Пензенский институт  
усовершенствования врачей»

***Б.А. Молотилев;***

кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой  
инфекционных болезней УО «Гомельский государственный медицинский  
университет»

***Е.Л. Красавцев***

## **Тема 1: ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ. ОСНОВНЫЕ МОДЕЛИ В ИММУНОЛОГИИ. ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ С ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ.**

**Цель:** Познакомиться с предметом и задачами иммунологии, с историей развития и основными теориями иммунитета. Выучить и научиться выполнять правила противозидемического режима и техники безопасности в иммунологической лаборатории. Изучить объекты исследования в иммунологии.

### **Вопросы для самостоятельной подготовки:**

1. Предмет и задачи иммунологии
2. История развития иммунологии.
3. Инструктивные и конструктивные теории иммунитета.
4. Клонально-селекционная теория Бернета
5. Оснащение и режим работы иммунологической лаборатории
6. Основные подходы к стандартизации лабораторного иммунологического обследования
7. Объекты исследования в иммунологии
8. Инбредные животные.
9. Биологические материалы для исследований.
10. Особенности работы с иммунокомпетентными клетками.
11. Иммунологические методы, применяемые в экспериментальных и клинических исследованиях.

### **План**

#### **Программа:**

1. Предмет и задачи иммунологии, история развития.
2. Теории иммунитета
3. Правила по технике безопасности.
4. Основное оборудование иммунологической лаборатории.
5. Объекты исследования в иммунологии

#### **Демонстрация:**

1. Оборудование лаборатории.
2. Приемы работы с бактериологической петлей, спиртовкой, чашкой Петри, бактериологической пробиркой.
3. Фламбирование бактериологической петли

#### **Задание студентам:**

1. Освоить работы с бактериологической петлей.
2. Освоить правила работы с чашкой Петри, бактериологической пробиркой, спиртовкой, шпателем.
3. Научиться фламбировать бактериологическую петлю.
4. Научиться забирать ПБА с поверхности питательной среды.
5. Заполнить таблицу: **Теории иммунитета**

## **Информационный материал**

Все иммунологические исследования проводят в специальных лабораториях, структура и оборудование которых зависят от объектов исследования и от целевой направленности.

Объекты исследования:

1. Бактерии
2. Вирусы
3. Грибы
4. Простейшие
5. Человек

Целевая направленность:

1. Научные исследования
2. Диагностика заболеваний.

Изучение иммунного ответа и серодиагностика заболеваний человека и животных осуществляют в иммунологических и серологических лабораториях.

Иммунологические лаборатории могут входить в состав:

1. Центров Роспотребнадзора
2. Диагностических центров
3. Лабораторий крупных больниц
4. НИИ

В центрах Роспотребнадзора проводят серологические анализы материалов, полученных от больных и контактных лиц, обследуют бактерионосителей, проводят санитарно-микробиологические исследования объектов внешней среды.

В серологических лабораториях больниц и диагностических центров проводят исследования с целью диагностики инфекционных заболеваний.

В иммунологических лабораториях НИИ проводят научные исследования.

Иммунологические лаборатории размещаются в нескольких помещениях. В лаборатории предусмотрены:

1. Помещение для иммунологических исследований
2. Помещение для серологических исследований
3. Помещение для мойки и стерилизации посуды
4. Виварий с боксами
5. Регистратура

Оборудование: перечислить, указать назначение.

## **Иммунологические методы**

1. Методы определения веществ, характеризующихся наличием АТ против них

Методы иммуноанализа

- а) РА
- б) Методы гемолиза
- в) РП
- г) ИФА, РИА, иммунофлюоресцентный анализ

2. Методы фракционирования

- а) Выделение Ig солями серной кислоты
- б) Методы хроматографии
- в) Центрифугирование в средах с градиентами плавучей плотности
- г) Электрофорез
- д) Проточная цитофлюориметрия

3. Иммуногистохимические методы

4. Методы молекулярной биологии (ПЦР)

1. Генетические методы

- а) Методы направленного мутагенеза
- б) Методы изучения экспрессии генов и методы картирования и исследования мутаций

5. Методы биотехнологии – клонирование молекул, ПЦР, получение рекомбинантных белков, создание инбридных генов

6. Методы изучения свойств нативных клеток иммунной системы в культурах *in vitro*

7. Методы исследования функции и взаимодействия клеток *in vivo*

По определению экспертов ВОЗ **Клиническая иммунология** – это клиническая и лабораторная дисциплина, занимающаяся изучением вопросов диагностики и лечения больных с различными патологическими состояниями, в основе которых лежат иммунологические состояния (механизмы) и состояния, в терапии и профилактике которых иммунопрепараты играют ведущую роль.

Клиническая иммунология и иммунологическая служба должны состоять из клинической и лабораторной составляющих.

Лабораторная иммунологическая диагностика – одно из направлений клинической лабораторной диагностики должна развиваться в соответствии с нормативной базой, принятой для подразделений лабораторной службы.

В РФ создана сеть лабораторной клинической иммунологии, разработана

методология оценки иммунного статуса населения. В соответствии с решением Комиссии МЗ СССР (№16-1 от 22.08.1990 г.) «О развитии клинической иммунологии» в стране в некоторых городах (Москва, Владивосток, Омск, Тюмень, Екатеринбург) созданы региональные центры клинической иммунологии.

Для того, чтобы иммунологическая диагностика могла эффективно использоваться клиницистами, необходимо сформулировать **основные принципы организации иммунологической лаборатории.**

1. Востребованность клиницистами
2. Минимум «ненужных» анализов,
3. Преемственность лабораторных иммунологических исследований
4. Стандартные протоколы методов
5. Контроль качества
6. Рентабельность лаборатории.

Первый официальный документ, регламентирующий деятельность иммунологической лаборатории – Приказ МЗ СССР (№539 от 18.04.1986 г.) «Об организации лабораторий клинической иммунологии» обязывал определять 6 показателей периферической крови:

1. Количество Т-лимфоцитов
2. Количество В-лимфоцитов
3. Количество фагоцитирующих нейтрофилов
4. Иммуноглобулины А, М, G сыворотки крови

Успехи фундаментальной иммунологии, основанные на достижениях молекулярной биологии и генной инженерии, обусловили новый этап в развитии иммунологических лабораторий. В конце прошлого века стало очевидно, что большинство областей клинической медицины нуждаются в помощи иммунологических лабораторий. Инфекционисты, кардиологи, дерматологи, эндокринологи, ревматологи и другие врачи нуждаются в обнаружении и количественном определении специфических антител или аутоантител в сыворотке крови, на мембранах циркулирующих клеток и в тканях.

С заболеваниями, в патогенезе которых ведущую роль играют аллергические реакции, сталкиваются представители других клинических специальностей.

**Таблица 1. Участие аллергических реакций разных типов в патогенезе патологических состояний, встречающихся в различных клинических дисциплинах**

| Тип аллергической реакции | Диагноз     | Клиническая дисциплина |
|---------------------------|-------------|------------------------|
| I                         | Анафилаксия | Внутренние болезни     |

|                |                                                                                  |                                                                        |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|                |                                                                                  | Реаниматология                                                         |
| I, II, III, IV | Лекарственная аллергия                                                           | Анестезиология<br>Внутренние болезни<br>Кожные болезни<br>Стоматология |
| I – III        | Ангioneвротический отёк                                                          | Внутренние болезни                                                     |
| I – IV         | Бронхиальная астма<br>Хроническое обструктивное<br>заболевание лёгких<br>Бронхит | Пульмонология                                                          |
| I – IV         | Атопический дерматит<br>Экзема<br>Контактный дерматит                            | Кожные болезни                                                         |
| I – IV         | Пищевая аллергия                                                                 | Гастроэнтерология                                                      |
| I – IV         | Острый отит<br>Хронический отит<br>Ринит, синусит                                | ЛОР                                                                    |
| IV – I         | Конъюнктивит                                                                     | Глазные болезни                                                        |

Врачи разных специальностей ставят перед иммунологической лабораторией задачу выявления иммунодефицитных состояний. Диагноз «иммунодефицит» является лабораторным диагнозом.

При многих заболеваниях иммунологическая лаборатория необходима при оценке прогноза заболевания, стойкости ремиссии, вероятности рецидива, полноты выздоровления, при назначении иммунокорректирующей терапии.

Современная иммунологическая лаборатория имеет возможность провести:

1. Оценку иммунного статуса
2. Диагностику первичных иммунодефицитов
3. Аллергодиагностику
4. Диагностику аутоиммунных, инфекционных, онкологических заболеваний
5. Обеспечить трансплантацию.

Необходимо построение системы медицинских стандартов иммунологического обследования больного. Составляющие стандартизации иммунологического обследования:

1. Стандартизация показаний к лабораторному иммунологическому обследованию
2. Стандартизация определения лабораторных иммунологических показателей
3. Стандартизация интерпретации результатов.

1. Стандартизация показаний к лабораторному иммунологическому обследованию включает:

Цель и задачи обследования

Диагностика

Мониторинг

Назначение иммунокорректирующей терапии

Выбор показателя с позиций доказательной медицины

Определение объема иммунологического обследования.

2. Стандартизация определения лабораторных иммунологических показателей включает:

А) Стандартизация доаналитического этапа

Подготовка больного

Взятие биологического материала

Режим хранения и доставки материала в лабораторию

Регистрация и маркировка образцов

Первичная обработка биоматериала

Банкирование биоматериала

Б) Стандартизация аналитического этапа

Протоколы методов

Стандарты внутреннего контроля качества

Программы внешнего контроля качества

В) Стандартизация постаналитического этапа

Форма представления окончательного результата

Унификация значения нормы

3. Стандартизация интерпретации результатов включает:

Сопоставление результатов с клиническими данными

Сравнение диагностической информативности отдельных показателей

Алгоритмы диагностики

Заключение

Подтверждение диагноза

Определение фазы заболевания

Описание иммунной системы

Рекомендации

Проведение дополнительного обследования

Назначение иммунокорректирующей терапии

Специализированные программы внешней оценки качества

### **Объекты исследования**

Для проведения фундаментальных исследований в иммунологии лучший объект – инбредные мыши.

**Инбредные животные** – животные, полученные путём инбридинга, т.е. последовательных близкородственных скрещиваний с целью получения

гомозиготного и генетически идентичного потомства.

Среди потомков для дальнейших скрещиваний сначала отбирают особей по признакам внешнего сходства, в последних поколениях тестируют на совпадение групп крови и приживления кожных лоскутов. Через 20 поколений и более получают мышей с высокой степенью гомозиготности, обозначенных как **чистая линия**.

Главная цель выделения чистых линий – получение возможности многократного повторения экспериментов на генетически одинаковых организмах, т.е. обеспечение воспроизводимости результатов исследования. Мыши стали основными экспериментальными животными в иммунологии, так как:

1. Имеют короткий срок беременности (21 сут), множественное потомство, что позволяет быстро вывести чистые линии
2. Себестоимость содержания
3. Структура и функции иммунной системы мыши и человека сходны
4. Выведение чистых линий мышей показало, что некоторые из них жизнеспособны, несмотря на гомозиготность, т.е. не всегда инбридинг приводит к вырождению.

Созданы линии мышей с заданными характеристиками, что позволяет выбирать особей для достижения конкретных целей. Характеристики животных разных линий документированы. Наиболее известные питомники:

Джексоновская лаборатория в США ежегодно поставляет 2 млн. животных 2500 различных линий. 97% этих животных можно приобрести только у них. В каждом питомнике линии мышей имеют паспорт – систематизированы в базах данных. Известен гаплотип (H-2) мышей разных линий, окрас, поведенческие реакции, особенности функционирования иммунной системы и др.

Кроме чистых линий выводят конгенных мышей. Это линии, отличающиеся небольшой частью генома. В основе выведения конгенных мышей лежит возвратное скрещивание – получение потомства в ряду поколений от скрещивания гетерозиготы (потомков гомозиготных родителей, генетически отличающихся между собой) с одним из исходных гомозиготных родителей. Это скрещивание проводится для внедрения комплекса H2 донорской линии А в генотип основной линии В.

Например, при скрещивании маркирующей линии А и основной линии В получают гибриды первого поколения  $F_1$  (a/b, генерация I). При дальнейшем скрещивании гибридов  $F_1$  с особями основной линии В, получают потомство, состоящее из гомозигот (b/b) и гетерозигот (a/b) по комплексу H2. В последующих скрещиваниях отбираются только гетерозиготные особи, имеющие признак А ( $H2^a$ ), которые определяются по приживлению кожного трансплантата от маркирующей линии А и положительной серологической реакции клеток крови с анти-А-сывороткой. По мере продолжения скрещиваний  $\alpha$ -положительных особей с особями основной линии В доля генома линии А постоянно снижается, но при этом для дальнейшего размножения из потомства отбирают только тех особей, которые сохраняют признак А ( $H2^a$ ). К 12 поколению (генерация №12) практически весь геном

отбираемых после гибридизации мышей представлен основной линией В, за исключением признака А, по которому шёл отбор.

Дальнейшая задача состоит в переводе признака в гомозиготное состояние. Для этой цели гетерозигот (a/b) скрещивают между собой и отбирают для дальнейшего размножения только тех особей из потомства, которые отторгают кожный трансплантат, взятый от особи линии В и не дают реакции с анти-В-сывороткой. Этот отбор выявляет особей с присутствием признака В ( $H2^b$ ) и гомозиготность по признаку А ( $H2^a$ ). Таким образом, в результате применения данной схемы скрещивания, в геном основной линии В внедряется комплекс  $H2$  маркирующей линии А. С момента перевода комплекса  $H2^a$  в гомозиготное состояние констатируется получение новой конгентной (по отношению к основной) линии В.

### **Основные линии инбредных мышей**

1. Линии мышей с генетическими дефектами, затрагивающими иммунную систему. SCID – мыши, страдающие тяжелым иммунодефицитом в результате мутации в генах RAG, ответственных за перегруппировку генов Ig и Т-клеточного рецептора. Животные практически лишены Т- и В-лимфоцитов и могут жить в безмикробных условиях. Эти мыши не отторгают ксеногенные ткани.

В 1959 году Расселом описаны определенные частично инбредные мыши – спонтанные мутанты – самцы, которые вскоре после рождения покрывались чешуйчатой перхотью, отставали в росте, страдали диареей, умирали в возрасте 3 недель. У них наблюдалась массивная лимфоаденопатия, спленомегалия, аномальная инфильтрация лимфоцитами кожи, печени, лёгких. Мутантных самцов называли «скурфи». В 2001 году было выявлено, что мутация «скурфи» затронула ген фактора транскрипции, локализованного в X-хромосоме.

Nude (лишенные волосяного покрова) – выведенные в 1960 году мыши со спонтанной мутацией, в результате которой у мышей-гомозигот по данной мутации отсутствуют тимус и волосяной покров. Мутантный ген поддерживают при размножении мышей в гетерозиготном состоянии.

AKR – белые мыши. У 90% мышей к 6-8 месяцу развиваются «спонтанные» тимомы и лейкоз.

2. Мыши с аутоиммунной патологией. NZB – новозеландские чёрные мыши с аутоиммунной гемолитической анемией. Сывороточные антиэритроцитарные Ат мыши связывают эритроциты, но не агглютинируют их.

(NZB×NZW)  $F_1$  – гибриды первого поколения чёрных и белых новозеландских мышей. У них спонтанно развивается синдром, напоминающий красную волчанку человека с гломерулонефритом. В крови содержатся Ат к ДНК.

EAE – мыши с аутоиммунным энцефалитом.

### **Биологические материалы для исследований в иммунологической**

**лаборатории:**

Цельная и периферическая кровь  
Сыворотка крови  
Плазма крови  
Клетки крови, отделенные от жидкой фракции  
Цереброспинальная жидкость  
Синовиальная жидкость  
Бронхоальвеолярный лаваж  
Выделения слизистых секретов половых органов  
Выделения из носа  
Моча  
Супернатанты, полученные от культивирования *in vitro* клеток  
Гомогенаты тканей  
Цитоплазматические и ядерные компоненты клеток

Биологический материал отличается по биохимическому составу, pH, ионной силе, вязкости. Каждая тест-система разработана строго для конкретного вида биоматериала и в 99% случаев – для сыворотки крови.

Тест-системы для анализа сыворотки крови не могут использоваться для работы с другими биоматериалами из-за высокой вероятности получения ложных результатов. Тест-системы для человека не могут применяться для работы с животными. Исключение – перекрестнореагирующие агенты (цитокин – трансформирующий фактор роста человека и свиньи).

**Таблица 2. Теории иммунитета**

| Название | Автор | Основные положения |
|----------|-------|--------------------|
|          |       |                    |
|          |       |                    |
|          |       |                    |
|          |       |                    |

|  |  |  |
|--|--|--|
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

### **Методические указания**

#### ***1. Приготовление препаратов для микроскопического и серологического исследования.***

Для приготовления препарата исследуемый материал берут из пробирки или чашки Петри бактериологической петлей или стерильной пипеткой.

В своей научной и практической деятельности микробиолог работает обычно с “чистыми” культурами микробов (рост микробов только одного определенного вида), добываясь их получения из исследуемого материала, а затем поддерживая рост чистых культур в течение необходимого (иногда длительного) срока. При пересеве их с одной среды на другую или при извлечении части культуры для приготовления мазка необходимо соблюдать условия, обеспечивающие предохранение чистой культуры от загрязнения посторонними микробами. Сохранение чистоты культуры является основой бактериологической работы, так как только при этом условии возможно точное выявление всех свойств изучаемого микроба (морфологических, биохимических, серологических и др.).

Извлекают микробов из пробирки с помощью металлической (предпочтительно платиновой) проволоки в виде петли или иглы. Последняя может быть погружена в пробирку только после стерилизации ее в пламени спиртовки-фламбирования. При этом петля быстро накаливается и так же быстро остывает без повреждения металла. При прокаливании петлю или иглу следует держать в пламени вертикально для того, чтобы проволока на всем протяжении была накалена докрасна. Затем, проведя несколько раз через пламя спиртовки, стерилизуют и ближайший к проволоке отрезок стеклянной или металлической палочки, в которую вмонтирована петля.

Лишь после такой тщательной стерилизации петля может быть внесена в пробирку с культурой микроорганизмов. Прикосновение к культуре слишком горячей петли может повредить микробам. Поэтому рекомендуется остудить петлю, предварительно прикоснувшись ею к внутренней поверхности пробирки или же к питательной среде, свободной от бактериального налета (если имеют

дело с твердой средой); если проволока недостаточно остыла, то среда при прикосновении петли с треском расплавляется или “кипит”.

### ***2. Забор биологического материала с поверхности питательной среды в бактериологической пробирке.***

1. Для извлечения культуры с целью приготовления мазка пробирку берут в левую руку между большим и указательным пальцем в почти горизонтальном положении; при этом должна быть хорошо видна вся поверхность питательной среды с культурой бактерий.

2. Простерилизовав петлю, безымянным пальцем и мизинцем правой руки (остальные пальцы правой руки заняты петлей) вынимают из пробирки ватную пробку и так держат ее во время последующих манипуляций;

3. Вынув пробку, стерилизуют края пробирки, обжигая их на пламени горелки,

4. Затем погружают петлю в пробирку, слегка касаясь внутренней поверхности стекла, для того, чтобы остудить петлю.

5. Остудив петлю, берут ею небольшое количество культуры (избыток культуры излишен) для приготовления мазка, стараясь не захватить при этом питательной среды;

6. Вынув петлю, опять обжигают край пробирки, а также слегка обжигают и пробку,

7. Пробкой закрывают пробирку.

8. Не выпуская петли из рук, ставят пробирку в штатив и приступают к приготовлению мазка .

### ***3. Забор биологического материала с поверхности питательной среды в чашке Петри:***

1. Для извлечения культуры с целью приготовления мазка чашку Петри берут в левую руку в горизонтальном положении; большим и указательным пальцами приоткрывают крышку чашки Петри, при этом должна быть хорошо видна вся поверхность питательной среды с культурой бактерий.

2. Простерилизовав петлю, вносят ее в чашку, слегка касаясь внутренней поверхности крышки чашки Петри, чтобы остудить петлю

3. Остудив петлю, берут ею небольшое количество культуры для приготовления мазка, стараясь не захватить при этом питательной среды;

4. Вынув петлю, закрывают чашку и переворачивают ее вверх дном.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие методы иммунологических исследований Вам известны?

2. Что изучает клиническая иммунология?

3. Сформулируйте основные принципы организации иммунологических лабораторий?

4. Какие показатели периферической крови определяют в иммунологических лабораториях?

5. Что такое инбредные животные?

6. Почему в качестве инбредных животных в основном используют

лабораторных мышей?

### **Список литературы:**

#### **Обязательная:**

1. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: Учебник. — М.: Медицина, 2000. — 432 с : ил. (Учеб. лит. для студ. медвузов).
2. Ковальчук Л.В и др. Иммунология: практикум: учеб. пособие – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 176 с.
3. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / под ред. акад. РАМН В.И. Покровского - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2001. – 768 с.
4. Борисов Л.Б. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М. 1997 г.

#### **Дополнительная:**

1. Генкель П.А., Микробиология с основами вирусологии. М., 1974 г.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов. - 3-е издание, испр. и доп. – СПб, СпецЛит. 2002. – 591 с.
3. Борисов Л.Б., Смирнова А.М., Медицинская микробиология, вирусология, иммунология, М., Медицина. 1994 г.
4. Тимаков В.Д., Левашов В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. М. 1983 г.

## **Тема № 2: ИММУНИТЕТ: ВИДЫ ИММУНИТЕТА, НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ.**

**Цель:** изучить строение иммунной системы организма человека, строение и функции иммунокомпетентных клеток, изучить виды иммунитета и неспецифические факторы защиты организма. Познакомиться с основными этапами филогенеза и онтогенеза иммунной системы

### **Вопросы для самоподготовки:**

1. Виды невосприимчивости макроорганизма к возбудителям инфекционных заболеваний (врожденная и приобретенная невосприимчивость, видовая невосприимчивость, естественная резистентность, иммунитет: естественный и искусственный, активный и пассивный).
2. Видовая невосприимчивость к возбудителям инфекционных болезней и ее механизмы.
3. Физиологические (барьерная функция покровов, антимикробное действие секретов, выведение микробов физиологическими путями, антагонистическое действие нормальной микрофлоры, барьерная и адсорбционная функция тканей, действие тканевых ингибиторов, фагоцитоз, антимикробное действие лизоцима, комплемента, интерфероны и др.) механизмы неспецифической резистентности
4. Механизм фагоцитоза. Макро- и микрофаги, их функциональные отличия. Завершенный и незавершенный фагоцитоз.
5. Комплемент. Пути активации.
6. Патофизиологические (стресс, воспалительная реакция) механизмы неспецифической резистентности
8. Иммунная система организма. Центральные и периферические органы иммунной системы.
9. Филогенез и онтогенез иммунной системы.
10. Иммунокомпетентные клетки. Клеточные и гуморальные механизмы иммунитета (Т и В системы).

### **П л а н :**

### **Программа:**

1. Иммунитет, виды и формы иммунитета.
2. Неспецифические факторы защиты.
3. Фагоцитоз.
4. Система комплемента.
5. Воспалительная реакция.
6. Интерфероны.
7. Иммунная система организма
8. Филогенез и онтогенез иммунной системы
9. Иммунокомпетентные клетки

### **Демонстрация:**

1. Схемы и таблицы с механизмами неспецифического иммунитета.

2. Микропрепарат незавершенного фагоцитоза гонококков.

### **Задание студентам:**

1. Зарисовать схемы механизмов активации комплемента.

2. Зарисовать схему действия интерферонов.

3. Поставить **Опыт действия лизоцима на различные виды микробов**

4. Изучить микропрепарат незавершенного фагоцитоза гонококков.

Зарисовать.

5. Заполнить таблицу: **Особенности строения и функций**

**иммунокомпетентных клеток**

6. Заполнить таблицу: **Эволюция иммунной системы**

### **Информационный материал:**

Иммунитет (от лат. *immunitas* — неприкосновенный, находящийся под защитой, освобождение, избавление от болезни) — это система биологической защиты внутренней среды многоклеточного организма (гомеостаза) от генетически чужеродных веществ экзогенной и эндогенной природы.

Факторы неспецифической резистентности:

- **ареактивность клеток макроорганизма** к патогенным микроорганизмам и токсинам, обусловленную генотипом и связанную с отсутствием на поверхности таких клеток рецепторов для адгезии патогенного агента;

- **барьерная функция кожи и слизистых оболочек**, которая обеспечивается отторжением клеток эпителия кожи и активными движениями ресничек мерцательного эпителия слизистых оболочек. Кроме того, она обусловлена выделением экзосекретов потовых и сальных желез кожи, специфических ингибиторов, лизоцима, кислой средой желудочного содержимого и другими агентами. Биологические факторы защиты на этом уровне обусловлены губительным воздействием нормальной микрофлоры кожи и слизистых покровов на патогенные микроорганизмы;

- **температурная реакция**, при которой прекращается размножение большинства патогенных бактерий.

- **клеточные и гуморальные факторы** организма.

В случае проникновения патогенов в организм включаются гуморальные факторы, к которым относятся белки системы комплемента, пропердин, лизины, фибронектин, система цитокинов (интерлейкины, интерфероны и др.). Развиваются сосудистые реакции в виде быстрого локального отека в очаге повреждения, что задерживает микроорганизмы и не пропускает их во внутреннюю среду. В крови появляются белки острой фазы — С-реактивный протеин и маннансвязывающий лектин, которые обладают способностью взаимодействовать с бактериями и другими возбудителями. В этом случае усиливаются их захват и поглощение фагоцитирующими клетками, т. е. происходит опсонизация патогенов, а эти гуморальные факторы играют роль опсопинов.

К клеточным факторам неспецифической защиты относятся тучные клетки, лейкоциты, макрофаги, естественные (натуральные) киллерные клетки (NK-клетки, от англ. «natural killer»).

### **Фагоцитоз**

Фагоцитозом (от phagein — пожирать, cytos — клетка) называется поглощение клетками каких-либо частиц с последующим их перевариванием (в большинстве случаев). Фагоцитоз микроорганизмов — защитное приспособление организма.

Открытие этого явления и создание первой теории иммунитета как защитной реакции организма принадлежат И. И. Мечникову.

Дальнейшие работы отечественных исследователей установили подчиненность фагоцитоза, как и других иммунологических реакций, нервно-гуморальной корреляции, в частности, возможность условнорефлекторного воспроизведения фагоцитарной реакции.

Клетками фагоцитами являются лейкоциты (гранулоциты и моноциты), а также фиксированные клетки ретикуло-эндотелиальной ткани. Многих микробов лейкоциты способны фагоцитировать самостоятельно; наиболее же вирулентные микробы фагоцитируются только при участии антител — опсоинов и тропинов.

Во всех случаях присутствие иммунной сыворотки способствует усилению фагоцитоза настолько закономерно, что по степени фагоцитоза можно судить о состоянии защитной способности организма (определение опсонического индекса)

### **Лизоцим**

Одним из факторов видовой иммунитеты, губительно действующим на сапрофитную флору, а также на некоторых представителей патогенных микробов, является ферментоподобная субстанция, находящаяся в различных средах организма (плазма крови, перитонеальная жидкость, хрящ), а также в секретах различных желез (слезных, слюнных). При действии лизоцима на различные микроорганизмы наблюдается их лизис. Лизоцим был впервые открыт П. Н. Лашенковым в белке куриного яйца, который и является одним из источников его получения. Лизоцим получил некоторое применение в качестве биологического антисептика как в медицине (особенно в глазной клинике), так и в народном хозяйстве (как консервант некоторых продуктов).

Сила лизоцима определяется его титром — наибольшим его разведением, вызывающим лизис культуры *Micrococcus lysodeicticus*. Для выявления силы действия лизоцима на различные виды микроорганизмов можно поставить следующий опыт.

## **ОРГАНЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**

### **ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ОРГАНЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**

Костный мозг является одновременно органом кроветворения и органом иммунной системы. Общая масса костного мозга равна 2,5 – 3 кг. Структурной основой (стромой) костного мозга является ретикулярная ткань, представленная ретикулярными клетками и образуемыми ими ретикулярными волокнами. К стромальным элементам кроме ретикулярных клеток (фибробластов костного мозга) относят остеогенные, адвентициальные, жировые, эндотелиальные клетки и макрофаги.

Выделяют красный и желтый костный мозг. По функциональному назначению в красном костном мозге различают миелоидную (гемоцитопозитическую) и лимфоидную ткани, из которых идет образование клеток крови, моноцитов и В – лимфоцитов.

Желтый костный мозг представлен в основном жировой тканью, которая заместила ретикулярную. Кровеобразующие элементы в желтом мозге отсутствуют. Но при больших кровопотерях на месте желтого костного мозга могут вновь появиться очаги кроветворения за счет стволовых клеток, поступивших с кровью.

Тимус (вилочковая железа) расположен в грудной полости, позади верхней части грудины. Состоит из двух неодинаковых по форме и размеру долей, которые плотно прижаты друг к другу. Снаружи он покрыт капсулой из соединительной ткани. Вглубь органа от нее отходят тяжи – перегородки. Они делят всю ткань железы на маленькие дольки. В вилочковой железе различают наружное более темное корковое вещество, где господствуют лимфоциты, и центральное, светлое мозговое вещество, где располагаются железистые клетки. Под капсулой находится базальная мембрана, на которой в один слой лежат плоские эпителиоретикулоциты. Две главные артерии входят в тимус из капсулы, разветвляясь, идут по междольковым перегородкам и входят в мозговое вещество, окруженные тонким слоем рыхлой волокнистой соединительной ткани и эпителиоретикулоцитами с базальной мембраной. По мере продвижения сосудов к корковому веществу и ветвления на капилляры количество сопровождающей соединительной ткани уменьшается. Среди клеток периваскулярной соединительной ткани встречаются фибробласты, лейкоциты, тучные клетки и макрофаги. В результате этого просвет капилляра в корковом веществе оказывается отделенным от лимфоэпителиальной основы эндотелиоцитами на непрерывной базальной мембране, периваскулярным пространством, базальной мембраной эпителиоретикулоцита и его цитоплазмой – своеобразным гематотимусным барьером. Полагают, что этот барьер не пропускает антигены кровотока к развивающимся Т-лимфоцитам. В мозговом веществе гематотимусный барьер менее плотен. Венозная система складывается из сосудов, повторяющих ход артерий, и добавочных сосудов, обеспечивающих отток из коркового вещества, минуя мозговое.

Лимфатические капилляры коркового и мозгового вещества образуют во внутреннем мозговом веществе выносящие лимфатические сосуды, направляющиеся в соединительнотканые перегородки и далее в региональные (медиастинальные) лимфоузлы.

Основная масса лимфоцитов покидает тимус через стенку венозных отделов капилляров и посткапиллярных венул на границе коркового и мозгового вещества и лишь небольшая их часть – по лимфатическим путям.

Бурса (сумка Фабрициуса) является центральным органом иммунной системы у птиц. У млекопитающих и человека этой сумки нет. Бурса представляет нечто подобное человеческому аппендиксу, слепому отростку кишечника. Только аппендикс располагается в середине кишечника, а Фабрициева сумка вблизи анального отверстия у птиц. Основным структурным элементом сумки служит лимфоидный узелок с корковой и мозговой зонами. Корковая зона содержит несколько плотных слоев лимфоцитов. Под ними расположен базальный эпителиальный слой. В центральной части среди ретикулоцитов находятся преимущественно малые лимфоциты. По периферии мозговой зоны расположены менее зрелые базофильные клетки лимфоидного ряда.

Клеточный состав тимуса полностью обновляется за 4 – 6 дней. Из тимуса в периферические лимфоидные ткани мигрирует около 5 % новообразующихся лимфоцитов. Для большинства других клеток, образующихся в тимусе, он же становится «могилой»: клетки погибают в течение 3 – 4 дней. Причина гибели не расшифрована.

## ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ ОРГАНЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Селезенка - кроветворный орган, а также периферический орган иммунной системы, располагается слева от желудка, в левом подреберье, на пути тока крови по главным магистральным сосудам. Ежедневно через нее проходит около 800 мл крови. Это мощный фильтр для чужеродных белков, погибших форменных элементов и микроорганизмов, попавших непосредственно в кровоток. Селезенка является главным источником антител при внутривенном введении антигена. Именно в селезенке раньше, чем в каком-либо ином органе, в ответ на введение антигенных частиц начинается синтез IgM. Селезенка способна продуцировать факторы, стимулирующие фагоцитоз лейкоцитами и макрофагами.

Лимфатические узлы – выполняют роль биологических фильтров. Они расположены на пути следования лимфы по лимфатическим сосудам от органов и тканей к лимфатическим протокам. Они находятся в хорошо защищенных местах и в области суставов.

## СИСТЕМА ЛИМФОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ

Лимфоидные образования глотки – это 6 миндалин лимфоидного глоточного кольца. Каждая миндалина – это довольно крупное скопление лимфоидной ткани. Поверхность миндалин неровная, как будто изрыта оврагами. Эти складки называют криптами. Они задерживают частички пищи, пыли и т.д. Микроорганизмы попадая сюда, могут размножаться, что служит

сигналом для запуска иммунологических реакций.

**Лимфоидные образования пищевода.** В толще складок слизистой оболочки пищевода, а также между ними, в глубине его борозд расположены лимфоидные узелки. Находясь на пути пищевых масс, а, следовательно, и антигенного воздействия, лимфоидные узелки осуществляют контроль и защиту стенок органа от генетически чужеродного материала. Лимфоидные узелки формируют цепочки на всем протяжении органа, повторяя извилистый ход складок. Кроме того, в стенках пищевода присутствуют так называемые диффузно рассеянные клетки лимфоидного ряда, залегающие между цепочками.

**Лимфоидные образования желудка.** В слизистой оболочке желудка обнаруживаются лимфоциты, относящиеся к В- и Т- популяциям, плазматические клетки и макрофаги. На разных этапах онтогенеза скопления лимфоидных узелков в различных частях желудка колеблется.

**Лимфоидные образования кишечника.** Лимфоидные образования в стенках толстой и тонкой кишок имеют анатомические особенности. Строение и иммунологическая функция этих органов соответствуют физиологическому назначению тонкой и толстой кишок.

**Лимфоидный аппарат** включает в себя: лимфоидные (пейеровы бляшки) одиночные лимфоидные узелки, диффузно расположенные лимфоциты. У начала толстой кишки, располагается червеобразный отросток с его лимфоидными узелками.

**Лимфоидные образования органов дыхания.** В стенках органов дыхания, в которые вместе с воздухом попадают чужеродные частицы, имеется хорошо развитый аппарат иммунной защиты. Это скопления лимфоидной ткани расположенные в слизистой оболочке гортани, трахеи и бронхов под покровным эпителием, а также рассеянные в слизистой оболочке довольно многочисленные клетки лимфоидного ряда, получившие название лимфоидной ткани, ассоциированной с бронхами.

Скопления лимфоидной ткани (лимфоидные узелки) зависит от возраста, а также функционального состояния организма

**Лимфоидные образования мочевыводящих путей.** Лимфоидные скопления (узелки) в стенках мочевыводящих путей выполняют «сторожевые» функции по отношению к тем чужеродным веществам, которые попадают в них извне восходящим путем или образуются в верхних их отделах.

**Таблица 1. Особенности строения и функций иммунокомпетентных клеток**

| Клетка   | Функция | Рисунок |
|----------|---------|---------|
| Фагоциты |         |         |

|                                                    |                                                                                                     |  |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Микрофаги:<br>нейтрофилы<br>базофилы<br>эозинофилы | Фагоцитоз                                                                                           |  |
| Макрофаги:<br>моноциты<br>гистиоциты               | Фагоцитоз, участие в<br>иммунном ответе, синтез<br>медиаторов и<br>биологически активных<br>веществ |  |
| Лимфоциты                                          |                                                                                                     |  |
| 0-(ни-В/ни-Т-) лимфоциты:                          |                                                                                                     |  |
| НК-клетки<br>(нормальные<br>киллеры)               | Неспецифическая<br>цитотоксичность.                                                                 |  |
| К-клетки                                           | Антителозависимая<br>клеточная<br>цитотоксичность.                                                  |  |
| Т-лимфоциты:                                       |                                                                                                     |  |
| 1 Т-хелперы                                        | Участие в иммунном<br>ответе (стимуляция)                                                           |  |
| Т-супрессоры                                       | Участие в иммунном<br>ответе (ингибция)                                                             |  |
| Т-киллеры                                          | Антигензависимая<br>клеточная<br>цитотоксичность                                                    |  |
| Т- эффекторы                                       | Участие в ГЗТ и<br>отторжении<br>трансплантата                                                      |  |
| В-лимфоциты                                        | Участие в иммунном<br>ответе (предшественники<br>антителопродуцирующих<br>клеток - плазмоцитов      |  |

**Таблица 2. Эволюция иммунной системы**

| <b>Этап эволюции или фактор отбора</b>                                                                                     | <b>Элементы иммунной системы</b>                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Одноклеточные организмы                                                                                                    | Распознавание и различение                                                                                                                          |
| Многоклеточные (включая колониальные)                                                                                      | Система гистосовместимости, аллогенное распознавание и кратковременная иммунологическая память                                                      |
| Мезодерма и кровеносная система, разделение функций питания и защиты                                                       | Свободноциркулирующие и более разнообразные виды клеток крови, клеточный иммунитет и эритроциты                                                     |
| Рак и вирусные инфекции, сопряженные с усложнением организмов и возрастанием продолжительности жизни                       | Иммунологический надзор со стороны собственных клеток для выявления инфицированных и раковых клеток                                                 |
| Предковые позвоночные                                                                                                      | Совершенствование распознавания и различения                                                                                                        |
| Низшие позвоночные: увеличение размеров и продолжительности жизни, меньшая, чем у беспозвоночных способность к размножению | Настоящие лимфоциты, лимфоидная ткань и продукция антител (Ig M), долговременная иммунологическая память                                            |
| Выход на сушу, воздействие радиации и развитие сосудистой системы с высоким давлением крови                                | Костный мозг, дополнительные классы антител, Т- и В-лимфоциты, усложнение лимфоидных органов, ЛТК                                                   |
| Амниоты (рептилии, птицы, млекопитающие), утрата свободноживущих личиночных форм                                           | Развитие дифференцировки иммунокомпетентных клеток для большего разнообразия реакций и эффективности иммунной системы                               |
| Гомойотермия, создающая благоприятные условия для роста патогенных микроорганизмов                                         | Повышение эффективности иммунной системы, интеграция клеточных и гуморальных реакций, центры размножения во вторичных лимфоидных органах, лимфоузлы |
| Живорождение, взаимосвязь организма матери и плода                                                                         | Дополнительная тонкая регуляция иммунной системы для предотвращения отторжения плода                                                                |

### **Методические указания**

#### **Опыт действия лизоцима на различные виды микробов**

В 5 пробирок наливают по 0,9 мл 0,5% раствора поваренной соли, после чего в первую пробирку добавляют 0,1 мл лизоцима и готовят десятикратные

разведения путем переноса из предыдущей пробирки в последующую по 0,1 мл до разведения 1 : 10000 (четвертая пробирка). Пятая пробирка, контрольная, она не содержит лизоцима. Во все пробирки вносят по 0,5 мл стандартизованной одномиллиардной взвеси *E. coli*, содержимое пробирок перемешивают и помещают в термостат при 37° на 3 часа, после чего учитывают результаты и отмечают наибольшее разведение лизоцима, вызвавшее лизис микроорганизмов.

Для приготовления одномиллиардной взвеси бактерий необходимо взять односуточную культуру бактерий на скошенном МПА и смыть 0,5% раствором поваренной соли. Для смыва в пробирку с культурой микробов стерильно добавляют пипеткой 1—1,5 мл 0,5% раствора поваренной соли, вращая пробирку между ладонями. Полученную суспензию стерильной пипеткой перемешают в пустую пробирку и стандартизуют по оптическому стандарту, разводя имеющуюся суспензию микробов до 1 млрд. микробных тел в 1 мл 0,5% раствором хлористого натрия.

*Морфология бактерий – размер, форма и взаимное расположение бактериальных клеток*

**Схема описания морфологии бактерий в мазке:**

1. Форма
2. Размеры
3. Характер концов (для палочек)
4. Взаиморасположение

**Контрольные вопросы:**

1. Какие виды и формы иммунитета Вы знаете?
2. Перечислите факторы неспецифической резистентности.
3. Охарактеризуйте пути активации комплемента.
4. Механизмы действия интерферонов.
5. Назовите стадии фагоцитоза
6. Какова биологическая роль незавершенного фагоцитоза?

**Обязательная:**

1. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: Учебник. — М.: Медицина, 2000. — 432 с : ил. (Учеб. лит. для студ. медвузов).
2. Ковальчук Л.В и др. Иммунология: практикум: учеб. пособие — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 176 с.
3. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / под ред. акад. РАМН В.И. Покровского - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2001. — 768 с.
4. Борисов Л.Б. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М. 1997 г.

**Дополнительная:**

1. Генкель П.А., Микробиология с основами вирусологии. М., 1974 г.

- 2.Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов.- 3-е издание, испр. и доп. – СПб, СпецЛит. 2002. – 591 с.
- 3.Борисов Л.Б., Смирнова А.М., Медицинская микробиология, вирусология, иммунология, М., Медицина. 1994 г.
- 4.Тимаков В.Д., Левашов В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. М. 1983 г.

### **Тема № 3: ИММУНИТЕТ: АНТИГЕНЫ И АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЕ, ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ.**

**Цель:** Познакомиться со строением и свойствами антигенов и антител, познакомиться с основными формами иммунного реагирования. Познакомиться с особенностями протекания реакций  $Ag+At$ . Научиться осуществлять постановку ориентировочной и развернутой реакции агглютинации

#### **Вопросы для самоподготовки:**

1. Антигены. Химическая природа, антигенность, иммуногенность, специфичность, детерминантные группы. Гаптены. Т-зависимые и Т-независимые антигены. Микробные антигены,
2. Антитела. Классификация, строение. Биологическая роль.
3. Схема иммунного ответа. Первичный и вторичный иммунный ответ.
4. Динамика накопления антител, фазы антителообразования. Иммунизация и гипериммунизация, ревакцинация.
5. Механизм реакций  $Ag+At$ . Стадии и компоненты
6. Реакция агглютинации.
7. Получение диагностических препаратов (агглютинирующая сыворотка, диагностикум).

#### **План:**

##### **Программа:**

1. Строение и свойства антигенов.
2. Строение и свойства антител.
3. Основные формы иммунного реагирования.
4. Методы выявления и идентификации специфических антигенов, основанные на реакциях связывания антигена с антителами, проявляющихся изменением свойств антигена: реакция агглютинации.

#### **Демонстрация:**

1. Наборы ингредиентов для реакции агглютинации.
2. Постановка ориентировочной реакции агглютинации
3. Результаты постановки развернутой реакции агглютинации

#### **Задание студентам:**

1. Зарисовать схемы первичного и вторичного иммунного ответа, отметить сходства и различия.
2. Поставить ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с целью идентификации выделенной чистой культуры бактерий. Сделать заключение по результатам реакции.
3. Поставить развернутую реакцию агглютинации для определения серотипа бактерий.

4. Протоколировать и оценить результаты развернутой реакции агглютинации.

### **Информационный материал**

#### **ОСНОВНАЯ СХЕМА ИММУННОГО ОТВЕТА**

1. Антиген, попадая в организм, в первую очередь сталкивается с естественными барьерами – кожей, слизистыми оболочками и т.д. Многим микроорганизмам не удается преодолеть их.

2. Если вторжение все же произошло, антиген встречается с фагоцитирующими клетками.

3. Макрофаг (фагоцит) пожирает и переваривает антиген.

4. Если он не справляется с ним самостоятельно, то представляет на поверхности своей мембраны информацию о проникшем враге. Это сигнал Т- или В- лимфоцитов.

5. В ответ на полученный сигнал о вторжении в периферических органах иммунной системы начинается отбор клеток, необходимых для борьбы именно с этим антигеном. Образуется клон соответствующих клеток. Одновременно формируется небольшое количество клеток памяти.

6. «Солдаты» вступают в бой.

#### **ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ ПО КЛЕТОЧНОМУ ТИПУ**

Иммунный ответ на различные антигены может происходить по-разному. Если в борьбу вступают Т-клетки, это называется иммунный ответ по клеточному типу.

1. Антиген встречает первые препятствия – кожу и т.д.

2. Макрофаг поглощает антиген и представляет его на мембране.

3. Информация о противнике передается Т-хелперу.

4. Т-хелпер способствует формированию клона Т-киллеров. Образуются клетки памяти.

5. Т-киллеры способны разрушать вторгшиеся «чужие» клетки и клетки, зараженные вирусом.

6. Реакция завершается при участии Т-подавляющих клеток.

#### **ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ ПО ГУМОРАЛЬНОМУ ТИПУ С ПОМОЩЬЮ Т-ХЕЛПЕРОВ**

При проникновении бактерий и некоторых вирусов может понадобиться гуморальный ответ.

Возможны два его варианта: с участием Т-хелперов и без их вмешательства.

1. Проникновение антигена.

2. Поглощение антигена и появление информации о нем на макрофаге.

3. Передача информации Т-хелперу.

4. Т-хелпер способствует активации В-клеток. Образуются клетки

памяти.

5. В - клетки превращаются в плазматические клетки, способные к синтезу антител.

6. Плазматическая клетка вырабатывает именно те антитела, которые нужны для борьбы с поступившим антигеном. Они связывают его, образуя иммунный комплекс.

7. Комплекс антиген – антитело захватывается макрофагом и разрушается.

8. Завершение иммунологической реакции происходит при участии Т-подавляющих клеток.

### ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ ПО ГУМОРАЛЬНОМУ ТИПУ БЕЗ ПОМОЩИ Т-КЛЕТОК

1. Проникновение антигена.

2. Поглощение антигена и представление его на макрофаге.

3. Информация с макрофага передается на В – клетку.

4. В – клетки превращаются в плазматические клетки, вырабатывающие антитела.

5. Антитела связывают антигены.

6. Комплекс антиген – антитело удаляется макрофагом.

Для развития эффективного иммунного ответа необходимо участие целого ряда эффекторных и регуляторных клеток иммунной системы, клеток, участвующих в реакциях воспаления, гемопоэтических и других типов клеток. Взаимодействие между этими клетками осуществляется с помощью цитокинов.

Цитокины – эндогенные низкомолекулярные белковые регуляторы, принимающие участие в наиболее эффективном проявлении иммунного ответа.

Цитокины в основном играют регулируемую роль в межклеточных взаимодействиях, активируя или, ингибируя активность определенных клеток. Некоторым цитокинам свойственна прямая эффекторная функция.

Цитокины секретируются разными типами клеток, в основном разными популяциями лейкоцитов, и действуют локально от клетки к клетке, соединяясь со специфическими высокоаффинными рецепторами.

Термином «цитокины» объединяют разнообразные факторы роста, интерфероны, хемокины и интерлейкины. В настоящее время идентифицировано около 80 цитокинов. Однако предполагают, что их количество приближается к 1000.

### ***Реакция агглютинации***

Агглютинацией называется склеивание микробов или других клеток при воздействии на них иммунной сыворотки, содержащей антитела-агглютинины. Реакция агглютинации проявляется в том, что в равномерной взвеси клеток, например, бактерий, при добавлении иммунной сыворотки происходит

скучивание клеток, образование зернышек или хлопьев, которые постепенно оседают на дно, жидкость же над осадком совершенно просветляется. Однако зернышки или хлопья образуются только в том случае, если реакция происходит в присутствии электролитов. Таким образом, для проявления реакции агглютинации нужно иметь: 1) антиген (агглютиноген) в виде взвеси клеток, 2) антитела (агглютинины в виде иммунной сыворотки) и 3) электролиты — обычно физиологический раствор.

Внешнее проявление положительной реакции агглютинации бактерий имеет двоякий характер в зависимости от свойств антигена: у безжгутиковых бактерий, имеющих только один соматический или О-антиген, происходит склеивание непосредственно самих микробных клеток, и образующиеся кучки имеют вид мелких компактных зернышек. Такая агглютинация называется тонкозернистой; она происходит медленно — в течение 18—22 часов. У бактерий со жгутиками имеется два антигена — соматический, О-антиген, в самой клетке и жгутиковый, Н-антиген, находящийся в жгутиках. Клетки склеиваются друг с другом жгутиками и образуют рыхлые крупные хлопья.

Такая агглютинация называется крупнохлопчатой; она наступает быстро — в течение 2—4 часов.

Реакция агглютинации, благодаря своей специфичности, простоте постановки и демонстративности, получила широкое распространение в микробиологической практике для диагноза многих инфекционных заболеваний: брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, сыпного тифа, бруцеллеза и т. д. Ею пользуются с диагностической целью в двух направлениях.

1. Для определения выделенного из какого-либо субстрата неизвестного микроба. В этом случае агглютинацию ставят с определенной, заранее приготовленной агглютинирующей сывороткой, полученной путем иммунизации кроликов определенным видом бактерий и, следовательно, содержащей агглютинины в отношении этих бактерий.

В качестве антигена берут культуру неизвестного исследуемого микроба; положительный (результат (реакции указывает, что неизвестный микроб идентичен тому, который был взят в качестве антигена для приготовления агглютинирующей сыворотки).

2. Для обнаружения агглютининов к тому или другому определенному виду бактерий в сыворотке больного. В этом случае для агглютинации берут определенную лабораторную культуру бактерий (или несколько культур разных видов) в качестве антигена и сыворотку больного; положительный результат агглютинации указывает на то, что в сыворотке больного имеются агглютинины к определенному, известному виду микроба, т. е. что данный микроб является возбудителем заболевания, в процессе которого в сыворотке больного накопились защитные антитела.

В качестве примера можно привести использование реакции агглютинации для диагноза брюшного тифа. На первой неделе болезни в посевах из крови больного обнаруживают бактерий и для того, чтобы установить, что эти

бактерии являются брюшнотифозными палочками, ставят реакцию с лабораторной брюшнотифозной агглютинирующей сывороткой: если наступит агглютинация выделенных из крови больного неизвестных бактерий, это значит, что они являются брюшнотифозными бактериями.

Начиная со второй недели болезни, диагноз брюшного тифа устанавливают путем обнаружения в сыворотке больного антител-агглютининов. Для этого ставят реакцию агглютинации с сывороткой больного и с лабораторной культурой брюшнотифозных бактерий (обычно в опыт вводят еще культуры паратифа А и паратифа В): наступившая агглютинация покажет наличие агглютининов к брюшнотифозной палочке (или одной из паратифозных) в сыворотке больного, которые появились у него в процессе заболевания брюшным тифом. Эта реакция носит наименование реакции Видаля и широко применяется для диагноза брюшного тифа. Аналогичная реакция агглютинации для постановки диагноза сыпного тифа называется реакцией Вейль-Феликса, для диагноза бруцеллеза — реакцией Райта.

### **Получение иммунных сывороток**

Иммунные сыворотки, применяемые в медицинской практике, содержат антитела к микробам или их токсинам: они готовятся для лечебных и диагностических целей. Лечебные сыворотки применяются для лечения инфекционного заболевания так как введение больному большого количества готовых антител приводит к гибели микробов — возбудителей болезни или к обезвреживанию их ядов. Эти сыворотки реже применяются с профилактической целью, так как они сообщают лишь пассивный иммунитет, длящийся короткое время (2—3 недели).

Диагностические сыворотки используются для установления лабораторным путем диагноза инфекционного заболевания: при помощи специфических антител распознается выделенный из организма микроб — возбудитель данного заболевания.

Лечебные и диагностические сыворотки готовятся путем иммунизации животных соответствующими антигенами. Для получения больших количеств лечебной сыворотки иммунизируют крупных животных (лошадей); диагностические сыворотки получают чаще всего путем иммунизации кроликов. Иммунизация проводится путем подкожных или внутривенных инъекций антигена в возрастающих количествах обычно с интервалами между инъекциями в 5—8 дней; число инъекций зависит от цели иммунизации и характера антигена.

Первым этапом в технике получения иммунных сывороток является приготовление антигенов. Антигенами называются чужеродные для организма вещества, которые вызывают в организме образование антител. Последние различным образом воздействуют на микробы или их продукты. Антигеном может быть любое вещество белковой природы — микробы или другие клетки, продукты микробов (например, токсины) и, наконец, другие белковые вещества (например, сыворотка).

По окончании курса иммунизации у животных стерильно берут кровь (у лошадей — путем кровопускания из яремной вены, у кроликов —

непосредственно шприцем из сердца) и получают из нее после свертывания сыворотку. С этой целью кровь, собранную в стерильную посуду, сначала помещают в термостат при 37° на 4—6 часов, для ускорения свертывания, затем в ледник на сутки. Полученную прозрачную сыворотку осторожно отсасывают в стерильную посуду, прибавляют к ней для консервирования 0,5% хлороформа или других веществ. Лечебные сыворотки выдерживают на леднике в течение 4—6 месяцев. За это время происходит просветление сыворотки вследствие выпадения нестойких белков, снижаются ее токсические для человека свойства и устанавливается более или менее устойчивый титр антител. Затем сыворотки титруются на содержание антител, проверяются на стерильность и на безвредность для животных и расфасовываются по ампулам. Сыворотки сохраняются на холоду и в темноте; срок годности их считается 1 год; сыворотки помутневшие не допускаются к употреблению.

Наибольшее распространение приобрели антитоксические лечебные сыворотки (противодифтерийная, противостолбнячная, противогангренозные и др.), дающие быстрый терапевтический эффект благодаря нейтрализации микробного токсина в организме больного. Антибактериальные сыворотки (противоменингококковая, противострептококковая) оказывают более медленный эффект.

При практическом применении лечебных сывороток больному всегда вводят строго определенные дозы этих сывороток. Для антитоксических сывороток лечебную силу определяют в так называемых антитоксических единицах, обозначаемых АЕ. Единица антитоксина является условной величиной. Так, для дифтерийного антитоксина 1 АЕ считается то наименьшее количество иммунной сыворотки, которое нейтрализует 100 Dim дифтерийного токсина для морской свинки весом 250 г.

Диагностические сыворотки (агглютинирующие, преципитирующие и гемолитические) широко применяются в лабораторной практике.

**Иммунизация кролика.** Наиболее распространенным способом иммунизации животных является подкожное или внутривенное введение антигена (техника введения та же, что при заражении животных, см. стр. 107—109).

Антиген вводят в вену при помощи стерильного шприца с тонкой иглой. Наполнив шприц соответствующим антигеном, необходимо удалить пузырьки воздуха во избежание воздушной эмболии в случае попадания воздуха в вену; для этого берут шприц вертикально, вверх иглой, (насаживают на конец иглы кусок стерильной ваты и осторожно проталкивают поршнем поднявшиеся кверху пузырьки воздуха вместе с некоторым количеством жидкости. Техника внутривенного введения описана на стр. 109.

Объем вводимой в вену жидкости обычно равен 0,5—1—1,5 мл. Если антигеном являются бактерии, то делают суспензию по стандарту из суточной культуры бактерий, убивают бактерий нагреванием при 60° в течение часа и вводят в вену 1 мл суспензии. При иммунизации эритроцитами отмывают их физиологическим раствором путем трехкратного центрифугирования и отсасывания жидкости над осадком, затем готовят 50% взвесь

эритроцитов в физиологическом растворе и вводят в вену 0,5 мл этой взвеси. При повторной иммунизации доза антигена увеличивается.

Взятие крови у кролика. Небольшие количества крови у кролика берут из краевой ушной вены. Техника взятия крови из вены подобна технике внутривенных инъекций, отличаясь тем, что здесь берут пустой шприц, в который медленно набирают, вытягивая поршень, свободно поступающую из вены кровь. Если нет необходимости в сохранении стерильности крови, то можно получать ее путем прокола вены иглой шприца, через которую кровь обильно вытекает в подставленную пробирку. Большие количества крови извлекают непосредственно из сердца стерильным шприцем (см. стр. 110), после чего кролику вводят подкожно равный объем подогретого до 38° физиологического раствора.

### **Получение адсорбированной агглютинирующей сыворотки методом истощения (адсорбции) по Кастеллани.**

#### **Метод адсорбции агглютининов по Кастеллани**

При постановке реакции агглютинации иногда наблюдается явление групповой агглютинации, когда сыворотка больного (а иногда и агглютинирующая диагностическая сыворотка) агглютинирует не один вид микроба, а несколько видов, родственных один другому. Так, например, сыворотка больного брюшным тифом может агглютинировать не только брюшнотифозных бактерий, но и паратифозных А и В; диагностическая дизентерийная сыворотка агглютинирует несколько видов дизентерийных бактерий. То же явление может встретиться и при определении вида исследуемого микроба путем агглютинации, когда обнаруживается, что он агглютинируется не одной специфической сывороткой, но и другими сыворотками близких типов.

В этих случаях, благодаря наличию идентичных компонентов в сложных бактериальных антигенах, в иммунной сыворотке могут оказаться не только антитела к специфическому микробу, но и групповые антитела к родственным видам микробов. Это явление, затрудняющее точную серодиагностику и идентификацию микроба, может быть устранено методом адсорбции агглютининов, предложенным Кастеллани.

Метод основан на том, что при добавлении к иммунной сыворотке специфического антигена он адсорбирует полностью все антитела — и специфические, и групповые, в то время как неспецифический антиген способен связать только побочные (групповые) антитела, оставляя свободными антитела к специфическому антигену. Так, в приведенном выше примере после прибавления брюшнотифозных бактерий к сыворотке больного брюшным тифом они адсорбируют все антитела, и в дальнейшем эта сыворотка больше не будет способной к агглютинации. Если же к другой порции этой сыворотки прибавить микробов паратифа, то в наступившей групповой реакции паратифозные бактерии свяжут только групповые антитела, но не специфические, после чего сыворотка окажется вполне способной агглютинировать специфических микробов — брюшнотифозные палочки.

### **Титрование агглютинирующей сыворотки:**

Тип реакции: реакция агглютинации.

Исследуемый материал: сыворотка животного, гипериммунизированного бактериальной взвесью.

Диагностический препарат: взвесь убитых бактерий, применявшихся для гипериммунизации.

Принцип метода: к серийным разведениям агглютинирующей сыворотки добавляют равные количества взвеси убитых бактерий, применявшихся для получения этой сыворотки.

Положительный результат реакции: образование хлопьев, просветление жидкости. Отрицательный результат: равномерная муть. Применение: для определения титра агглютинирующей сыворотки.

*Титр агглютинирующей сыворотки* - наибольшее разведение сыворотки, в которой еще наблюдается агглютинация. В данном случае титр агглютинирующей сыворотки равен

Серотипирование – изучение антигенного состава микроорганизмов

### **Методические указания**

#### **Постановка реакции агглютинации**

Существует несколько методов постановки реакции агглютинации:

1) макроскопическая (развернутая) агглютинация в пробирках, которая учитывается через 2 часа выдерживания при 37° и на следующий день стояния при комнатной температуре;

2) ориентировочная агглютинация на предметном стекле в капле концентрированной агглютинирующей сыворотки, наступающая в течение нескольких минут;

3) ускоренный метод Нобля с применением концентрированных сывороток и встряхиванием, для чего требуется 8—10 минут.

Агглютинирующая диагностическая сыворотка готовится путем иммунизации кроликов; полученную иммунную сыворотку, определив ее титр (максимальное разведение), разливают по ампулам с добавлением консерванта; следует иметь в виду, что обозначенный на ампуле титр сыворотки со временем снижается. Иногда употребляют высушенную сыворотку; при пользовании сухими сыворотками разводят их дистиллированной водой 1 : 9 из расчета, что сыворотка потеряла при высушивании 9 частей веса.

Сыворотка от больного для постановки реакции агглютинации получается из его крови, взятой стерильно из локтевой вены в количестве 5—10 мл. Одновременно часть крови употребляют для посева. Если же кровь берут только для постановки реакции, то вполне достаточно 1—2 мл; тогда берут кровь из пальца путем прокола иглой Франка.

Антигеном для реакции агглютинации являются соответствующие культуры бактерий в живом или убитом состоянии. Живыми культурами пользуются тогда, когда агглютинация ставится с целью определения вида бактерий, выделенных из Какого-либо субстрата; в таком случае суточную

агаровую культуру бактерий смывают 1—2 мл физиологического раствора и полученной взвесью бактерий пользуются для реакции.

При постановке же реакции с сывороткой больного принято пользоваться заранее заготовленными диагностикумами — взвесью убитых бактерий.

### **Приготовление О- и Н-антигенов**

Соматический О-антиген бактерий является по своему составу сложным химическим комплексом, специфичность которого определяется глюцидолшитоидополипептидным компонентом.

Этот антиген устойчив к воздействию температуры, спирта в противоположность жгутиковому Н-антигену. Эта различная устойчивость О- и Н-антигенов к нагреванию и спирту положена в основу приготовления О-антигена.

Наиболее простым способом приготовления О-антигена является прогревание пробирки со смывом агаровой культуры соответствующего микроорганизма в кипящей водяной бане в течение 1,5—2 часов (по Кауфману достаточно 30 минут).

Для приготовления спиртового О-антигена берут возможно более густую взвесь микробов в физиологическом растворе (смыв агаровой культуры). К определенному объему взвеси маленькими порциями медленно добавляют равный объем абсолютного этилового спирта, причем после добавления каждой его порции пробирку с антигеном встряхивают. После добавления всего объема спирта пробирку помещают в термостат на 12—24 часа, после чего в нее добавляют физиологический раствор в количестве половины объема жидкости, содержащейся в данной пробирке (концентрация спирта—33%). Перед употреблением полученный антиген разводят еще в 6 раз.

Приготовление жгутикового Н-антигена основано на том, что обработка подвижных микробов формалином приводит к понижению активности соматического антигена. Для приготовления жгутикового антигена к взвеси агаровой культуры микробов в физиологическом растворе добавляют 0,2% формалина, после чего взвесь выдерживают в термостате при 37° в течение 24 часов.

Агглютинирующая диагностическая сыворотка содержит антитела, полученные из сыворотки крови гипериммунизированных животных, предназначена для постановки реакций агглютинации

**Определение антигенного состава Х-культуры с помощью неадсорбированных и адсорбированных агглютинирующих сывороток.**

#### **1. Ориентировочная реакция агглютинации**

Ориентировочную реакцию агглютинации ставят на предметном стекле. Наносят пастеровской пипеткой каплю физиологического раствора, затем в ней тщательно размешивают небольшое количество культуры до получения гомогенной взвеси бактерий. Если отсутствует реакция самоагглютинации, продолжают исследование. Рядом с первой каплей наносят каплю сыворотки в разведении 1 : 10, 1 : 20 и смешивают обе капли. Через несколько минут в случае положительного результата наблюдается образование агглютината ,

которое еще ускорится, если слегка покачивать стекло

## **2. Реакция развернутой агглютинации с целью серотипирования E. coli**

Применяется для подтверждения результатов ориентировочной реакции агглютинации с моновалентными сыворотками.

Сначала готовят основное разведение взвеси микроорганизмов (1:50). из которого делают серию разведений путем последовательного переноса 0,5 мл из предыдущей пробирки в следующую пробирку ряда (0,5 + 0,5 физраствора). Из последней пробирки 0,5 мл разведенной взвеси удаляют для сохранения одинакового объема. В контрольную пробирку (контроль антигена) вносят 1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

В каждую пробирку с разведениями и в контрольную пробирку вносят пастеровской пипеткой по 2 капли моновалентной сыворотки. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37°C на 2 ч, затем сутки выдерживают при комнатной температуре.

Учет реакции развернутой агглютинации производят, оценивая последовательно каждую пробирку, начиная с контрольных, при осторожном встряхивании. В контрольных пробирках агглютинации не должно быть. Интенсивность реакции агглютинации отмечают следующими знаками: "++++" — полная агглютинация (хлопья агглютината в абсолютной прозрачной жидкости), "+++" — неполная агглютинация (хлопья в слабоопалесцирующей жидкости), "++" — частичная агглютинация (хлопья четко различимы, жидкость слегка мутная), "+" — слабая, сомнительная агглютинация (жидкость очень мутная, хлопья в ней плохо различимы), "—" — отсутствие агглютинации (жидкость равномерно мутная).

### **Контрольные вопросы:**

1. Какими свойствами обладают антигены?
2. Какие виды антител Вы знаете?
3. Назовите стадии антителообразования
4. Каков механизм реакций иммунитета.
5. Перечислите виды реакций агглютинации.
6. Охарактеризуйте основные способы получения иммунных сывороток.

### **Список литературы:**

#### **Обязательная:**

1. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: Учебник. — М.: Медицина, 2000. — 432 с : ил. (Учеб. лит. для студ. медвузов).
2. Ковальчук Л.В и др. Иммунология: практикум: учеб. пособие — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 176 с.
3. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / под ред. акад. РАМН В.И. Покровского - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2001. — 768 с.
4. Борисов Л.Б. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М. 1997 г.

#### **Дополнительная:**

1. Генкель П.А., Микробиология с основами вирусологии. М., 1974 г.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов.- 3-е издание, испр. и доп. – СПб, СпецЛит. 2002. – 591 с.
3. Борисов Л.Б., Смирнова А.М., Медицинская микробиология, вирусология, иммунология, М., Медицина. 1994 г.
4. Тимаков В.Д., Левашов В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. М. 1983 г.

**Тема № 4: ИММУНИТЕТ: ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ И  
ТОЛЕРАНТНОСТЬ.ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЙ  
ИММУНИТЕТ.ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ.**

**Цель:** Познакомиться с механизмами иммунологической памяти и толерантности. Изучить особенности трансплантационного иммунитета.

Научиться ставить реакцию Видаля, РНГА. Уметь интерпретировать результаты реакций.

**Вопросы для самоподготовки:**

1. Иммунологическая память.
2. Иммунологическая ареактивность
3. Иммунологическая толерантность.
4. Трансплантационный иммунитет.
5. Реакции агглютинации (РА). Нагрузочные реакции. РНГА
6. Критерии серодиагностики: диагностический титр, нарастание титра антител.
7. Применение реакций АГ+АТ в диагностике: изучение антигенного состава микроорганизмов (серотипирование), экспрессдиагностика, индикация антигенов в объектах внешней среды, серодиагностика.

**План:**

**Программа:**

1. Иммунологическая память и толерантность
2. Трансплантационный иммунитет
3. Критерии серодиагностики
3. Реакции агглютинации (РА) для серодиагностики брюшного тифа
4. Нагрузочные реакции. РНГА

**Демонстрация:**

1. Диагностические препараты для выявления антител (диагностикумы).
2. Результаты постановки реакции агглютинации по Видалю.
3. Результаты постановки РНГА.

**Задание студентам:**

1. Поставить развернутую реакцию агглютинации для определения титра антител к возбудителю брюшного тифа. Протоколировать и оценить результаты реакции.
2. Поставить РНГА с целью серодиагностики. Оценить результаты РНГА, поставленной с целью серодиагностики.

**Информационный материал**

**Иммунологическая память**

При повторной встрече с антигеном организм формирует более активную и быструю иммунную реакцию — вторичный иммунный ответ. Этот феномен получил название *иммунологической памяти*.

**Иммунологическая память имеет высокую специфичность к конкретному антигену, распространяется как на гуморальное, так и клеточное звено иммунитета и обусловлена В- и Т-лимфоцитами. Она образуется практически всегда и сохраняется годами и даже десятилетиями. Благодаря ей наш организм защищен от повторных антигенных интервенций.**

Известно два наиболее вероятных механизма формирования иммунологической памяти.

1.Предполагает длительное сохранение антигена в организме. Этому имеется множество примеров: инкапсулированный возбудитель туберкулеза, персистирующие вирусы кори, полиомиелита, ветряной оспы и некоторые другие патогены длительное время, иногда всю жизнь, сохраняются в организме, поддерживая в напряжении иммунную систему. Вероятно также наличие долгоживущих дендритных АПК, способных длительно сохранять и презентировать антиген.

2.Предусматривается, что в процессе развития в организме иммунного ответа часть антигенореактивных Т- или В-лимфоцитов дифференцируется в малые покоящиеся клетки, или *клетки иммунологической памяти*. Они отличаются высокой специфичностью к конкретной антигенной детерминанте и большой продолжительностью жизни (до 10 лет и более), активно циркулируют в организме, но постоянно возвращаются в места своего происхождения за счет хоминговых рецепторов. Это обеспечивает постоянную готовность иммунной системы реагировать на повторный контакт с антигеном по вторичному типу.

Феномен иммунологической памяти широко используется в практике вакцинации людей. Осуществляют это 2-3-кратными прививками при первичной вакцинации и периодическими повторными введениями вакцинного препарата — *ревакцинациями*.

Однако феномен иммунологической памяти имеет и отрицательные стороны. Например, повторная попытка трансплантировать уже однажды отторгнутую ткань вызывает — *криз отторжения*.

### **Иммунологическая толерантность**

Иммунологическая толерантность — явление, противоположное иммунному ответу и иммунологической памяти. Проявляется она отсутствием специфического продуктивного иммунного ответа организма на антиген в связи с неспособностью его распознавания.

Иммунологическая толерантность предполагает изначальную ареактивность иммунокомпетентных клеток к определенному антигену.

Открытию иммунологической толерантности предшествовали работы Р. Оуэна (1945), который обследовал разнояйцовых телят-близнецов. Ученый установил, что такие животные в эмбриональном периоде обмениваются через плаценту кровяными ростками и после рождения обладают одновременно двумя типами эритроцитов — своими и чужими. Наличие чужеродных эритроцитов не вызывало иммунную реакцию и не приводило к внутрисосудистому гемолизу. Явление было названо *эритроцитарной мозаикой*. Однако Оуэн не смог дать ему объяснение.

Собственно феномен иммунологической толерантности был открыт в 1953 г. независимо чешским ученым М. Гашеком и группой английских исследователей во главе с П. Медавара. Гашек в опытах на куриных эмбрионах, а Медавар — на новорожденных мышатах показали, что организм становится нечувствительным к антигену при его введении в эмбриональном или раннем постнатальном периоде.

Иммунологическую толерантность вызывают антигены, которые получили название *толерогены*. Ими могут быть практически все вещества,

---

однако наибольшей толерогенностью обладают полисахариды.

Иммунологическая толерантность бывает врожденной и приобретенной. Примером *врожденной толерантности* является отсутствие реакции иммунной системы на свои собственные антигены. *Приобретенную толерантность* можно создать, вводя в организм вещества, подавляющие иммунитет (иммунодепрессанты), или же путем введения антигена в эмбриональный период или в первые дни после рождения индивидуума. Приобретенная толерантность может быть активной и пассивной. *Активная толерантность* создается путем введения в организм толерогена, который формирует специфическую толерантность. *Пассивную толерантность* можно вызвать веществами, тормозящими биосинтетическую или пролиферативную активность иммунокомпетентных клеток (антилимфоцитарная сыворотка, цитостатики и пр.).

Иммунологическая толерантность отличается специфичностью — она направлена к строго определенным антигенам. По степени распространенности различают поливалентную и расщепленную толерантность. *Поливалентная толерантность* возникает одновременно на все антигенные детерминанты, входящие в состав конкретного антигена. Для *расщепленной*, или *моновалентной*, *толерантности* характерна избирательная невосприимчивость каких-то отдельных антигенных детерминант.

Степень проявления иммунологической толерантности существенно зависит от ряда свойств макроорганизма и толерогена. Так, на проявление толерантности влияет возраст и состояние иммунореактивности организма. Иммунологическую толерантность легче индуцировать в эмбриональный период развития и в первые дни после рождения, лучше всего она проявляется у животных со сниженной иммунореактивностью и с определенным генотипом.

Наибольшей толерогенностью обладают наименее чужеродные по отношению к организму антигены, имеющие малую молекулярную массу и высокую гомогенность. Легче всего формируется толерантность на тимуснезависимые антигены, например, бактериальные полисахариды.

Важное значение в индукции иммунологической толерантности имеют доза антигена и продолжительность его воздействия. Различают высокодозовую и низкодозовую толерантность. *Высокодозовую толерантность* вызывают введением больших количеств высококонцентрированного антигена. При этом наблюдается прямая зависимость между дозой вещества и производимым им эффектом. *Низкодозовая толерантность*, наоборот, вызывается очень малым количеством высокоомогенного молекулярного антигена. Соотношение «доза-эффект» в этом случае имеет обратную зависимость.

В эксперименте толерантность возникает через несколько дней, а иногда часов после введения толерогена и, как правило, проявляется в течение всего времени, пока он циркулирует в организме. Эффект ослабевает или прекращается с удалением из организма толерогена. Обычно иммунологическая толерантность наблюдается непродолжительный срок — всего несколько дней. Для ее пролонгирования необходимы повторные инъекции препарата.

Механизмы толерантности многообразны и до конца не расшифрованы. Известно, что ее основу составляют нормальные процессы регуляции иммунной системы. Выделяют три наиболее вероятные причины развития иммунологической толерантности:

1. Элиминация из организма антигенспецифических клонов лимфоцитов.
2. Блокада биологической активности иммунокомпетентных клеток.
3. Быстрая нейтрализация антигена антителами.

Элиминации, или делеции подвергаются, как правило, клоны аутореактивных Т- и В-лимфоцитов на ранних стадиях их онтогенеза. Активация антигенспецифического рецептора (TCR или BCR) незрелого лимфоцита индуцирует в нем апоптоз. Этот феномен, обеспечивающий в организме ареактивность к аутоантигенам, получил название *центральной толерантности*.

Основная роль в блокаде биологической активности иммунокомпетентных клеток принадлежит иммуноцитокинам. Воздействуя на соответствующие рецепторы, они способны вызвать ряд «негативных» эффектов. Например, пролиферацию Т- и В-лимфоцитов активно тормозит  $\beta$ -ТФР. Дифференцировку Т0-хелпера в Т1 можно заблокировать при помощи ИЛ-4, -13, а в Т2-хелпер —  $\gamma$ -ИФН. Биологическая активность макрофагов ингибируется продуктами Т2-хелперов (ИЛ-4, -10, -13,  $\beta$ -ТФР и др.).

Биосинтез в В-лимфоците и его превращение в плазмоцит подавляется IgG. Быстрая инаktivация молекул антигена антителами предотвращает их связывание с рецепторами иммунокомпетентных клеток — элиминируется специфический активирующий фактор.

Возможен адаптивный перенос иммунологической толерантности интактному животному путем введения ему иммунокомпетентных клеток, взятых от донора. Толерантность можно также искусственно отменить. Для этого необходимо активировать иммунную систему адъювантами, интерлейкинами или переключить направленность ее реакции иммунизацией модифицированными антигенами. Другой путь — удалить из организма толероген, сделав инъекцию специфических антител или проведя иммуносорбцию.

Феномен иммунологической толерантности имеет большое практическое значение. Он используется для решения многих важных проблем медицины, таких как пересадка органов и тканей, подавление аутоиммунных реакций, лечение аллергий и других патологических состояний, связанных с агрессивным поведением иммунной системы.

### **Трансплантационный иммунитет**

Трансплантология — область биологии и медицины, изучающая проблемы трансплантации, разрабатывающая методы консервирования органов и тканей, создания и применения искусственных органов.

Участие иммунной системы в отторжении чужеродной ткани впервые были проведены П. Медавара в 1945 г. Эти первые наблюдения явились отправной точкой для формирования экспериментально-практического направления исследований - трансплантационной иммунологии.

Основные закономерности отторжения чужеродной ткани были выявлены при трансплантации кожных лоскутов между инбредными линиями мышей. При первичной пересадке аллотрансплантата в первые два дня устанавливается общее кровообращение между трансплантатом и реципиентом, края пересаженной кожи срастаются с кожей хозяина. Внешне в течение 4 – 5 дней трансплантат кажется прижившимся. Однако именно в этот внешне благополучный период формируются эффекторный механизмы отторжения. К 6 – 7 дню наблюдается отечность трансплантата, прекращается его кровоснабжение, развиваются геморрагии. В зоне локализации трансплантата скапливаются клетки воспалительной реакции, среди которых доминируют лимфоциты. Начинается процесс деструкции трансплантата. К 10 – 11 дню трансплантат погибает, а его пересадка на исходного донора не приводит к восстановлению жизнеспособности.

При повторной пересадке трансплантата от того же донора реакция отторжения развивается приблизительно в два раза быстрее – за 6 – 8 дней.

Основными провоцирующими отторжение факторами являются молекулы (антигены) МНС.

Однако при условии полной идентичности по МНС между донором трансплантата и реципиентом, но различиях по другим антигенам (так называемым минорным антигенам гистосовместимости) реакция все – таки развивается, хотя носит хронический характер.

Кроме того, в отторжении участвуют Т – клетки, и основными эффекторами являются цитотоксические CD8 Т – клетки и CD 4 Т- клетки воспаления. Последние привлекают в зону отторжения трансплантата клетки воспаления и в первую очередь макрофаги. Распознавание трансплантационных антигенов происходит либо непосредственно на клетках трансплантата, либо в ближайшей (региональной) лимфоидной ткани, куда поступает отрывающийся от клеточной поверхности антиген.

Особое место в отторжении трансплантата играют антитела, которые по тем или иным причинам предсуществуют в организме реципиента. Такие антитела, взаимодействуя с антигенами эндотелия сосудов, пронизывающих трансплантат, инициируют систему комплемента и каскад реакций, приводящих к закупорке сосудов.

Практический успех трансплантации зависит от правильного подбора пар донор – реципиент по антигенам гистосовместимости, эффективного применения иммуносупрессорных препаратов, успешной профессиональной работы хирурга.

**Серодиагностика** – распознавание этиологической сущности заболеваний (бактериальных, грибковых, вирусных и паразитарных преимущественно) посредством выявления антител в сыворотке крови (отсюда и происходит термин «серодиагностика»). На практике чаще всего используются реакция связывания комплемента (РСК), реакция агглютинации (РА), реакция гемагглютинации (РГА), реакции преципитации (РП) и бактериолиза.

**Экспресс-диагностика** - это быстрое обнаружение микроорганизмов или их антигенов в материале от больного.

### **Методические указания**

#### **Применение реакции агглютинации в серодиагностике.**

#### **РА с целью серодиагностики брюшного тифа (реакция Видаля).**

#### **1. Реакция агглютинации по Видалю с целью серодиагностики брюшного тифа**

Для постановки реакции берут:

- 1) сыворотку исследуемого больного для определения в ней антител;
- 2) О - и Н-диагностикумы бактерий брюшного тифа, паратифа А и паратифа В;
- 3) физиологический раствор.

Кровь для получения сыворотки берут в количестве—15—20 капель путем укола мякоти пальца или 2 —3 мл при помощи венепункции.

Дают крови свернуться в термостате в течение 30—60 минут, затем простерилизованной петлей обводят сгусток, отделяя его от стенки пробирки, и дают отстояться сыворотке на холоду до образования над сгустком прозрачного слоя. Сыворотку помещают пипеткой в отдельную пробирку. Первое разведение (1:50) делают при помощи пипетки—0,1 мл сыворотки + 4,9 мл физиологического раствора. Дальнейшие разведения (1:100— 1:200 — 1 : 400—1:800) готовят по обычной схеме.

Берут 6 рядов пробирок по 6 пробирок в каждом. По 1 мл сыворотки разведения 1: 100 наливают в первую пробирку каждого ряда, 1: 200 — во вторую, 1 : 400 — в третью и т. д.; в шестую, контрольную, пробирку наливают 1 мл физиологического раствора.

Во все пробирки первого ряда добавляют по 1—2 капли брюшнотифозного Н-диагностикума; в пробирки второго ряда — брюшнотифозный О-диагностикум; в пробирки третьего и четвертого ряда добавляют А-паратифозный, Н - и О-диагностикумы, а в 5-й и 6-й ряд— В-паратифозный Н - и О-диагностикум. Пробирки ставят в термостат на 2 часа, отмечают результат реакции, затем оставляют при комнатной температуре на сутки; после этого срока дают заключение об окончательном результате реакции.

Возбудителем заболевания считается тот микроб, который агглютинируется сывороткой больного. Реакция считается положительной, если агглютинация произошла хотя бы в первой пробирке с разведением 1: 100; обычно она наступает в больших разведениях. Если происходит групповая агглютинация с двумя или с тремя антигенами, то за возбудителя болезни принимается тот микроб, с которым произошла агглютинация в наиболее высоком разведении сыворотки.

#### **Нагрузочные реакции**

#### **2. РНГА с Vi-эритроцитарным диагностикумом**

Тип реакции - реакция непрямой гемагглютинации.

Исследуемый материал - сыворотка крови обследуемого.

Диагностический препарат - Vi-эритроцитарный диагностикум (взвесь в физиологическом растворе эритроцитов барана с нагруженными на них Vi - антигенами S.typhi ).

Принцип реакции: к разведениям сыворотки обследуемого добавляют Vi-эритроцитарный диагностикум.

Положительный результат – гемагглютинат ("зонтик"); отрицательный результат - плотный осадок эритроцитов на дне лунки ("пуговка").

Диагностический титр реакции 1/ 40.

Применение: отбор лиц, имеющих титр антител к Vi – антигенам S.typhi выше диагностического.

Трактовка результатов: лица с положительной реакцией в титре выше, чем 1/40 считаются подозрительными на бактерионосительство S.typhi и подлежат бактериологическому обследованию на наличие S.typhi в кале, моче и желчи.

### **Контрольные вопросы:**

1. Каков механизм иммунологической толерантности?
2. Какими свойствами обладают толерогены?
3. Что изучает трансплантология?
4. Какие виды антител Вы знаете?
5. Что такое серодиагностика?
6. Каков механизм реакции развернутой агглютинации.

### **Список литературы:**

#### **Обязательная:**

1. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: Учебник. — М.: Медицина, 2000. — 432 с : ил. (Учеб. лит. для студ. медвузов).
2. Ковальчук Л.В и др. Иммунология: практикум: учеб. пособие – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 176 с.
3. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / под ред. акад. РАМН В.И. Покровского - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2001. – 768 с.
4. Борисов Л.Б. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М. 1997 г.

#### **Дополнительная:**

1. Генкель П.А., Микробиология с основами вирусологии. М., 1974 г.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов.- 3-е издание, испр. и доп. – СПб, СпецЛит. 2002. – 591 с.
3. Борисов Л.Б., Смирнова А.М., Медицинская микробиология, вирусология, иммунология, М., Медицина. 1994 г.
4. Тимаков В.Д., Левашов В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. М. 1983 г.

**Тема №5 ИММУНИТЕТ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ**  
**ИММУНИТЕТА И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ**  
**ИНФЕКЦИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ**  
**ИММУНИТЕТ. КОМПЛЕМЕНЗАВИСИМЫЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ**  
**РЕАКЦИИ**

**Цель:** Познакомиться с особенностями взаимодействия факторов иммунитета и неспецифической резистентности при инфекциях различной этиологии. Изучить механизмы противоопухолевого иммунитета. Научиться учитывать результаты реакции иммунного гемолиза и РСК и интерпретировать их результаты

**Основные вопросы, разбираемые на занятии:**

1. Особенности взаимодействия факторов иммунитета и неспецифической резистентности при инфекциях различной этиологии
2. Противоопухолевый иммунитет, его значение.
3. Реакции с участием комплемента (реакции иммунного бактериолиза, иммунного гемолиза, РСК).
4. Получение препаратов: комплемент, гемолитическая сыворотка.
5. Определение периода болезни с помощью серодиагностики (раздельное определение IgM, IgG).

**План**

**Программа**

1. Взаимодействие факторов иммунитета и неспецифической резистентности при инфекциях различной этиологии
2. Противоопухолевый иммунитет
3. Комплементзависимые серологические реакции

**Демонстрации.**

1. Таблицы и схемы, иллюстрирующие иммунный ответ при различных инфекциях.
2. Результаты РСК

**Задание студентам**

1. Зарисовать схему иммунного ответа при бактериальных инфекциях
2. Зарисовать схему иммунного ответа при вирусных инфекциях
3. Зарисовать схему иммунного ответа при протозойных инвазиях
4. Зарисовать схему иммунного ответа при глистных инвазиях
5. Зарисовать схему иммунного ответа при микозах
6. Учесть результаты РСК

**Информационный материал**

**При бактериальных инфекциях различают:**

**антибактериальный иммунитет** - иммунитет против структурно-функциональных компонентов бактериальной клетки

**антитоксический иммунитет** - иммунитет против белковых токсинов микроорганизмов.

**Противовирусный иммунитет** – иммунитет при вирусных инфекциях

Иммунная защита макроорганизма при вирусных инфекциях имеет особенности, обусловленные двумя формами существования вируса: внеклеточной и внутриклеточной.

**Противогрибковый иммунитет** - иммунитет при микозах. Антигены грибов имеют относительно низкую иммуногенность, они стимулируют клеточное звено иммунитета, основными действующими факторами противогрибкового иммунитета являются активированные макрофаги.

**Противопаразитарный иммунитет** – иммунитет при паразитарных инвазиях, изучен слабо. Паразитарная инвазия сопровождается формированием в макроорганизме гуморального и клеточного иммунитета.

Противоглистный иммунитет – иммунный ответ на глистные инвазии. Ведущую роль в осуществлении иммунной защиты макроорганизма от глистной инвазии играют эозинофилы.

**Противоопухолевый иммунитет** - иммунный ответ на наличие в организме опухолевых клеток.

Раковая болезнь – не одно определенное заболевание, этим понятием объединяют большую группу злокачественных опухолей, которые отличаются друг от друга местом возникновения, скоростью развития, клиническими признаками и рядом других особенностей. Но у всех злокачественных образований есть общие признаки, и один из них – это появление в опухолевых клетках специфических антигенов, отсутствующих в нормальных тканях организма.

Опухоль зарождается в нормальной ткани организма, среди его нормальных клеток. Некоторые из них в результате мутации, другие в результате действия особых вирусов или веществ канцерогенов способны превращаться в раковую, которая начинает интенсивно делиться и дает начало опухоли. Самой важной особенностью опухолевых клеток является их автономность – независимость темпов размножения и других проявлений их жизнедеятельности от внешних воздействий, изменение и регулировка жизнедеятельности нормальных клеток.

Характерной чертой злокачественных новообразований является способность опухолевой ткани врастать в окружающие ткани и, разрушая, замещать их. Основными этапами метастазирования можно считать отделение опухолевых клеток от основного узла и попадания их в кровоток, венозный или лимфатический сосуд.

Отличительным признаком многих особенно злокачественных опухолей является анаплазия ткани, возвращение ее к более примитивному типу. Различают морфологическую анаплазию, т.е. утрата опухолевой тканью особенностей, характерных для дифференцировки тканей. Функциональная анаплазия – частичная или полная утрата опухолевой тканью способности выполнять специфические функции, характерные для нормальной ткани: секреторные, сократительные и т.д. Биохимическая анаплазия проявляется в исчезновении из опухолевых клеток части или всех специфических факторов характерных для нормальных клеток. Иммунологическая анаплазия

проявляется в исчезновении из опухолевых клеток ряда антигенов, типичных для нормальных клеток. В ряде случаев опухолевые клетки приобретают способность подавлять иммунный ответ и тем самым «ускользнуть» из под контроля со стороны иммунной системы.

Представление о противоопухолевом иммунитете в последние годы меняется и от общепринятой теории Т – клеточного надзора приближается к концепции, согласно которой естественный и адаптивный иммунитет защищает против разных опухолей, как это происходит, например, при внедрении болезнетворных микробов.

Одной из важных сторон классификации является номенклатура опухолей, в которой отражено их тканевое происхождение, суффикс «ома» (с греч.- опухоль), присоединяется к корням слов, например, гематосаркома. Злокачественная эпителиома носит название «рак» вероятно в связи с тем, что первые наблюдения древних врачей относились к раку молочной железы или кожи, прорастая в окружающей ткани тяжами, напоминает клешни рака.

Все опухоли разделяют на доброкачественные и злокачественные. К благоприятным (доброкачественным) относят опухоли обладающие свойствами: они медленно растут и не дают метастазов, они лишь отодвигают, раздвигают или сдавливают окружающие ткани не разрушая их. Злокачественные опухоли отличаются быстрым прогрессирующим ростом. Дают метастазы, инфильтруют, прорастают в окружающие ткани и разрушают их.

### **Профилактика злокачественных опухолей**

Выделяют три этапа профилактических мер:

1. Предупреждение развития избыточных клеточных пролифераз, которые чаще проявляются на фоне хронического воспалительного процесса или гормональных гиперплазий. Необходимо проводить широкие оздоровительные мероприятия, направленные на устранение вредных факторов среды.
2. Своевременное выявление и адекватное лечение уже возникающих пребластоматозных состояний.
3. Предупреждение прогрессирования уже возникшей злокачественной опухоли путем своевременного применения рациональных методов лечения.

### ***Реакции с участием комплемента***

Реакция иммунного бактериолизиса - реакция  $Ag+At$ , в которой происходит лизис бактерий в присутствии комплемента

Реакция иммунного гемолиза реакция  $Ag+At$ , в которой происходит лизис эритроцитов в присутствии комплемента

**Реакция связывания комплемента (РСК).** Реакция связывания комплемента – одна из наиболее чувствительных иммунологических диагностических реакций. Принцип ее заключается в том, что при взаимодействии специфических антигена и антитела происходит связывание комплемента. Индикатором служит гемолитическая система (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка к ним). Отсутствие гемолиза (для него

также необходим свободный комплемент) свидетельствует о том, что комплемент уже связан и, следовательно, в данной сыворотке (смешанной с данным антигеном) имеются антитела, способные взаимодействовать с избранным антигеном. В таких случаях говорят, что РСК положительна. Появление гемолиза свидетельствует о том, что комплемент свободен и таким образом против исследуемого антигена в крови больного нет антител; РСК отрицательна.

## **Методические указания**

### **1. Реакции Вассермана (серодиагностика сифилиса)**

Тип реакции: РСК.

Исследуемый материал: сыворотка обследуемого.

Диагностические препараты:

1. Неспецифический кардиолипидный АГ (антиген) для реакции Вассермана - спиртовая липидная вытяжка из миокарда быка, обогащенная холестерином.

2. Специфический ультразвученный трепонемный АГ – содержит АГ культуральных трепонем, разрушенных ультразвуком.

Дополнительные ингредиенты реакции: комплемент в рабочей дозе; гемолитическая сыворотка в рабочей дозе; эритроциты барана (3 % взвесь).

Положительная реакция - задержка гемолиза; отрицательная - гемолиз.

*Качественный метод* - сыворотку обследуемого вносят в 2 лунки, добавляют соответственно АГ 1 и АГ 2, а затем в обе лунки - дополнительные ингредиенты реакции. Применение: отбор лиц для постановки количественной реакции Вассермана.

В данном случае обследованы пациенты ... (результат, вывод).

*Количественный метод* - диагностика сифилиса, контроль эффективности терапии. Готовят разведения положительной сыворотки (по качественной реакции). К каждому разведению добавляют трепонемный ультразвученный АГ (АГ2) и дополнительные ингредиенты реакции. Положительный результат - 3Г (задержка гемолиза), отрицательный - Г (гемолиз).

Результат интерпретируют, основываясь на количестве антител.

### **2. РСК с целью раздельного определения IgM и IgG**

Тип реакции - реакция связывания комплемента.

Исследуемый материал - сыворотка крови больного (нативная и обработанная меркаптоэтанолом).

Диагностический препарат - известный антиген для РСК.

Дополнительные ингредиенты реакции: комплемент в рабочей дозе; гемолитическая сыворотка в рабочей дозе; эритроциты барана (3 % взвесь).

Положительная реакция - задержка гемолиза; отрицательная - гемолиз.

Принцип метода: при обработке сыворотки меркаптоэтанолом

разрушаются IgM.

Следовательно, с обработанной сывороткой реакция идет только за счет IgG.

Постановка реакции: готовят разведения нативной и обработанной сывороток, добавляют диагностический препарат и дополнительные ингредиенты реакции.

Трактовка результатов: если с обработанной сывороткой реакция идет практически таком же титре, как с необработанной, значит она содержит преимущественно IgG. Если в обработанной сыворотке титр антител резко снизился по сравнению с необработанной, значит она содержит преимущественно IgM.

В данном случае...(результат и вывод).

Для получения достоверного результата необходимо, чтобы все известные ингредиенты были взяты в определенных количествах (рабочие дозы). Для этого кол-во комплемента и гемолитическую сыворотку предварительно титруют и вычисляют их рабочие дозы.

### **3. Титрование комплемента**

Тип реакции - реакция иммунного гемолиза.

Исследуемый материал - свежая сыворотка крови.

Дополнительные ингредиенты реакции: гемолитическая система (гемолитическая сыворотка в рабочей дозе и 3% взвесь эритроцитов барана).

Положительная реакция - гемолиз; отрицательная - задержка гемолиза.

Титр комплемента - наибольшее разведение комплемента, в котором наблюдается гемолиз.

Применение: для определения титра комплемента. Если речь идет о титровании комплемента перед постановкой РСК, то титр определяют для дальнейшего расчета рабочей дозы. Используется разведение на 25% концентрированное, чем титр.

### **4. РСК с целью раздельного определения IgM и IgG в сыворотке больного сыпным тифом.**

Тип реакции - реакция связывания комплемента.

Исследуемый материал - сыворотка крови больного (нативная и обработанная меркаптоэтанолом).

Диагностический препарат - известный антиген для РСК.

Дополнительные ингредиенты реакции: комплемент в рабочей дозе; гемолитическая сыворотка в рабочей дозе; эритроциты барана (3 % взвесь).

Положительная реакция - задержка гемолиза; отрицательная - гемолиз.

Принцип метода: при обработке сыворотки меркаптоэтанолом разрушаются IgM.

Следовательно, с обработанной сывороткой реакция идет только за счет IgG.

Постановка реакции: готовят разведения нативной и обработанной сывороток, добавляют диагностический препарат и дополнительные

ингредиенты реакции.

Трактовка результатов: если с обработанной сывороткой реакция идет практически таком же титре, как с необработанной, значит она содержит преимущественно IgG. Если в обработанной сыворотке титр антител резко снизился по сравнению с необработанной, значит она содержит преимущественно IgM.

#### **Контрольные вопросы.**

1. Назовите особенности противовирусного иммунитета.
2. Что такое антибактериальный иммунитет?
3. Как получают комплемент для диагностических целей?
4. Что такое противоопухолевый иммунитет?
5. Для чего проводится раздельное определение IgG и IgM?

#### **Список литературы:**

##### **Обязательная:**

1. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: Учебник. — М.: Медицина, 2000. — 432 с : ил. (Учеб. лит. для студ. медвузов).
2. Ковальчук Л.В. и др. Иммунология: практикум: учеб. пособие — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 176 с.
3. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / под ред. акад. РАМН В.И. Покровского - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2001. — 768 с.
4. Борисов Л.Б. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М. 1997 г.

##### **Дополнительная:**

1. Генкель П.А., Микробиология с основами вирусологии. М., 1974 г.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов. - 3-е издание, испр. и доп. — СПб, СпецЛит. 2002. — 591 с.
3. Борисов Л.Б., Смирнова А.М., Медицинская микробиология, вирусология, иммунология, М., Медицина. 1994 г.
4. Тимаков В.Д., Левашов В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. М. 1983 г.

**Тема № 6: Иммунитет: ГНТ И ГЗТ. АНТИТОКСИЧЕСКИЙ ИММУНИТЕТ.**

**Цель:** Познакомиться с особенностями ГНТ и ГЗТ, с механизмами антитоксического иммунитета. Научиться осуществлять постановку реакций преципитации и нейтрализации, интерпретировать их результаты

**Основные вопросы, разбираемые на занятии:**

1. Особенности реакций гиперчувствительности, их классификация и значение.
2. Реакции гиперчувствительности I типа, механизм их развития.
3. Реакции гиперчувствительности II типа, механизм их развития
4. Реакции гиперчувствительности III типа, механизм их развития
5. Реакции гиперчувствительности IV типа, механизм их развития
6. Антитоксический иммунитет и методы его изучения
7. Реакции преципитации.
8. Реакции нейтрализации токсина антитоксической сывороткой *in vivo* и *in vitro*
9. Кожные аллергические пробы.

**План**

**Программа**

1. Особенности аллергических реакций.
2. Классификация аллергических реакций.
3. Антитоксический иммунитет.
4. Реакции преципитации.
5. Особенности постановки и применение кожных аллергических проб

**Демонстрации.**

1. Таблицы и схемы с механизмами различных реакций гиперчувствительности.
2. Результат реакции Асколи
3. Результат реакции Оухтерлони
4. Результат реакции флоккуляции

**Задание студентам.**

1. Заполнить таблицу: **Механизм основных типов реакции гиперчувствительности**
2. Осуществить постановку реакции по Асколи. Учесть ее результаты.
3. Осуществить постановку реакции преципитации по Оухтерлони. Учесть ее результаты.
4. Учесть результат реакции флоккуляции

**Информационный материал.**

**Иммунитет антитоксический** – невосприимчивость организма к инфекционным болезням, возбудители которых продуцируют экзотоксины. Иммунитет антитоксический достигается активной иммунизацией, введением в организм анатоксина, вызывающего синтез антитоксинов, антитоксических сывороток или пассивной иммунизацией.

## **Антитоксический иммунитет**

Беринг еще только готовил свое открытие к научной публикации, а Эрлих — этот «неисчерпаемый творец руководящих идей» (так говорил о нем сам И. И. Мечников) — узрел в новом факте проблему большой биологической значимости. Впрыскивая животным растительные яды — рицин, касторовое масло, абрин, Эрлих убедился, что во всех этих случаях в крови образуются антитоксины.

Итак, из экспериментального наблюдения, сделанного в соседней комнате, Эрлих вывел учение об антитоксическом иммунитете. Он показал, что такой иммунитет может быть наследственным, так как мать передает его потомству через плаценту и с молоком. Развивая далее идею, Эрлих выдвигает объяснение, подсказанное его опытами с красителями тканей. Он утверждает, что процессы питания клеток и реакции иммунитета — эти два основополагающих процесса жизни происходят по единому механизму. Клеточное ядро, по Эрлиху, имеет многочисленные группы атомов, которые могут отщепляться от ядра и присутствовать в протоплазме клетки и даже на ее поверхности. Исследователь дает им название «боковых цепей», «рецепторов» (от *recipio* — воспринимать). Заметим, что термин «рецептор» является одним из наиболее распространенных в современной иммунологии. Соединение клетки с питательными веществами зависит от присутствия в ней специальных рецепторов, имеющих сродство с химической структурой питательных веществ. Другие рецепторы воспринимают токсины или иные антигены, и только вступив в прочный химический контакт с клеткой, они побуждают ее вырабатывать противоядие — антитоксины.

## **Антитоксины**

Антитоксины — антитела, возникающие в сыворотке крови при попадании в организм токсинов или анатоксинов. Способны взаимодействовать с токсинами, нейтрализуя их активность. Антитоксины могут синтезироваться в результате естественного контакта организма с токсинами, при искусственном введении их в организм животных в сублетальных дозах и при иммунизации анатоксинами человека или животных. Широкое применение в медицине имеют антитоксические сыворотки против токсинов, выделяемых патогенными микроорганизмами (палочками дифтерии, столбняка, газовой гангрены и ботулизма), используемые для профилактики и лечения этих болезней, а также сыворотки против ядов змей, насекомых. Антитоксины, применяемые в медицинской практике в виде антитоксических сывороток, получают путем гипериммунизации лошадей возрастающими дозами токсинов. Антитоксины против ботулизма и газовой гангрены поливалентны, то есть содержат антитела к нескольким токсинам. Сила антитоксинов измеряется количеством антитоксических единиц (АЕ) в 1 мл, способ определения которых зависит от вида антитоксина. Сыворотки, содержащие антитоксины, высушивают в вакууме и сохраняют при низкой температуре. Антитоксины (от греч. *anti* — против + токсины) — антитела, которые образуются в организме животных и человека в ответ на появление токсинов микробного,

растительного или животного происхождения, специфически обезвреживают соответствующие токсины и являются мощным фактором антитоксического иммунитета. Наибольшее значение имеют антитоксины, которые вырабатываются против экзотоксинов или растворимых токсинов микробов — возбудителей высокотоксигенных инфекций: дифтерии, столбняка, газовой гангрены, ботулизма, а также дизентерийных бактерий Григорьева—Шига, скарлатинозного стрептококка, стафилококка. Антитоксический иммунитет может быть воспроизведен искусственно активной иммунизацией анатоксинами или пассивной иммунизацией антитоксическими сыворотками. Содержание антитоксинов в антитоксических сыворотках выражается в антитоксических единицах (АЕ). О напряженности антитоксического иммунитета можно судить по содержанию антитоксинов в сыворотке крови. Наличие в 1 мл крови 1/30 АЕ дифтерийного антитоксина достаточно, чтобы обеспечить невосприимчивость ребенка к дифтерии; при этом реакция Шика у него будет отрицательной. Защита от столбняка, по данным Регамея (R. H. Regamey, 1965), обеспечивается присутствием в 1 мл крови 0,005 АЕ противостолбнячного антитоксина.

Антитоксины применяются в медицинской практике в виде антитоксических сывороток (противодифтерийная, противостолбнячная, противодизентерийная Григорьева—Шига, противогангренозные, противоботулинические, противоскарлатинозная, противостафилококковая), которые готовят путем гипериммунизации лошадей возрастающими дозами соответствующих токсинов или анатоксинов. В жидких сыворотках антитоксины довольно лабильны: они разрушаются при  $t^{\circ} 100^{\circ}$  и ослабляются при  $60—70^{\circ}$ ; инактивируются под влиянием прямого действия солнечных лучей. После лиофильного высушивания под вакуумом при низких температурах А. становятся более стабильными и хорошо сохраняются в течение многих лет. За 1 АЕ дифтерийного А., по предложению Эрлиха (P. Ehrlich), принимается такое количество противодифтерийной сыворотки, которое в смеси с Lt (Limes tod) дифтерийного токсина вызывает смерть морской свинки весом 250 г в течение 96 час.

Lt дифтерийного токсина устанавливается в опытах на морских свинках при помощи стандартной противодифтерийной антитоксической сыворотки. Интернациональные антитоксические единицы (АЕ) содержатся в определенных количествах (мг) эталонных сывороток, выпускаемых международной лабораторией биологических стандартов Института сывороток в Копенгагене. Производственные институты СССР снабжаются стандартными антитоксическими сыворотками из Института контроля медико-биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича.

Реакция флоккуляции нашла применение лишь для определения титра противодифтерийной сыворотки (по последним данным, образование флоккулята при взаимодействии антитоксической сыворотки с токсином следует отнести за счет присутствия в сыворотке побочных антител, поэтому результаты реакции флоккуляции могут не всегда совпадать с результатами определения титра А. *in vivo*).

Антитоксины обычно связаны с  $\gamma$ - и  $\beta_2$ -глобулинами противодифтерийной сыворотки. Нортроп (L. H. Northrop, 1941) изолировал дифтерийный антитоксин в виде кристаллического глобулина с мол. весом (мол. массой) 90 500, однако химическая структура А. до сих пор остается неустановленной. При переваривании пепсином молекула иммунного глобулина расщепляется на две половины, из которых одна — пассивный белок — лишена антитоксических свойств и легко коагулируется теплом, а другая — носитель антитоксина — гораздо более резистентна к пепсину и прогреванию. На этом принципе основан метод очистки антитоксинов «диаферм» (А. В. Бейлинсон), в результате которой их анафидактогенные свойства (см. Анафилаксия) ослабляются. При применении очищенных антитоксинов симптомы сывороточной болезни (см.) реже наблюдаются и она легче протекает. В соответствии с теорией Борде (J. Bordet), которая нашла подтверждение в опытах с чистыми токсинами и А., реакция токсин — антитоксин протекает по законам адсорбции. В организме больного А. нейтрализуют лишь свободный токсин, который еще не связан с чувствительными тканями. Поэтому эффективность серотерапии зависит от срока применения антитоксической сыворотки. При подозрении на заболевание дифтерией, столбняком, ботулизмом и другими токсигенными инфекциями антитоксическую сыворотку следует вводить возможно скорее, чтобы антитоксин нейтрализовал свободный токсин до фиксации его восприимчивыми тканями. Отсюда понятно, почему серопрофилактика столбняка, ботулизма и других токсигенных инфекций оказывается эффективнее серотерапии. Выраженными антитоксическими свойствами обладают иммунные сыворотки против змеиных ядов. А. сохраняют значение и в эпоху антибиотиков, так как последние, оказывая бактериостатическое действие на микробы, не обезвреживают их токсины. Поэтому при таких заболеваниях, как дифтерия, столбняк, ботулизм, при которых имеет место токсемия и патологический процесс почти всецело обусловлен повреждающим действием токсина на чувствительные ткани, серотерапия специфическими А. безусловно показана наряду с антибиотикотерапией и другими способами лечения.

### **Реакции преципитации ( РП ). Краус. Реакция кольцепреципитации. Реакция микропреципитации.**

**Реакции преципитации (РП)** предложены **Краусом** (1897) и основаны на феномене образования видимого осадка (преципитата) или общего помутнения среды после взаимодействия растворимых либо находящихся в коллоидном дисперсном состоянии  $Ag$  с  $AT$ .

*Реакцией преципитации (РП)* называется осаждение из раствора  $Ag$  (преципитиногена) при воздействии на него иммунной сыворотки (преципитина) и электролита. Посредством РП можно выявить антиген в разведениях 1:100 000 и даже 1:1 000 000, т. е. в таких малых количествах, которые не обнаруживаются химическим путем. РП ставят в специальных узких пробирках.

В качестве реагентов используют гипериммунные преципитирующие сыворотки с высокими титрами АТ к гомологичным Аг. При постановке РП разводят не сыворотку, а Аг. Реакционная среда должна содержать электролиты (физиологический раствор) и иметь нейтральный рН. РП позволяет быстро (в течение нескольких секунд) выявлять незначительные количества Аг. Они очень чувствительны, и их применяют для тонкого иммунохимического анализа, выявляющего отдельные компоненты в смеси Аг. Метод имеет несколько разновидностей .

Преципитиногены представляют собой ультрамикроскопические частицы белково–ПС прир: экстракты из мкО, органов и тк, пат материала; продукты распада бактериальной клетки, их лизаты, фильтраты. Преципитиногены обладают термоустойчивостью, поэтому для их получения материал подвергается кипячению. В РП используются жидкие прозрачные Аг.

Преципитирующие сыворотки обычно получают гипериммунизацией кроликов циклами в течение нескольких месяцев, вводя им бактериальные взвеси, фильтраты бульонных культур, аутолизаты, солевые экстракты микроорганизмов, сывороточные белки.

### **Реакция микропреципитации**

Для выявления низких титров АТ (например, при сенсibilизации к ЛС) применяют нефелометрическую реакцию микропреципитации (или реакция помутнения), предложенная Уанье (1955). При её постановке в исследуемую сыворотку крови вносят Аг в убывающей концентрации; при отсутствии АТ разведение сыворотки крови Аг уменьшает её оптическую плотность. Однако в присутствии минимальных количеств АТ образуются **микропреципитаты**, повышающие оптическую плотность среды.

### ***Гиперчувствительность.***

**Таблица 1.**Механизм основных типов реакций гиперчувствительности.

| <b>Тип</b>     | <b>Ведущее звено патогенеза</b> | <b>Основные клинические формы</b> |
|----------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <b>I тип</b>   |                                 |                                   |
| <b>II тип</b>  |                                 |                                   |
| <b>III тип</b> |                                 |                                   |
| <b>IV тип</b>  |                                 |                                   |

|  |  |  |
|--|--|--|
|  |  |  |
|--|--|--|

## **Методы выявления сенсibilизации**

### **Кожные аллергические пробы.**

#### **Применение аллергических проб для диагностики заболевания**

#### **Аллергические диагностические пробы - методы диагностики аллергии**

. Проводятся после того, как путем тщательного сбора анамнеза выявлен круг подозреваемых аллергенов. Пробы выполняют вне фазы обострения заболевания и не раньше чем через 2—3 недели после перенесенной острой аллергической реакции, т.к. чувствительность организма к аллергену в течение этого времени снижается.

Различают кожные и провокационные аллергические диагностические пробы. Кожные пробы основаны на выявлении специфической сенсibilизации организма путем введения аллергена через кожу. При этом оценивают величину и характер развивающейся воспалительной реакции. Различают качественные и количественные кожные пробы. С помощью качественных кожных проб определяют наличие или отсутствие сенсibilизации к данному аллергену. Эти пробы используют при диагностике аллергических, а также некоторых инфекционно-аллергических (туберкулеза, бруцеллеза и др.) и паразитарных (гельминтозов) болезней. Количественные кожные пробы позволяют получить представление о степени сенсibilизации организма. С их помощью определяют минимальную концентрацию специфического аллергена, при которой он вызывает в сенсibilизированном организме видимую аллергическую реакцию. Этот метод называется алергометрическим титрованием. С его помощью устанавливают дозу аллергена, с которой можно начинать специфическую гипосенсibilизацию (снижение уровня сенсibilизации) путем введения в организм аллергена.

В зависимости от методики проведения кожные пробы могут быть прямыми и косвенными. При прямых кожных пробах аллерген вводят внутрикожно или повреждая эпидермис путем укола, царапины. При капельных и аппликационных прямых кожных пробах аллерген (обычно лекарственный препарат или вещество) наносят на неповрежденную кожу в виде капли или аппликации. Ответная кожная реакция считается положительной при появлении гиперемии, инфильтрации или волдыря. Она может возникнуть в течение 20 мин (немедленная реакция), через 6—12 ч (реакция переходного типа), через 24—48 ч (замедленная реакция). Тип ответной кожной реакции зависит от характера иммунологического механизма аллергической реакции. Среди прямых кожных проб различных видов наиболее чувствительной является внутрикожная, затем следуют скарификационная, укол, аппликационная, капельная.

К косвенным кожным пробам относится реакция Прауснитца — Кюстнера, при которой сыворотку крови больного вводят внутрикожно здоровому человеку и после фиксации антител на коже реципиента (через 24 ч) в то же место вводят аллерген. По развитию местной кожной реакции судят о наличии антител-реагинов в исследуемой сыворотке. Данная реакция не

исключает возможности переноса с сывороткой крови возбудителя при наличии скрытой инфекции у донора, поэтому применение ее ограничено. Наиболее целесообразно выявлять антитела-реагины с помощью различных реакций иммунитета — иммуноферментного метода и др. Выбор вида кожной пробы зависит от заболевания, предполагаемой степени чувствительности, характера аллергена, а также от реактивности кожи. Прием некоторых лекарственных препаратов (антигистаминных, седативных средств) резко уменьшает реактивность кожи, поэтому перед аллергологическим обследованием необходимо в течение 5—7 дней воздержаться от приема этих лекарственных средств.

В диагностике аллергических болезней нельзя полностью полагаться на кожные пробы и переоценивать их результаты. Постановку кожных проб и оценку их результатов проводит только специально обученный медперсонал.

При несоответствии данных аллергологического анамнеза и результатов кожных проб в период ремиссии показаны провокационные пробы. Эти пробы основаны на воспроизведении аллергических реакций введением аллергена в орган или ткань, поражение которых является ведущим в картине заболевания. Различают конъюнктивальные, назальные и ингаляционные провокационные пробы. Конъюнктивальная провокационная проба проводится путем закапывания аллергена в нижний конъюнктивальный мешок. Реакция считается положительной при появлении гиперемии конъюнктивы, слезотечения и зуда век. Назальную провокационную пробу осуществляют при аллергических ринитах и поллинозах: в одну половину носа закапывают аллерген, а в другую — контрольную жидкость. Реакция считается положительной при возникновении на стороне закапывания аллергена затрудненного носового дыхания и зуда. Ингаляционный провокационный тест применяют с целью этиологической диагностики бронхиальной астмы: с помощью аэрозольного распылителя больной вдыхает через рот раствор аллергена. Реакция считается положительной в случае снижения более чем на 15% жизненной емкости легких.

К провокационным пробам относятся также холодовая и тепловая пробы, используемые при холодовой и тепловой крапивнице. При отсутствии четких признаков заболевания проводят экспозиционную провокационную пробу. Она основана на непосредственном контакте больного с подозреваемым аллергеном в той среде, в которой больной обычно находится. Противоположной этой пробе является элиминационная проба — исключение из пищевого рациона предполагаемого аллергена, перевод больного, страдающего бытовой аллергией, в так называемую безаллергенную палату и др. Лейкоцитопеническую и тромбоцитопеническую провокационные пробы применяют в диагностике пищевой аллергии и лекарственной аллергии. В основе этих проб лежит снижение числа лейкоцитов и тромбоцитов в крови после введения больному испытуемого аллергена.

### **Методические указания**

**1. Реакция кольцепреципитации по Асколи.** В узкую пробирку с небольшим количеством неразведенной преципитирующей сыворотки, держа

ее в наклонном положении, пипеткой медленно по стенке наслаивается такой же объем Аг. экстрагированные кипячением из различного сельскохозяйственного сырья. Чтобы не смешать две жидкости, пробирку осторожно ставят вертикально. При положительной реакции в пробирке на границе между сывороткой и исследуемым экстрактом через 5–10 мин появляется серовато-белое кольцо. Постановка реакции обязательно сопровождается контролями сыворотки и антигена.

Реакция Асколи применяется для идентификации сибиреязвенного, туляремиального, чумного Аг. Она нашла также применение в судебной медицине для определения видовой принадлежности белка, в частности кровяных пятен, в санитарной практике при выявлении фальсификации мясных, рыбных, мучных изделий, примесей в молоке. Недостатком этой РП является нестойкость преципитата (кольца), который исчезает даже при легком встряхивании. Кроме того, с ее помощью нельзя определить количественный состав Аг, участвующих в формировании преципитата.

Реакции нейтрализации токсина антитоксической сывороткой *in vitro*.

**2. Выявление токсигенности возбудителя дифтерии в реакции преципитации в геле по Оухтерлони.** Реакцию ставят на чашках Петри в лунках агарового геля. В качестве геля используют хорошо отмытый прозрачный агар. Аг и сыворотки вносятся в агаровый гель так, чтобы лунки, содержащие их, находились на определенном расстоянии. Диффундируя навстречу друг другу и соединяясь друг с другом, антитело и антиген образуют через 24–48 ч иммунный комплекс в виде белой полосы. При наличии сложного по составу преципитиногена возникает несколько полос. При этом полосы серологически родственных антигенов сливаются воедино, а полосы разнородных перекрещиваются, что позволяет определить детали антигенной структуры исследуемых веществ. Широко используется для диагностики заболеваний, вызываемых вирусами и бактериями, продуцирующими экзотоксины.

### **3. Реакция флоккуляции**

Тип реакции: частный случай реакции преципитации (нейтрализации).

Исследуемый материал: антитоксическая сыворотка.

Диагностический препарат: токсин или анатоксин в строго определенном количестве.

Принцип метода: к серийным разведениям антитоксической сыворотки добавляют одинаковое количество антигенных единиц токсина или анатоксина.

Положительный результат - образование хлопьев преципитата (флоккулята); отрицательный результат - прозрачная жидкость.

Применение: определение активности антитоксической сыворотки (количества МЕ - международных единиц в 1 мл сыворотки).

Трактовка результатов: первичная (инициальная) флоккуляция наступает в пробирке, где АГ (антиген) и АТ (антитело), находятся в эквивалентных количествах. Зная количества ингредиентов в пробирке, где произошла инициальная флоккуляция, можно рассчитать активности

антитоксической сыворотки. Например, инициальная флоккуляция наступила в пробирке, где находится 0,02 мл сыворотки и 4 АЕ (антигенных единиц) токсина или анатоксина. Составляем пропорцию: 0,02 мл сыворотки эквивалентно 4 АЕ токсина или анатоксина.

Одна АЕ - это такое количество токсина или анатоксина, которое связывается одной МЕ антитоксической сыворотки, следовательно, 0,02 мл данной сыворотки содержит 4 МЕ.

Титр антитоксической сыворотки - это количество МЕ в 1 мл этой сыворотки.

В данном случае, составив пропорцию, можно определить титр:

0,02 мл - 4 МЕ

1 мл - X МЕ

$X = (1 \times 4) : 0,02 = 200 \text{ МЕ}$

### **Контрольные вопросы**

1. Какие реакции называются аллергическими?
2. Что такое анафилаксия?
3. Назовите особенности реакций гиперчувствительности III типа.
4. Как осуществить постановку аллергической пробы?
5. Для чего применяется реакция Асколи?
6. Где нашли применение кожные аллергические пробы?

### **Список литературы:**

#### **Обязательная:**

1. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: Учебник. — М.: Медицина, 2000. — 432 с : ил. (Учеб. лит. для студ. медвузов).
2. Ковальчук Л.В и др. Иммунология: практикум: учеб. пособие – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 176 с.
3. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / под ред. акад. РАМН В.И. Покровского - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2001. – 768 с.
4. Борисов Л.Б. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М. 1997 г.

#### **Дополнительная:**

1. Генкель П.А., Микробиология с основами вирусологии. М., 1974 г.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов.- 3-е издание, испр. и доп. – СПб, СпецЛит. 2002. – 591 с.
3. Борисов Л.Б., Смирнова А.М., Медицинская микробиология, вирусология, иммунология, М., Медицина. 1994 г.
4. Тимаков В.Д., Левашов В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. М. 1983 г.

### **Тема № 7: ИММУНИТЕТ: ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНЫХ АНТИТЕЛ ИЛИ АНТИГЕНОВ.**

## **ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ.**

**Цель:** Изучить основные иммунобиологические препараты, их особенности, получение и применение в медицине. Получить представление о принципах приготовления диагностических препаратов, меченых флюорохромами, радиоактивными элементами, ферментами; чувствительности отдельных иммунных реакций и областях их применения..

### **Основные вопросы, разбираемые на занятии:**

1. Вакциопрофилактика и вакциноterapia.
2. Состав и классификация вакцин.
3. Живые вакцины, получение и применение.
4. Инактивированные вакцины, получение и применение.
5. Синтетические и полусинтетические вакцины, получение и применение.
6. Ассоциированные вакцины.
7. Календарь профилактических прививок.
8. Серопрофилактика и серотерапия.
9. Сывороточные иммунные препараты.
10. Получение и применение моноклональных антител.
11. Иммуномодуляторы.
12. Реакции с мечеными диагностическими компонентами (ИЛМ, РИФ, ИФА, РИА, иммуноблоттинг).

### **План**

#### **Программа**

1. Состав и классификация вакцин
2. Сывороточные иммунные препараты, состав и классификация.
3. Иммуномодуляторы
4. Реакции с мечеными диагностическими компонентами

#### **Демонстрации.**

1. Вакцинные иммунобиологические препараты, применяемые в РФ.
2. Сывороточные иммунобиологические препараты, применяемые в РФ
3. Схема получения моноклональных антител
4. Иммуноферментные тест-системы

#### **Задание студентам**

1. Заполнить таблицу: **Классификация вакцин**
2. Определить, к какой группе вакцин относится выданный иммунобиологический препарат, рассказать о способе его получения, дать характеристику иммунитета, индуцированного этим препаратом
3. Определить, к какой группе сывороточных препаратов относится выданный иммунобиологический препарат, рассказать о способе его получения, дать характеристику иммунитета, индуцированного этим препаратом.
4. Зарисовать схему получения моноклональных антител

#### **Информационный материал.**

**Иммуно-люминесцентный метод (ИЛМ, РИФ) Метод**

## **флуоресцирующих антител (МФА, иммунофлуоресценция)**

(англ. *Immunofluorescence*) — лабораторный иммунологический метод качественного определения антигена по известному глобулину или антител по известному антигену.

### **Сущность и классификация МФА**

Сущность метода флуоресцирующих антител заключается в визуализации реакции антиген-антитело люминесцентными маркерами. Метод конъюгации глобулинов с органическими флюорохромами разработан в 1942 году А. Кунсом.

Различают МФА *прямой*, разработанный А. Кунсом и Мелвином Капланом, МФА *непрямой*, разработанный А. Кунсом и Уиллером и *непрямой МФА с комплементом*.

При прямом методе (**пМФА**) на препарат с антигеном наносят известную, предположительно соответствующую ему, люминесцирующую сыворотку. В случае образования комплекса, он обнаруживается, люминесцентной микроскопией в виде зеленоватого свечения разной степени интенсивности и четкости.

При непрямом методе (**нМФА**) на мазок из наслоения антигена и немеченой сыворотки наносят антиглобулиновую (видовую по отношению к диагностической сыворотке) люминесцирующую сыворотку. В случае образования комплекса антиген-антитело, последний компонент реагирует с видовой антиглобулиновой люминесцирующей сывороткой. При нМФА с комплементом, его добавляют к комплексу антиген-антитело и идентифицируют образование тройного комплекса по люминесцирующей антикомплементарной сыворотке.

Результаты описываются в так называемых «крестах» (от одного + до четырех +++) — субъективная градация исследователем степени выраженности реакции. Непрямые методы требуют наличия только антиглобулиновых видовых сывороток с флюорохромами, но при этом необходимо большое количество тестовых контролей. При постановке прямым методом делается только один контроль, но требуется множество моноспецифических сывороток. Недостатками всех видов МФА является ограниченная чувствительность из-за наличия возможных перекрестных реакций между близкими по антигенному составу объектами и неспецифическая флуоресценция вследствие адсорбции флуоресцирующих глобулинов на различных элементах препарата. В настоящее время используются коммерческие стандартные конъюгаты, содержащие глобулины к исследуемым антигенам. Метод флуоресцирующих антител

**Иммуноферментный анализ** (сокращённо **ИФА**, (англ. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала.

## Сущность и классификация

Из-за разнообразия объектов исследования — от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, и многообразия условий проведения ИФА существует большое количество вариантов этого метода.

Возможна классификация по типу иммунохимического взаимодействия на первой стадии анализа (в которой происходит связывание определяемого вещества). Если в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), то метод является *неконкурентным*. Если же на первой стадии в системе одновременно присутствует анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за ограниченное количество центров специфического связывания, то метод является *конкурентным*.

Примером *неконкурентного* формата ИФА является «сэндвич»-метод. К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации на первой стадии на твердой фазе образуется комплекс антиген-антитело. Затем носитель отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют меченные ферментом специфические антитела. После вторичной инкубации и удаления избытка конъюгата антител с ферментом определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена. На стадии выявления специфического иммунокомплекса антиген оказывается как бы зажатым между молекулами иммобилизованных и меченных антител, что послужило поводом для широкого распространения названия «сэндвич»-метод. Ферментативная реакция (цветная реакция) проходит в присутствии перекиси водорода и субстрата, представленного неокрашенным соединением, которое в процессе пероксидазной реакции окисляется до окрашенного продукта реакции на заключительном этапе проведения исследования. Интенсивность окрашивания зависит от количества выявленных специфических антител. Результат оценивается спектрофотометрически или визуально.

«Сэндвич»-метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, две антигенные детерминанты. На этом формате основано большое количество тест-систем для иммуноферментной диагностики различных инфекций: ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, цитомегаловирусная, герпесная, токсоплазменная и другие инфекции.

Среди *конкурентных* схем твердофазного ИФА существует два основных формата:

1. *Прямой конкурентный* формат ИФА использует иммобилизованные на твердой фазе специфические антитела, а меченый ферментом и немеченый антиген конкурируют за связь с иммобилизованным антителом. К иммобилизованным антителам добавляют раствор, содержащий определяемое вещество и фиксированную концентрацию меченого антигена, инкубируют и после отмывки носителя от несвязавшихся компонентов

регистрируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов. Величина детектируемого сигнала находится в обратной зависимости от концентрации антигена.

Преимуществом прямой схемы является небольшое число стадий, что позволяет легко автоматизировать анализ. К недостаткам схемы относятся сложность методов синтеза ферментных конъюгатов, а также возможное влияние компонентов образца на активность фермента.

2. В *непрямом конкурентном* формате ИФА используются меченные ферментом антитела (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель.

Непрямая схема с использованием меченых антивидовых антител является одной из наиболее распространенных схем ИФА. На поверхности носителя иммобилизуют конъюгат антиген-белок, к которому добавляют раствор, содержащий определяемый антиген и фиксированную концентрацию немеченых специфических антител, инкубируют и после удаления несвязавшихся компонентов добавляют фиксированную концентрацию меченых антивидовых антител. После инкубации и отмывки носителя детектируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов, причем величина сигнала находится в обратно-пропорциональной зависимости от концентрации определяемого антигена.

Применение универсального реагента — меченых антивидовых антител — даёт возможность выявлять антитела к разным антигенам. Кроме того, анализируемый образец и меченый реагент вводятся в систему на разных стадиях, что устраняет влияние различных эффекторов, содержащихся в образце, на каталитические свойства ферментной метки. Однако такая схема анализа усложняет его проведение из-за введения дополнительных стадий.

Как любые иммунохимические методы анализа, ИФА может давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Например, ложноположительные результаты при определении антител к различным инфекциям могут возникнуть за счёт ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека; за счёт антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приёме лекарственных препаратов; у новорождённых такие ложноположительные реакции могут возникать за счёт образования в организме ребёнка М-антител к иммуноглобулину G матери. Помимо этого, причиной ложноположительных результатов может быть синдром поликлональной активации. При этом, особые вещества — суперантигены — неспецифически стимулируют выработку В-лимфоцитами антител к различным инфекциям. Практически это выражается в неспецифическом нарастании титра антител сразу ко многим возбудителям. Ложноотрицательные результаты при определении антител могут быть обусловлены состояниями иммунодефицита, а также техническими ошибками при постановке реакции.

Таким образом, за счёт несомненных преимуществ иммуноферментного анализа: удобства в работе, быстроты, объективности за счёт автоматизации

учёта результатов, возможности исследования иммуноглобулинов различных классов (что важно для ранней диагностики заболеваний и их прогноза) в настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.

### **Основные типы тест-систем в зависимости от используемых антигенов**

В зависимости от того, какие антигены используются, иммуноферментные тест-системы подразделяются на:

1. Лизатные — в которых используется смесь нативных антигенов (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре);
2. Рекомбинантные — в которых используются полученные генно-инженерным способом белки-аналоги определённых белковых антигенов возбудителя;
3. Пептидные — использующие химически синтезированные фрагменты белков.

Общее направление развития ИФА-диагностикумов — это направление от лизатных тест-систем, которые принято называть тест-системами первого поколения, к рекомбинантным и пептидным.

Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в достаточно чистом виде аналог практически любого отдельного антигена.

Для создания высококачественной рекомбинантной тест-системы необходимо из всего антигенного многообразия возбудителя выбрать антигены, которые были бы иммуногенными (то есть, в организме инфицированного человека должны вырабатываться антитела к этим антигенам) и высоко специфичными (то есть, характерными лишь для данного возбудителя и, по возможности, не дающими перекрёстных реакций с антителами к другим антигенам).

Кроме того, большое значение имеет качество очистки рекомбинантных белков. В идеальном случае возможно получение рекомбинантной тест-системы практически со 100%-ной специфичностью при высокой чувствительности.

На практике этого не всегда удаётся достичь, однако специфичность лучших рекомбинантных тест-систем приближается к 100 %.

### **Иммуноблоттинг (выявление антител в сыворотках больных к определенным антигенам возбудителя).**

Иммуноблоттинг (иммуноблот) - высокоспецифичный и высокочувствительный референтный метод, подтверждающий диагноз для пациентов с положительными или неопределёнными результатами анализов, полученных в т.ч. при помощи РИГА или ИФА. Иммуноблоттинг - разновидность гетерогенного иммунного анализа.

Этот метод выявления антител к отдельным антигенам возбудителя основан на постановке ИФА на нитроцеллюлозных мембранах, на которые в

виде отдельных полос нанесены специфические белки, разделенные гель-электрофорезом. Если имеются антитела против определенных антигенов - появляется темная линия в соответствующем локусе стрипа. Уникальность иммуноблота заключается в его высокой информативности и достоверности получаемых результатов.

Материалом для исследования является сыворотка или плазма крови человека. Для исследования на одном стрипе необходимо 1,5-2 мл крови или 15-25 мкл сыворотки.

ООО "Лабораторная диагностика" использует иммуноблоттинговые наборы для выявления антител к возбудителям различных заболеваний фирмы "EUROIMMUN" (Германия), "MIKROGEN" (Германия):

- **ВПГ 1 и ВПГ 2 IgM/IgG** (герпесвирусная инфекция)
- **ЦМВ IgM/IgG** (цитомегаловирусная инфекция)
- **Краснуха IgG**
- **TORCH-профиль IgM** (Токсоплазмоз, Краснуха, Цитомегаловирус, ВПГ 1 и ВПГ 2)
- **ВЭБ IgM/IgG** (вирусная инфекция Эпштейна-Барра)
- **ВГС IgG** (вирусный гепатит С)

Используют наборы двух типов - *вестерн-блот* и *лайн-блот*.

**Вестерн-блот:** Наборы содержат тестовые стрипы-мембраны с электрофоретически разделенными нативными антигенами соответствующих инфекционных агентов, т.о. антигены располагаются в порядке молекулярной массы. На мембраны могут быть также нанесены 1-2 дополнительные линии с клинически значимыми антигенами (вестерн-лайн блот). Это надежный подтверждающий метод, исключает ложноположительные ответы и перекрестные реакции.

**Лайн-блот:** В этом случае на тестовые стрип-мембраны нанесены только клинически значимые антигены (нативные, синтетические или рекомбинантные) в определенном порядке. Такой подход используется при дифференциальной диагностике нескольких инфекций на одном стрипе.

Сущность его заключается в переносе молекул исследуемого вещества с одного твердого носителя, используемого для фракционирования биополимеров, на другой, где с помощью иммунохимической реакции происходит их специфическое выявление. Современный высокочувствительный метод заключается в идентификации белков, в том числе вирусных антигенов. Метод основан на комбинации гель-электрофореза и реакции антиген-антитело. Высокая степень разрешения достигается за счет электрофоретического разделения белков, глико- и липопротеинов и максимальной специфичностью детектирующих иммунных сывороток или моноклональных антител. В оптимально отработанных условиях иммуноблоттингом можно обнаруживать антиген в количествах менее 1 нг в испытуемом объеме. Технически иммуноблоттинг выполняется в три приема:

1) подлежащие анализу белки подвергаются разделению в полиакриламидном геле в присутствии денатурирующих веществ: додецилсульфата натрия или мочевины, этот процесс часто обозначают как

SDS-PAGE; разделенные белки могут визуализироваться после окрашивания и сравниваться с эталонными образцами;

2) разделенные белки переносятся с геля путем наложения (блотинга) на нитроцеллюлозный фильтр и фиксируются на нем; во многих случаях, но не всегда, при переносе сохраняются количественные соотношения белков;

3) на фильтры наносятся детектирующие поли- или моноклональные антитела, содержащие радиоизотопную или ферментную метку; для обнаружения связавшихся антител применяют также антивидовую меченую сыворотку, иными словами, на заключительном этапе блоттинг аналогичен твердофазным иммунологическим тестам.

Следует иметь в виду, что в данной постановке иммуноблотинга белки находятся в денатурированном состоянии, и поэтому могут не распознаваться антителами, специфическими по отношению к нативному белку, но зато при наличии сывороток ко всем составляющим пептидам одновременно выявляется весь антигенный спектр испытуемого белка. Иммуноблоттинг достаточно широко используется в исследованиях строения вирусов гепатитов, в частности, для установления антигенного родства между отдельными штаммами. Высокая разрешающая способность иммуноблоттинга позволяет получать хорошие результаты и в диагностической практике, когда требуется идентифицировать вирус в тканях или экскретах больного.

В зависимости от исследуемого вещества различают ДНК,— РНК и белок — блоттинг.

Иммунохимическое выявление антигенов можно проводить с помощью антител, конъюгированных с меткой. В качестве метки в последнее время широко применяют либо радиоактивные изотопы, либо ферменты (пероксидазу, щелочную фосфатазу, лактамазу и др.).

Время блоттинга путем диффузии составляет 36—48 ч. Но наиболее быстрый и эффективный способ переноса белков с гелей — электроблот, время которого, в основном, составляет 1—3 ч, для некоторых высокомолекулярных белков — более 12 ч.

Конкретный выбор сорбентов для различных модификаций блотов (нитроцеллюлоза либо бумага, обработанная соответствующим образом), выбор условий блокирования и иммуно-химического выявления антигенов полностью зависит от антигена, его количества, метода иммуноанализа и целей исследования.

Возможность обнаружить антитела к конкретным антигенам возбудителя позволяет оценить значимость этих антител (специфичность для данного этиологического агента), исключить реакцию на перекрестные антигены. Это и отличает иммуноблоттинг от ИФА, где в качестве антигена могут быть использованы различные комбинации антигенных детерминант - как специфичные, так и нет, дающих перекрестные реакции с другими возбудителями. В другом случае, при получении положительного результата в ИФА можно только предполагать, что он является следствием перекрестного реагирования, а в случае иммуноблоттинга это доказательно

Метод ИБ по целому ряду обстоятельств получил наибольшее

распространение как метод, пригодный для использования в качестве теста подтверждения.

Безусловное достоинство метода — возможность тестирования антител к слабо или вовсе нерастворимым антигенам и исключение стадии введения радиоактивной метки в антигены.

О чувствительности в случае ИБ судят по предельному количеству нанесенного на гель антигена, которое при фракционировании белков удается выявить иммунохимически после переноса с геля на твердую фазу (нитроцеллюлозу). Общая чувствительность анализа зависит от целого ряда причин: условий фракционирования и иммобилизации антигена на твердом носителе, уровня фона, специфичности и аффинности антител. Важное значение имеет вид используемой метки и способ ее выявления.

Таким образом, метод иммуноблотинга позволяет идентифицировать зоны антигена на твердой фазе, не связывая весь белок с антителами специфической сыворотки. Иммуноблотинг и его модификации в основном используются для типирования бактериальных и вирусных антигенов и антител, особенно в случае недостаточной разрешающей способности обычных систем, а также при анализе иммуноглобулинов, нуклеиновых кислот или как тест подтверждения в сочетании с другими методами.

Большие трудности интерпретации результатов перекрестных при реакциях и в случаях начальных стадий сероконверсии. В первой ситуации при повторном исследовании через промежуток определенный времени антитела не выявляются, а во в втором иммуноблоте появляются новые полосы, свидетельствующие о антител появлении к протеинам или гликопротеидам ВИЧ, характеризуя ответной динамику иммунной реакции на антигены вируса.

Является фактически конечным верификационным методом в цепи серологических исследований, позволяющих сделать окончательное заключение о ВИЧ-позитивности пациента или же отвергнуть таковую. Для постановки ИБ используют нитроцеллюлозные полоски, на которые методом горизонтального и затем вертикального иммунофореза заранее перенесены белки ВИЧ в порядке нарастания их молекулярных масс. Антитела испытываемых сывороток взаимодействуют с белками определенных зонах полоски. Дальнейший ход реакции не отличается от такового для ИФА, то есть предусматривает обработку полоски (стрипа) конъюгатом и хромоген-субстратом с отмытием не связавшихся компонентов и прекращением реакции дистиллированной водой. Предварительное электрофоретическое разделение белков и их фиксация на нитроцеллюлозе позволяет идентифицировать антитела к конкретным белкам в соответствии с наличием (или отсутствием) окрашивания (серовато-голубого) соответствующих зон полоски. Иммуноблотинг не может использоваться для массового скрининг исследования вследствие высокой стоимости и является методом индивидуального арбитража на заключительном этапе серологического исследования.

Существует достаточно четкие корреляции между результатами исследования сывороток в ИБ и ИФА. Дважды положительные в ИФА (в

разных тест-системах) сыворотки интерпретируются затем в ИБ как ВИЧ-позитивные в 97-98% случаев. Сыворотки, положительные в ИФА лишь в одной из двух использованных тест-системах, оказываются ВИЧ-позитивными в ИБ не чаще, чем в 4% случаев. При проведении подтверждающих исследований около 5% ИБ могут давать так называемые "неопределенные" результаты, которым, как правило, соответствуют положительные ИФА, но не РИП. Примерно в 20% случаев "неопределенные" ИБ вызывают антитела к gag-белкам ВИЧ-1 (p55, p25, p18). [3] При получении сомнительных результатов иммуноблотинга необходимо исследование повторить через 3 месяца и при сохранении неопределённости результата - через 6 месяцев.

### ***Радио-иммунный метод (РИМ)(Радиоиммунологический анализ, РИА)***

Радиоиммунный анализ - метод количественного определения биологически активных веществ, (гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и др.) в биологических жидкостях, основанный на конкурентном связывании искомым стабильных и аналогичных им меченных радионуклидом веществ со специфическими связывающими системами. Последними чаще всего являются специфические антитела. В связи с тем, что меченый антиген добавляют в определенном количестве, можно определить часть вещества, которая связалась с антителами, и часть, оставшуюся несвязанной в результате конкуренции с выявляемым немеченым антигеном. Исследование выполняют *in vitro*. Для Р. а. выпускают стандартные наборы реагентов, каждый из которых предназначен для определения концентрации какого-либо одного вещества. Исследование проводят в несколько этапов: смешивают биологический материал с реагентами, инкубируют смесь в течение нескольких часов, разделяют свободное и связанное радиоактивное вещество, осуществляют радиометрию проб, рассчитывают результаты. Метод отличается высокой чувствительностью, его можно использовать в диагностике заболеваний сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем, для установления причин бесплодия, нарушения развития плода, в онкологии для определения маркеров опухолей и контроля за эффективностью лечения, для определения концентрации в крови иммуноглобулинов, ферментов и лекарственных веществ. В ряде случаев исследования выполняют на фоне нагрузочных функциональных проб (например, определение содержания инсулина в сыворотке крови на фоне пробы на толерантность к глюкозе) либо в динамике (например, определение в крови половых гормонов на протяжении менструального цикла).

С помощью коммерческого набора фирмы "ЭББОТТ" — Австрия II-I 125 удастся выявлять HBsAg в концентрациях до 0, 1 нг/мл. К преимуществам метода можно отнести возможность стандартизации и автоматизации метода с получением ответов в цифровом выражении. Недостатком метода являются ограничения, определяемые режимом работы с радиоактивным материалом, и относительно короткий срок годности диагностического набора, что связано с распадом радиоактивной метки.

Диагностические наборы для выявления различных антигенов вирусов гепатитов А, В и D и антител к ним выпускаются фирмой "Изотоп" (Ташкент) и

некоторыми зарубежными фирмами (например, фирмой “ЭББОТТ”). В качестве твердой фазы применяются полистироловые шарики (“ЭББОТТ”) или пробирки (“Изотоп”). Для метки антител или антигенов чаще всего используется изотоп I 125, который имеет период полураспада 60 дней и высокую удельную радиоактивность. Измерение радиоактивной метки, т. е. излучения, проводится на специальных счетчиках — радиоспектрометрах. Подсчет радиоактивных импульсов как в контрольных, так и исследуемых образцах проводится в единое фиксированное время, обычно в течение 1 минуты. При анализе результатов реакции необходимо учитывать наличие фона радиоактивности, который может влиять на конечный результат реакции. Причиной повышенного фона могут быть: загрязнение контейнера или гнезда для пробы; неправильная настройка прибора; наличие источника сильного излучения вблизи прибора.

Для подтверждения положительного результата, полученного при первичном скрининге образцов, рекомендуется повторное исследование РИА или в альтернативном тесте. При обнаружении HBsAg необходимо проводить конфирмационный тест.

**Таблица 1.Классификация вакцин**

|                        | <b>Живые</b> | <b>Убитые</b> | <b>Синтетические</b> | <b>Анатоксины</b> |
|------------------------|--------------|---------------|----------------------|-------------------|
| <b>Содержат</b>        |              |               |                      |                   |
| <b>Получены путем</b>  |              |               |                      |                   |
| <b>Применяются для</b> |              |               |                      |                   |
| <b>Примеры</b>         |              |               |                      |                   |

**Список литературы:**

**Обязательная:**

1. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: Учебник. — М.: Медицина, 2000. — 432 с : ил. (Учеб. лит. для студ. медвузов).
2. Ковальчук Л.В и др. Иммунология: практикум: учеб. пособие — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 176 с.
3. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / под ред. акад. РАМН В.И. Покровского - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2001. — 768 с.
4. Борисов Л.Б. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М. 1997 г.

**Дополнительная:**

1. Генкель П.А., Микробиология с основами вирусологии. М., 1974 г.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов.- 3-е издание, испр. и доп. — СПб, СпецЛит. 2002. — 591 с.
3. Борисов Л.Б., Смирнова А.М., Медицинская микробиология, вирусология, иммунология, М., Медицина. 1994 г.
4. Тимаков В.Д., Левашов В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. М. 1983 г.

**Тема №8: КОЛЛОКВИУМ «ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ»**

## ВОПРОСЫ К КОЛЛОКВИУМУ №1

1. Предмет и задачи иммунологии. История развития иммунологии.
2. Инструктивные и конструктивные теории иммунитета.
3. Оснащение и режим работы иммунологической лаборатории
4. Основные подходы к стандартизации лабораторного иммунологического обследования
5. Объекты исследования в иммунологии (инбредные животные, биологические материалы для исследований, особенности работы с иммунокомпетентными клетками).
6. Иммунологические методы, применяемые в экспериментальных и клинических исследованиях.
7. Понятие об инфекции. Условия возникновения инфекционного процесса. Инфекционная болезнь. Стадии развития. Типы инфекционных заболеваний и их отличительные черты.
8. Роль внешней среды в процессах инфекции и иммунитета. Роль состояния макроорганизма в возникновении инфекции и развитии иммунитета.
9. Патогенность и вирулентность бактерий, единицы измерения. Патогенные, условно-патогенные и непатогенные микроорганизмы.
10. Морфологические и биохимические аспекты вирулентности. Токсины бактерий, их природа и свойства. Анатоксины. Получение, титрование, применение.
11. Принципы специфической профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Вакцины, определение, классификация, применение. Вакцинопрофилактика и вакцинотерапия.
12. Неспецифические факторы защиты организма. Фагоцитоз. Показатели фагоцитоза.
13. Комплемент, его структура, функции, пути активации, роль в иммунитете.
14. Интерфероны, их характеристика. Способы получения и применение.
15. Антигены. Определение. Понятие о полноценных и неполноценных антигенах. Требования, предъявляемые к антигенам. Понятие об антигенных свойствах микроорганизмов. Антигенная структура бактерий.
16. Серотипирование. Получение, титрование и применение агглютинирующих сывороток. Получение и применение монорецепторных сывороток.
17. Филогенез и онтогенез иммунной системы. Особенности иммунологической реактивности детского возраста.
18. Понятие об иммунитете. Общебиологическое значение иммунитета. Виды иммунитета.
19. Иммуноглобулины, структура и функция. Механизм взаимодействия антитела и антигена.
20. Специфичность антител. Их классификация по методу специфичности. Полные и неполные антитела.
21. Моноклональные антитела. Получение, применение

22. Структура и функция иммунной системы.

23. Кооперация иммунокомпетентных клеток в иммунном ответе. Иммунный ответ, его типы. Иммунокомпетентные клетки (Т - и В - лимфоциты, макрофаги), их кооперация в иммунном ответе.

24. Антителогенез. Первичный и вторичный иммунный ответ. Клонально-селекционная теория Бернета.

25. Иммунологическая память.

26. Иммунологическая толерантность.

27. Серодиагностика инфекционных заболеваний. Принципы и критерии.

28. Реакция агглютинации. Компоненты, механизм, способы постановки. Применение.

29. Реакция преципитации. Механизм, компоненты. Способы постановки. Применение.

30. Нагрузочные серологические реакции. Реакция непрямой гемагглютинации. Компоненты. Применение.

31. РСК. Реакции иммунного лизиса (гемолиз, бактериолиз).

32. РИФ. Реакция иммунофлюоресценции. Механизм, компоненты, применение.

33. ИФА. Иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, механизм, компоненты, применение.

34. Реакция нейтрализации токсина антитоксином. Механизм. Способы постановки, применение.

35. Антитоксический иммунитет, активный и пассивный. Антимикробные и антитоксические сыворотки. Получение, титрование, применение.

36. Понятие об аллергии. Типы аллергических реакций, Аллергены.

37. Гиперчувствительность немедленного типа. Механизм реакции. Атопия. Анафилаксия.

38. Гиперчувствительность замедленного типа. Механизм реакции. Кожные аллергические пробы.

39. Трансплантационный иммунитет. Антигены гистосовместимости и их значение. Методы подавления трансплантационного иммунитета.

40. Серопрофилактика, серотерапия. Осложнения, их предупреждения. Анафилактический шок. Сывороточная болезнь.

41. Т-зависимая гиперчувствительность замедленного типа. Значение в патогенезе и диагностике инфекционных заболеваний. Аллергические пробы, их сущность, применение.

42. Особенности противоопухолевого иммунитета.

43. Особенности противовирусного иммунитета.

44. Особенности антибактериального иммунитета.

45. Особенности противоглистного иммунитета.

46. Особенности антипротозойного иммунитета.

47. Вирусная гемагглютинация и её торможение. Практическое применение. Методические подходы к серодиагностике вирусных инфекций.

48. Особенности биологического метода диагностики инфекционных заболеваний

49. Серологические методы лабораторной диагностики инфекционных болезней, достоинства и недостатки

50. Вакциопрофилактика и вакциноterapia. Состав и классификация вакцин.

51. Живые вакцины, получение и применение.

52. Инактивированные вакцины, получение и применение.

53. Синтетические и полусинтетические вакцины, получение и применение.

54. Ассоциированные вакцины.

55. Календарь профилактических прививок.

56. Сывороточные иммунные препараты.

57. Иммуномодуляторы.