

ОДЕССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии



МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ДЛЯ ПОДГОТОВКИ
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И
ИММУНОЛОГИИ

Модуль 1

Общая микробиология. Инфекция. Иммунитет

Одесса – 2012

УДК 579.61 (076)+578.7(076)+612.017.1(076)

Методические указания для подготовки к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии. Часть 1. / Под ред. проф. П.З. Протченко. - Одесса, 2010. - 211 с.

В 1-й части учебного пособия изложен основной материал для подготовки к практическим и аттестационным занятиям по курсу общей микробиологии и иммунологии для студентов 2-го курса медицинского, стоматологического и фармацевтического факультетов медицинских вузов.

Материал излагается в соответствии с контрольными вопросами к каждому занятию в объеме, достаточном для изучения предмета в соответствии с учебными планами и действующей программой по дисциплине.

Для студентов медицинских вузов III - IV уровня аккредитации.

Коллектив авторов:

профессора П.З. Протченко, А.В. Целух, доценты А.Л. Головатюк, А.А. Грузевский, И.Г. Кольцова, Э.Э. Штефан, ст. преп. Н.А. Свеженцева, ассистенты О.Й. Авратинский, А.П. Боровик, М.П. Владимирова, Л.А. Зубко, Т.Ю. Степанова, В.Б. Стороженко.

Рецензент: К.Л. Сервецкий, д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней с курсом эпидемиологии Одесского государственного медицинского университета.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Подготовка студентов медицинских вузов к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии встречает известные трудности, связанные с недостаточной обеспеченностью учебниками и учебными пособиями, интенсивным развитием микробиологической науки и сложностью использования стабильных учебников, которые быстро устаревают.

Студентам 2-го курса, на котором начинается изучение микробиологии, вирусологии и иммунологии, как правило, трудно самостоятельно ориентироваться в значительном по объему материале имеющихся учебников и сосредоточить внимание на наиболее важных вопросах изучаемых тем.

Помочь студентам в самостоятельной работе над учебным материалом по курсу общей микробиологии и иммунологии призваны настоящие методические указания для подготовки к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Методические указания подготовлены коллективом сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Одесского национального медицинского университета в соответствии с действующей программой и учебными планами по дисциплине с учетом кредитно-модульной системы организации учебного процесса.

Преподавателями с большим стажем работы в медицинском вузе отобран наиболее важный материал для последовательного усвоения не только микробиологии, вирусологии и иммунологии на соответствующей кафедре, но и последующего изучения медицинских дисциплин.

Материал излагается в максимально сжатом виде, преимущественно в виде конкретных ответов на вопросы ориентировочной карты к каждому занятию. Несмотря на это, объем представленного учебного материала вполне достаточен для успешного усвоения знаний по модулю 1.

Настоящее учебное пособие предполагает обязательное использование подготовленного кафедрой «Альбома для протоколов лабораторной работы с методическими указаниями и тестами к практическим занятиям. Модуль 1. «Общая микробиология. Инфекция. Иммунитет»», в котором имеются ориентировочные карты к каждому практическому занятию с перечнем основных учебных вопросов, задания для практической работы на занятии, указания к оформлению протоколов практической работы, необходимые схемы постановки реакций и другие материалы для подготовки.

Учебное пособие может быть наиболее эффективно использовано при параллельном изучении учебников и дополнительной литературы, в том числе и электронной базы библиотеки ОНМедУ, однако его объема достаточно для полноценного усвоения основного учебного материала.

Оно будет безусловно полезно для подготовки к отработкам пропущенных практических занятий и успешной сдаче итогового модульного контроля.

Рекомендуется всем студентам медицинских вузов. Особенно полезным настоящее методическое пособие будет студентам Международного факультета

Авторы с благодарностью примут критические замечания и пожелания по совершенствованию учебного пособия.

Коллектив авторов

Занятие № 1. ОБОРУДОВАНИЕ И ОСНАЩЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВА- НИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. ТЕХНИКА МИКРО- СКОПИИ

Цель занятия :

Ознакомиться с организационной структурой изучения курса микробиологии, вирусологии и иммунологии, оборудованием и правилами работы в микробиологической лаборатории, техникой микроскопии с иммерсионной системой, видами микроскопов, техникой приготовления мазка из культуры бактерий на плотной питательной среде и окраской простыми красителями для создания основ изучения предмета и формирования навыков, необходимых для изучения медицинских дисциплин и последующей практической работы.

Студент должен знать:

- содержание и значение курса медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии в системе обучения врача;
- организацию микробиологической лаборатории;
- виды микроскопии;
- устройство биологического микроскопа.

Студент должен уметь:

- соблюдать правила санитарно-гигиенического и противоэпидемического режима и техники безопасности в микробиологической лаборатории;
- стерилизовать петлю прокаливанием;
- готовить мазок из культуры на плотной питательной среде;
- окрашивать простыми методами,
- обеззараживать отработанный инфицированный материал,
- проводить антисептическую обработку рук;
- микроскопировать препараты-мазки в световом микроскопе с иммерсионным объективом.

Навыки, которыми должен овладеть студент:

- начать формирование навыков по разделу "уметь".

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

Ориентировочная карта для изучения материалов по теме, задание для практической работы, содержание протокола и некоторые материалы для подготовки здесь и далее - смотри в учебном пособии «Альбом для протоколов лабораторной работы с методическими указаниями и тестами к практическим занятиям. Модуль 1 «Общая микробиология. Инфекция. Иммунитет».

1. ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ, ЕЕ РОЛЬ В ПОДГОТОВКЕ ВРАЧА

Предметом изучения медицинской микробиологии являются микроорганизмы, способные вызвать заболевание у человека, а также условно-патогенные, вызывающие заболевание при снижении защитных сил организма. Медицинская микробиология изучает микроорганизмы, которые составляют нормальную микрофлору организма и играют важную роль в жизнедеятельности макроорганизма. Медицинская микробиология изучает биологические свойства микроорганизмов, их систематику, экологию, патогенез (механизм развития) заболеваний, вызываемых микробами, разрабатывает методы микробиологической диагностики, специфической профилактики, этиотропной терапии, т.е. направленной на причину заболевания, микроорганизм-возбудитель.

Медицинская микробиология подразделяется на ряд самостоятельных дисциплин: бактериологию, вирусологию, микологию и протозоологию.

Знания полученные на нашей кафедре необходимы для дальнейшего изучения медицины и практической деятельности по любой врачебной специальности.

ОРГАНИЗАЦИОННАЯ СТРУКТУРА ИЗУЧЕНИЯ КУРСА:

Курс микробиологии, вирусологии и иммунологии изучается на медицинском, медико-профилактическом и фармацевтическом факультетах на 4 и 5, стоматологическом факультете – на 3-м и 4-м семестрах. Предусмотрены лекции и практические занятия. В конце изучения каждого модуля проводится письменный тестовый итог-

вый контроль. Расписание, учебные планы и текущая информация вывешены на стендах.

Структура методических указаний для студентов: тема занятия, цель занятия, форма протокола (см. "Альбом для протоколов практической работы с методическими указаниями и тестами к лабораторным и аттестационным занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии").

Основные этапы практического занятия: подготовительный этап (проверка студентов и их готовности к занятиям, тема и ее мотивационная характеристика, цель занятия, опрос студентов и решение тестовых заданий в соответствии с контрольными вопросами); основной этап (ознакомить студентов с перечнем заданий для самостоятельной работы и методикой их выполнения, самостоятельная работа студентов, оформление протокола); заключительный этап (проверка уровня знаний студентов по теме занятия и его оценка, проверка практических навыков студентов и их оценка, проверка и подписывание протоколов, оценка в баллах качества подготовки и работы студентов на практическом занятии, тема предстоящего занятия).

2. ОРГАНИЗАЦИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.

В микробиологических лабораториях выполняются бактериологические, вирусологические и серологические анализы материалов, полученные от больных и контактировавших с ними лиц, обследуются бактерионосители, проводятся санитарно-микробиологические исследования воды, почвы, воздуха, пищевых продуктов и т.д.

Диагностика особо опасных инфекций (чума, сибирская язва и др.) проводится в специальных режимных лабораториях. В вирусологических лабораториях проводится диагностика заболеваний, вызванных вирусами (грипп, полиомиелит), хламидиями, риккетсиями (сыпной тиф и др.). В каждой лаборатории предусмотрены: а) боксы для работы с группами бактерий или вирусами; б) помещения для серологических исследований, приготовления питательных сред, стерилизации, мойки посуды; в) виварий; г) регистратура для приема и выдачи анализов.

Предметы и оборудование рабочего места учебного зала кафедры (лоток, горелка, штатив, сосуд с водой для промывания мазков, пробирки, бактериологическая петля, дезинфицирующий раствор и др.).

Инструктаж по технике безопасности:

1. В учебной лаборатории необходимо быть в белом халате и шапочке;
2. Перед началом занятия выделяются два дежурных, которые приносят из лаборатории учебного процесса кафедры оснащение занятия (таблицы, культуры и т. д.);
3. В учебной лаборатории нельзя принимать пищу, во время выполнения самостоятельной работы на столе не должно быть посторонних предметов;
4. После выполнения работы каждый студент убирает свое рабочее место, а уносит все в лабораторию учебного процесса кафедры;
5. После выполнения работы нужно вымыть руки мылом и обработать дезинфицирующим раствором для рук;
6. В учебном зале кафедры в течении занятия и после его окончания должны поддерживаться порядок и чистота;
7. При случайном попадании инфицированного материала на стол, пол и другие поверхности это место необходимо тщательно обработать дезинфицирующим раствором.

Правила работы в учебной микробиологической лаборатории, обязанности дежурных на занятии представлены в «Альбоме ...».

3. СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ. УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА

Микроскопические методы исследования применяются для обнаружения бактерий или грибов непосредственно в исследуемом материале. Они позволяют получить предварительные данные о микрофлоре и наметить пути дальнейших исследований.

Современные методы микроскопического исследования: обычные методы оптической микроскопии в проходящем свете (световая микроскопия), специальные (в темном поле зрения, фазово-контрастный, люминесцентный, электронный).

Световой микроскоп (МБР-1, МБИ-1, "Биолам" и др.) предназначен для изучения формы, структуры, размеров и других признаков микроорганизмов, величина которых не менее 0,2 - 0,3 мкм. При изучении микроорганизмов используют главным образом иммерсионный микроскоп (минимальное расстояние между двумя точками, на котором они в данной оптической системе воспринимаются раздельно) - 0,2 мкм. Общее увеличение микроскопа определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра.

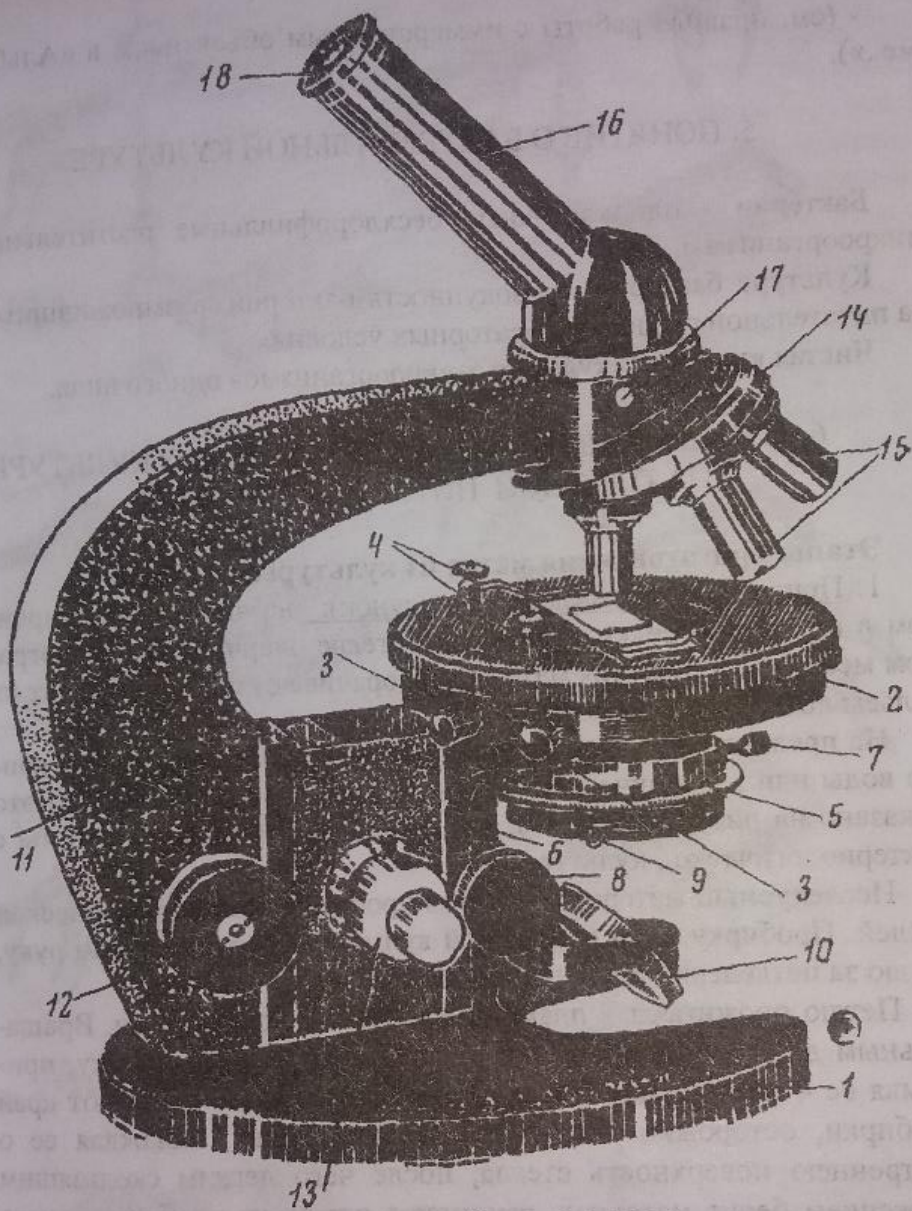


Рис. 1. УСТРОЙСТВО МБР-1

1 — подковообразное основание микроскопа; 2 — предметный столик; 3 — винты для перемещения предметного столика; 4 — клеммы, прижимающие препарат; 5 — конденсор; 6 — кронштейн конденсора; 7 — винт, укрепляющий конденсор в гильзе; 8 — рукоятка перемещения конденсора; 9 — рукоятка ирисовой диафрагмы конденсора; 10 — зеркало; 11 — тубус-держатель; 12 — рукоятка макрометрического винта; 13 — рукоятка микрометрического винта; 14 — револьвер; 15 — объективы; 16 — наклонный тубус; 17 — винт для крепления тубуса; 18 — окуляр

4. ТЕХНИКА РАБОТЫ С ИММЕРСИОННЫМ ОБЪЕКТИВОМ

- (см. правила работы с иммерсионным объективом в «Альбоме..»).

5. ПОНЯТИЕ О БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

Бактерии - одноклеточные бесхлорофилльные растительные микроорганизмы.

Культура бактерий - совокупность бактерий, размножившихся на питательной среде в лабораторных условиях.

Чистая культура - культура микроорганизмов одного вида.

6. ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ МАЗКА ИЗ КУЛЬТУРЫ НА ПЛОТНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

Этапы приготовления мазка из культуры бактерий:

1. Приготовление мазка (см. рисунок): на чистом обезжиренном в пламени горелки предметном стекле очерчивают стеклографом место расположения мазка, переворачивают стекло и кладут на рельсы лотка.

На предметное стекло бактериологической петлей наносят каплю воды или изотонического раствора хлорида натрия так, как это показано на рисунке №№ 1-8, т.е. соблюдая все правила работы с бактериологической культурой.

Исследуемый материал берут из пробирки бактериологической петлей. Пробирку с бактериальной культурой берут в левую руку, петлю за петледержатель - в правую.

Петлю прожигают в пламени горелки до покраснения. Вращательным движением вынимают из пробирки ватную пробку, прижимая ее 4 и 5 пальцами правой руки к ладони, и обжигают край пробирки, осторожно вводят петлю в пробирку, охлаждая ее о внутреннюю поверхность стекла, после чего легким скользящим движением берут материал, вынимают петлю из пробирки, снова обжигают ее край и закрывают пробкой.

Вносят исследуемый материал в каплю воды и распределяют его таким образом, чтобы получить тонкий и равномерный мазок. После приготовления препарата петлю прожигают (стерилизуют) в пламени.

2. Высушивание мазка: высушивают мазок в струе теплого воздуха над пламенем горелки, не давая капле закипать.

3. Фиксация мазка: предметное стекло (мазком вверх) медленно проводят 3 раза через пламя горелки. Микроорганизмы при фиксации погибают, плотно прикрепляясь к поверхности стекла.

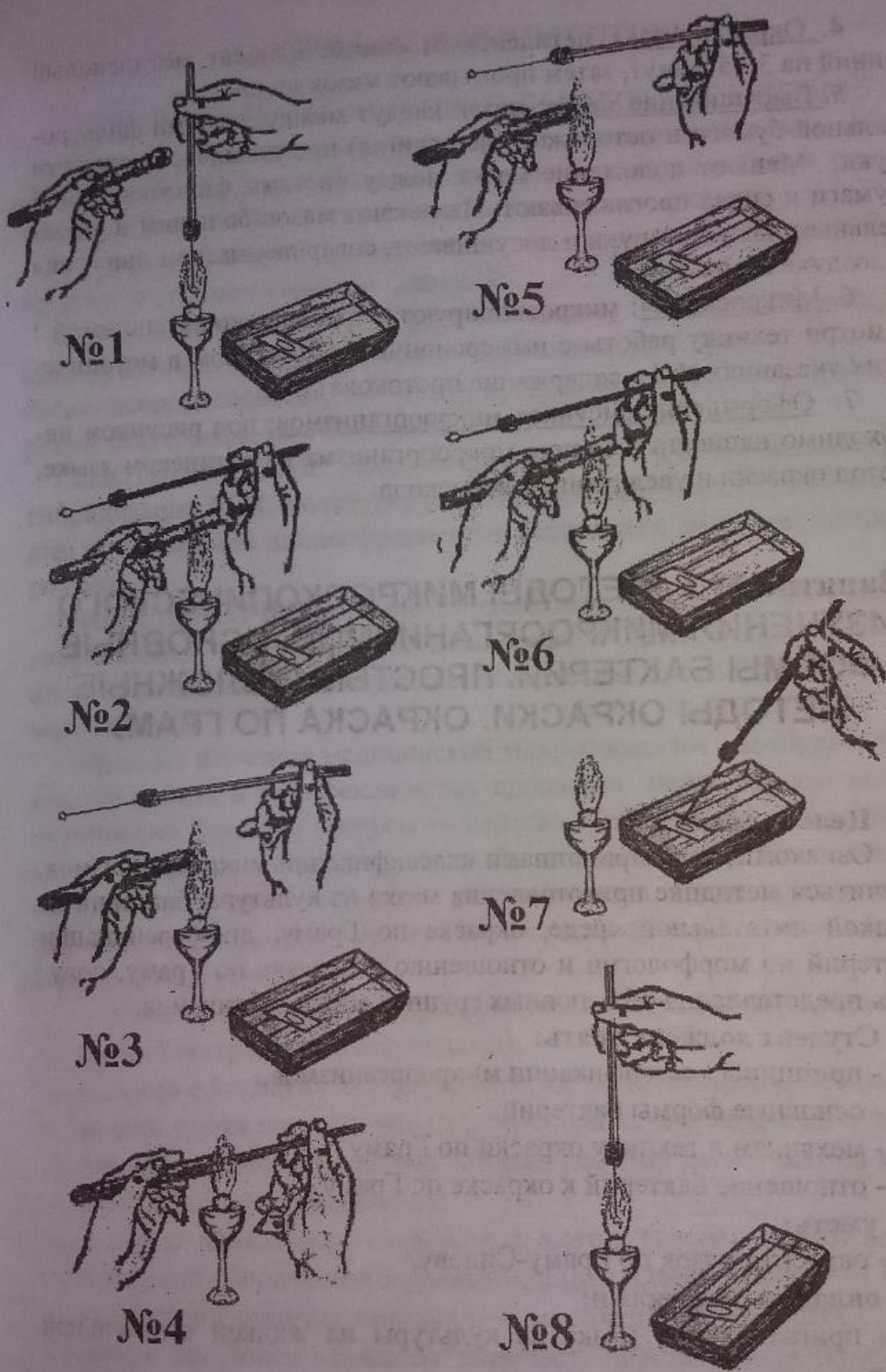


Рис. 2. ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ МАЗКА

4. Окраска мазка метиленовым синим: наносят метиленовый синий на 3 - 5 минут, затем промывают мазок водой.

5. Высушивание мазка: мазок кладут между листами фильтровальной бумаги и осторожно (не сдвигая) проглаживают пальцами руки. Меняют положение мазка между листами фильтровальной бумаги и снова проглаживают. Извлекают мазок большим и указательным пальцами руки и досушивают, совершая мазком движения в воздухе вверх-вниз.

6. Микроскопия: микроскопируют с иммерсионной системой! (смотри технику работы с иммерсионным объективом в методических указаниях № 1 - содержание протокола).

7. Оформление рисунков микроорганизмов: под рисунком необходимо написать название микроорганизма на латинском языке, метод окраски и увеличение микроскопа.

Занятие № 2. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. ОСНОВНЫЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ. ОКРАСКА ПО ГРАМУ

Цель занятия:

Ознакомиться с принципами классификации микроорганизмов, научиться методике приготовления мазка из культуры бактерий на жидкой питательной среде, окраске по Граму, дифференциации бактерий по морфологии и отношению к окраске по Граму, получить представления об основных группах микроорганизмов.

Студент должен: знать:

- принципы классификации микроорганизмов,
- основные формы бактерий,
- механизм и технику окраски по Граму,
- отношение бактерий к окраске по Граму.

уметь:

- окрасить мазок по Граму-Синеву,

овладеть навыками:

- приготовления мазка из культуры на жидкой питательной среде,
- дифференциации микроорганизмов по морфологическим и тинкториальным свойствам;
- навыками к занятию № 1.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Предмет изучения микробиологии, мир микроорганизмов, является настолько разнообразным, что самым главным общим признаком можно считать лишь их микроскопические размеры.

Для идентификации (установления видовой принадлежности) изучают различные свойства бактерий.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ: морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические, серологические (антигенные), биологические свойства, чувствительность к лекарственным препаратам, бактериофагам и бактериоцинам.

ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ: соотношение G+C (гуанин+цитозин), гибридизация ДНК, молекулярное зондирование, плазмидный анализ, полиморфизм длины фрагментов рестрикции ДНК, риботипирование.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ: анализ рибосомальной РНК, РНК-РНК-гибридизация, амплификация полиморфной ДНК с использованием производных праймеров, секвенирование 16S и 23S рибосомальной РНК.

Предмет изучения медицинской микробиологии - возбудители инфекционных и неинфекционных процессов представлены доклеточными формами (вирусы — царство *Vira*) и клеточными формами (бактерии, архебактерии, грибы и простейшие). По новому высшему уровню в иерархии классификации среди клеточных форм жизни различают 3 домена (или «империи»): «*Bacteria*», «*Archaea*» и «*Eukarya*»:

- домен «*Bacteria*» — прокариоты, представленные настоящими бактериями (зубактериями);

- домен «*Archaea*» — прокариоты, представленные архебактериями, среди которых нет болезнетворных для человека и животных микроорганизмов и которые поэтому не изучаются медицинской микробиологией;

- домен «*Eukarya*» — эукариоты, клетки которых имеют ядро с ядерной оболочкой и ядрышком, а цитоплазма состоит из высокоорганизованных органелл — митохондрий, аппарата Гольджи и др. Домен «*Eukarya*» включает: царство *Fungi* (грибы); царство животных *Animalia* (включает простейшие — подцарство *Protozoa*); царство растений *Plantae*.

Домены включают царства, типы, классы, порядки, семейства, роды, виды.

Патогенные (болезнетворные) микроорганизмы относятся к царству *Procaruotae* (бактерии) и *Eucaryotae* (простейшие и грибы) и *Vira* (вирусы).

Все прокариоты, имеющие единый тип организации клеток, объединены в отдел *Bacteria*. Представители бактерий отличаются между собой структурными и физиологическими особенностями, что позволило выделить 16 групп бактерий, среди которых собственно бактерии, актиномицеты, спирохеты, риккетсии, хламидии, микоплазмы.

Современная классификация микроорганизмов основывается на общепризнанном определителе американского микробиолога Д.Берги (*Bergey's manual of systematic Bacteriology*), первое издание которого было опубликовано в 1923 г., а последнее - в 2001 г.

Для предоставления названия микроорганизмам используется биномиальная номенклатура К.Линнея. Первое слово названия, которое указывает на род, пишется с большой буквы. Второе слово обозначает вид и пишется с малой буквы. Например, *Staphylococcus aureus*. При повторном упоминании родовое название сокращается до начальной буквы - *S. aureus*.

Название рода, как правило, связано с морфологическим признаком (например, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Clostridium*) или происходит фамилии ученого, который открыл или изучил данный микроорганизм (*Neisseria*, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*). Видовое название часто связано с названием болезни (*Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium tuberculosis*).

Необходимо отметить, что классификация микроорганизмов еще не до конца отработана, происходят постоянные изменения в систематике, к тому же и до сих пор продолжают научные дискуссии об основополагающих принципах классификации микроорганизмов.

В медицинской микробиологии мы должны пользоваться прежде всего инструктивными материалами, поэтому не всегда новые изменения в классификации могут сразу же вводиться в практику.

Прокариоты - это клеточные организмы, у которых нет оформленного ядра, их ядерный аппарат организован значительно проще, чем в эукариот, он является гаплоидным, может считаться предшественником ядра и имеет название «нуклеоид».

Прокариоты лишены аппарата митоза, в их цитоплазме нет внутренних мембранных структур типа митохондрий, лизосом, эндоплазматической сети, но в их клеточной стенке есть пептидогликан, отсутствующий в эукариот, есть рибосомы 70 S. К патогенным прокариотам принадлежат бактерии.

Эукариоты имеют дифференцированное ядро с ядерной мембраной, ядрышком и аппаратом митоза, имеют, как правило, дип-

лоидный геном, рибосомы 80 S, развитые внутренние мембранные структуры в виде эндоплазматической сети, митохондрий, лизосом и другие характерные признаки, которые представлены в таблице К эукариотам принадлежат все животные и растительные организмы на Земле. Патогенные эукариотические микроорганизмы есть среди самых простых (что обстоятельно изучалось в курсе медицинской биологии), и грибов, характеристику которым мы будем давать в курсе специальной медицинской микробиологии.

Вирусы значительно отличаются от клеточных организмов, мы будем изучать их в курсе вирусологии.

2. ПОНЯТИЕ О ВИДЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Вид - эволюционно сложившаяся совокупность особей, имеющих единый генотип, который в стандартных условиях проявляется сходными морфологическими, физиологическими, биохимическими и другими признаками. Микроорганизмы объединяются в один вид по близким свойствам, но отличаются от других представителей рода.

Генотип вида обеспечивает лишь относительную стабильность признаков, поэтому внутри вида различают еще и варианты микроорганизмов: морфологические (**морфовары**), биологические (**биовары**), биохимические (**хемовары** или **ферментовары**), антигенные (**серовары**) и другие. Например, варианты, резистентные к антибиотикам, теперь называют **резистенсвары**.

Виды, родственные генетически, объединяются в **род (Genus)**, роды - в **семейства (Familia)**.

Вид - основная таксономическая единица в микробиологии

Штамм - культура микроорганизмов, выделенная из определенного источника (организма человека, животного, окружающей среды).

Клон - культура микроорганизмов, полученная в результате вегетативного размножения одной особи.

3. ОСНОВНЫЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ

Шаровидные бактерии - кокки (coccus, лат. - зерно) имеют форму сферы диаметром около 1 мкм. Форма кокков может быть правильная сферическая, эллипсоидная, ланцетовидная (один конец более острый, другой - тупой), бобовидная (один край более округлый, другой - спрямлен). Кокки различаются по расположению в мазке. Выделяют микрококки (беспорядочное расположение поодиночке), диплококки (попарное расположение), стрептококки

форма бактерий	грамотрицательные	грамположительные
шаровидные (кокки)	 <p>нейссерии бейлонеллы</p>  <p>хламидии микоплазмы</p>	 <p>микро-кокки диплококки стрепто-кокки</p>  <p>тетра-кокки сарцины стафилококки</p>
палочковидные	 <p>энтеробактерии иерсинии</p>  <p>риккетсии фузобактерии</p>	 <p>бациллы клостридии листерии</p>  <p>корине-бактерии мико-бактерии актино-мицеты</p>
спиралевидные	 <p>вибрионы кампилобактерии</p>  <p>спирохеты спириллы</p>	

Рис 3. ОСНОВНЫЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ

(цепочечное расположение), тетракокки (по четыре), сарцины (в виде пакетов из 8-16 и более кокков), стафилококки (скоплениями в виде виноградных гроздей).

Патогенные представители есть среди микрококков, диплококков, стрептококков и стафилококков.

Палочковидные (цилиндрические) формы делятся на бактерии, бациллы и клостридии.

К бактериям относятся палочковидные микроорганизмы, кото- рые не образуют спор.

К бациллам (лат. bacillus - палочка) и клостридиям (лат. closter - веретено) принадлежат микробы, образующие споры.

По форме палочковидные бактерии бывают короткими, длинными, с закругленными или заостренными концами. По взаимному расположению палочковидные формы распределяются на:

- 1) диплобактерии и диплобациллы (располагаются парно по длине);
- 2) стрептобактерии и стрептобациллы (располагаются цепочкой);
- 3) бактерии и бациллы (располагаются без определенной системы).

Извитые формы бактерий - вибрионы, спириллы и спирохеты.

Вибрионы (лат. vibrio - изгибаюсь) - клетки, изгиб которых равен 1/4 завитка спирали, имеющие вид запятой. Типичными представителями этого рода являются возбудителями холеры и водные вибрионы.

Спириллы (лат. spira - изгиб) - извитые формы бактерий, имеющие изгибы с одним или несколькими оборотами спирали.

Спирохеты (лат. spirochaeta - бактерия в виде изогнутого длинного винта) имеют штопорообразную извитую форму.

4. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ

Для изучения морфологии бактерий из них готовят нативные (прижизненные) и фиксированные мазки, которые окрашивают анилиновыми красителями. В основе окраски лежат сложные химические и физико-химические реакции.

Простой метод окраски: фиксированный препарат окрашивают одним красителем (фуксин, метиленовая синь и др.).

Сложные методы окраски: на фиксированный препарат последовательно наносят несколько красителей, спирты и др. Это позволяет выявить определенные структуры клеток и провести межвидовую дифференциацию (окраска по Граму, Цилю - Нильсену и др.). Отношение микроорганизмов к красителям оценивают как тинкториальные свойства.

5. ОКРАСКА ПО ГРАМУ

Метод Грама - дифференциальная окраска бактерий, предложен датским врачом в 1884 году.

Принцип метода состоит в том, что при слабощелочной реакции бактерии окрашиваются основными красителями (генцианвиолет, метилвиолет и др.).

Обработка йодом приводит к прочной фиксации красителя в определенных видах бактерий. Последующее промывание окра-

шенного препарата спиртом не обесцвечивает их (грамположительные бактерии, Гр(+)). У других бактерий под влиянием йода не образуется прочного комплекса и обработка спиртом приводит их к обесцвечиванию (грамотрицательные бактерии, Гр -). Грамотрицательные бактерии выявляются путем докрасивания контрастной краской.

ТЕХНИКА ОКРАСКИ ПО МЕТОДУ ГРАМА

1. На фиксированный мазок нанести карболово - спиртовый раствор генцианового фиолетового через полоску фильтровальной бумаги. Через 1 - 2 минуты ее снять, а краситель слить.
2. Нанести раствор Люголя (йод + калий йод + дистиллированная вода) на 1 - 2 минуты и не промывая его водой сливают раствор.

3. Обесцветить 95% этиловым спиртом в течении 30 - 60 секунд до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя.

4. Промыть водой.

5. Докрасить водным раствором фуксина в течение 1 - 2 мин., промыть водой, высушить фильтровальной бумагой и микроскопировать с иммерсионной системой.

Грамположительные бактерии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные - в красный.

Окраска по Граму - Синеву является модификацией метода Грама. Техника окраски по Граму - Синеву (см. содержание протокола).

МЕХАНИЗМ ОКРАСКИ ПО ГРАМУ

Механизм окраски по Граму окончательно не выяснен. Считают, что в основе механизма окраски по Граму лежат особенности химического состава и строение клеточной стенки.

Клеточная стена грампозитивных бактерий характеризуется высоким содержанием пептидогликана (мурейна), который образует толстый многослойный мешок, наличием частых поперечных пептидных связей между нитями гликана, присутствием в мурейновом слое тейхоевых кислот, малым содержанием липидов. В результате обработки спиртом происходит разбухание мурейнового слоя и уменьшение диаметра пор клеточной стенки, которая приводит к снижению ее проницаемости. Поэтому комплексное соединение генцианвиолета с веществом цитоплазмы и йодом у грампозитивных бактерий хоть и растворяется в спирте, но не может выйти через клеточную стенку, и клетка сохраняет первичную окраску.

Клеточная стена грамотрицательных бактерий имеет тонкий крупноячеистый слой мурейна с редкими поперечными связями и содержит много липидов, которые растворяются и вымываются

при обработке спиртом. Поэтому проницаемость клеточной стены, и так более высокая, чем у грампозитивных бактерий, увеличивается еще больше, и краситель легко вымывается спиртом, наступает обесцвечивание грамотрицательных бактерий.

Доказательством того, что в окраске по Граму основную роль играет клеточная стенка, является тот факт, что при нарушении целостности клеточной стены после обработки лизоцимом, под действием пенициллина или в результате дегенерации бактерий при старении культуры грамположительных бактерии окрашиваются грамотрицательно.

6. ОТНОШЕНИЕ БАКТЕРИЙ К ОКРАСКЕ ПО ГРАМУ

Грамположительность и грамотрицательность - генотипический, видовой признак бактерий. Окраска по Граму позволяет определить вид возбудителей инфекционных заболеваний, имеет важное дифференциально-диагностическое значение. Отношение бактерий к окраске по Граму (таблица) - см. содержание протокола.

Некоторые виды бактерий могут окрашиваться по Граму вариабельно в зависимости от возраста, особенностей культивирования и других факторов, действующих на структуру клеточной стенки.

7. ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ МАЗКА ИЗ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ, ВЫРАЩЕННОЙ В ЖИДКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

На чистом обезжиренном в пламени горелки предметном стекле, стеклографом очерчивают место расположения мазка, переворачивают стекло и кладут на рельсы лотка. Пробирку с культурой берут большим и указательным пальцами левой руки. Бактериальную петлю стерилизуют в пламени горелки. Ватную пробку зажимают мизинцем правой руки, извлекают ее из пробирки и оставляют в таком положении. Край пробирки обжигают в пламени горелки, а затем в пробирку через пламя вводят петлю. Остудив петлю о внутреннюю стенку пробирки, берут каплю культуры. Затем петлю извлекают, быстро обжигают край пробирки, закрывают ее пробкой, проведенной через пламя, и ставят пробирку в штатив. Каплю культуры равномерно распределяют петлей на предметном стекле. Мазок высушивают, окрашивают по Граму - Синеву, микроскопируют с иммерсионным объективом. фиксируют (см. указания к занятию № 1),

* * *

Занятие № 3. СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Цель занятия:

Ознакомиться с методами изучения строения бактериальной клетки, подвижности, кислотоустойчивости для приобретения навыков дифференциации микроорганизмов по морфологическим и тинкториальным свойствам.

Студент должен:

Знать:

- ультраструктуру бактериальной клетки,
- биологическую роль, методы выявления и значение включений, кислотоустойчивости, спор, капсул, жгутиков для дифференциации бактерий по морфологическим и тинкториальным свойствам.

Уметь:

- окрашивать мазки по Граму и Цилю - Нильсену.

Овладеть навыками:

- приготовления мазков из культур микроорганизмов на плотной и жидкой питательных средах, из мокроты;
- окраски мазков по Леффлеру,
- определения под микроскопом включений, кислотоустойчивости, спор, капсул, подвижности для дифференциации микроорганизмов по морфологическим и тинкториальным свойствам.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. УЛЬТРАСТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ПРОКАРИОТ

Бактериальная клетка состоит из нуклеоида, цитоплазмы и оболочки. Нуклеоид содержит двунитевую молекулу ДНК, небольшое количество РНК и белков, это геном клетки. Нуклеоид осуществляет хранение и передачу наследственной информации, регулирует процессы жизнедеятельности, метаболизм, участвует в делении клетки.

Цитоплазма у прокариот представляет собой сложную коллоидную систему, состоящую из воды, минеральных соединений, белков и нуклеопротеидов. В цитоплазме находятся органеллы - рибосомы, мезосомы, включения.

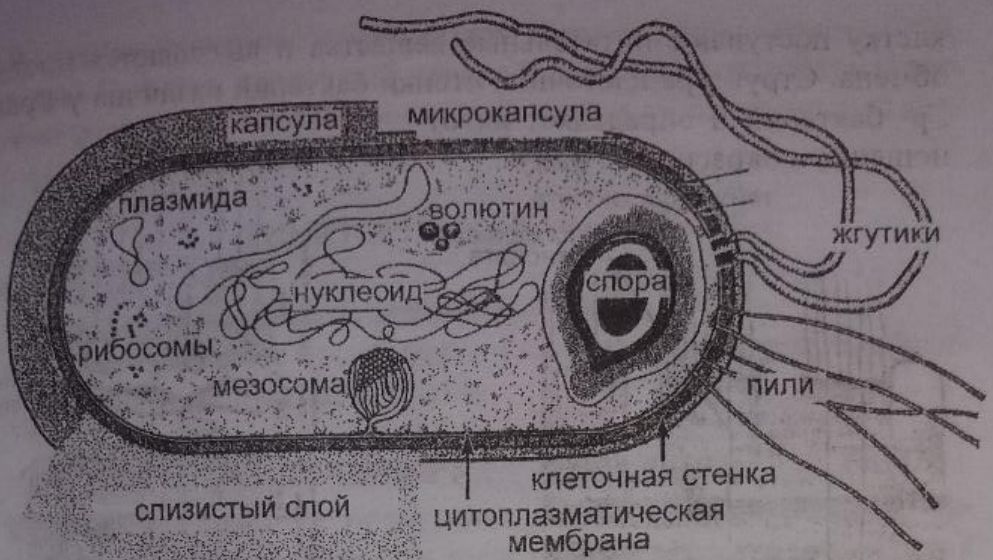


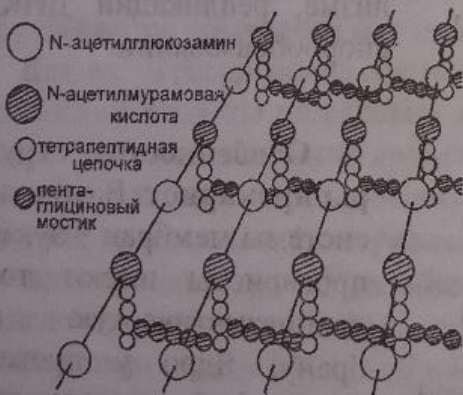
Рис. 4. СХЕМАТИЧЕСКОЕ ИЗОБРАЖЕНИЕ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ ПО ДАННЫМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Рибосомы у бактерий представляют собой рибонуклеопротеиновые частицы размером 20 нм, это белоксинтезирующие системы клеток.

Мезосомы - производные цитоплазматической мембраны, связаны с нуклеоидом, участвуют в делении клеток и спорообразовании.

Оболочка бактериальной клетки состоит из капсулы, клеточной стенки и цитоплазматической мембраны.

Клеточная стенка имеет сложный химический состав. Основу клеточной стенки всех бактерий составляет пептидогликан. Между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной расположено периплазматическое пространство, заполненное ферментами (фосфатаза, пенициллиназа и др.)



Функции клеточной стенки:

- придает клетке определенную форму,
 - защищает ее от воздействий окружающей среды,
 - несет на своей поверхности рецепторы, к которым прикрепляются фаги и другие химические соединения, а также рецепторы для адгезии, прикрепления к клеткам хозяина.
- Через клеточную стенку в

Рис. 5 СХЕМА ОБЩЕЙ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДОГЛИКАНА (МУРЕИНА)

клетку поступают питательные вещества и выделяются продукты обмена. Структура клеточной стенки бактерий различна у Грам+ и -Р- бактерий и определяет их отношение к окраске по Граму.

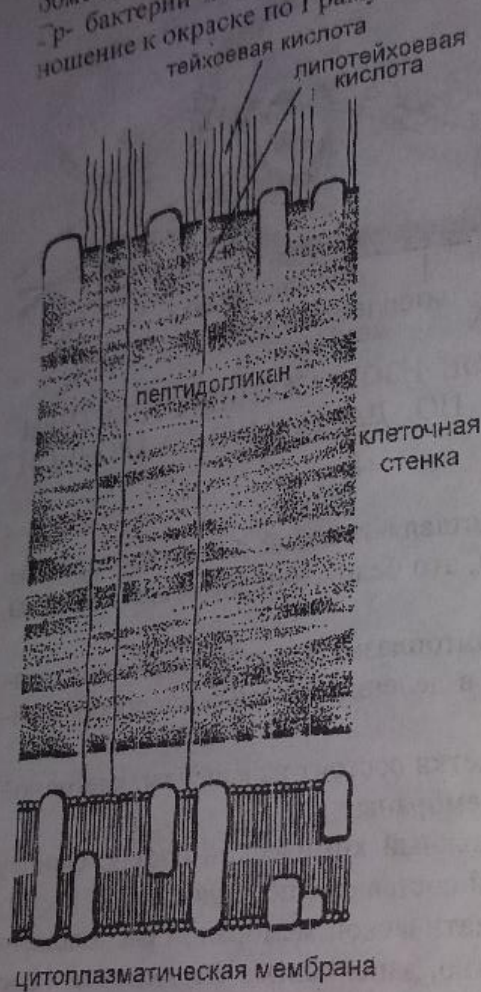


Рис. 6. МОДЕЛЬ СТРУКТУРЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ГР+ БАКТЕРИЙ

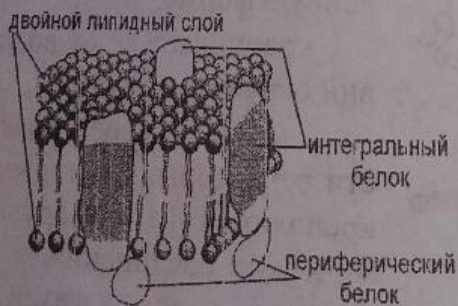


Рис. 8. МОДЕЛЬ СТРУКТУРЫ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

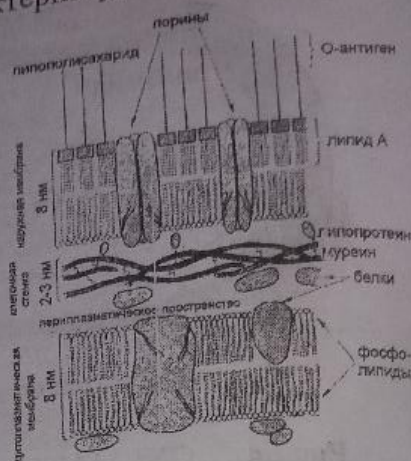


Рис. 7. МОДЕЛЬ СТРУКТУРЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ГР- БАКТЕРИЙ

Цитоплазматическая мембрана - липопротеин, содержит также углеводы и РНК. Состоит из трех слоев - двойной фосфолипидный слой пронизан белковыми глобулинами.

Функции цитоплазматической мембраны:

- регуляция поступления в клетку метаболитов,
- участие в метаболизме, репликации ДНК, в спорообразовании.

Особенности структуры прокариот. В отличие от системы мембран у эукариот прокариоты имеют только цитоплазматическую мембрану. Ядро у прокариот имеет фибрильную структуру и не имеет ядерной мембраны.

В клетке прокариот отсутствуют митохондрии, хлоропласты, комплекс Гольджи, клеточный центр. У прокариот отсутствует митоз, они размножаются бинарным делением и существуют в гаплоидном состоянии.

2. ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

- Отношение микроорганизмов к окраске.

Основные отличия прокариот - отсутствие внешних мембранных структур и гаплоидность генома.

3. ВКЛЮЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Включения являются продуктами метаболизма бактерий, используются в качестве запасных питательных веществ (включения гликогена, крахмала и др.) Включения волютина у дифтерийной палочки имеют дифференциально-диагностическое значение.

ОКРАСКА ВОЛЮТИНОВЫХ ЗЕРЕН ПО ЛЕФФЛЕРУ

На фиксированный мазок наливают щелочной метиленовый синий на 3 - 5 мин., промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют. Цитоплазма дифтерийных коринебактерий окрашивается в голубой цвет, гранулы волютина - в темно-синий.

3. КИСЛОТОУСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ.

- Способность сохранять жизнеспособность при действии разбавленных кислот.

Кислотоустойчивость микроорганизмов обусловлена наличием в их клеточной стенке и цитоплазме повышенного количества липидов, воска и оксикислот (миколовой кислоты). Такие микроорганизмы (микобактерий туберкулеза и лепры, актиномицеты) плохо окрашиваются обычными методами.

Для их окраски используется метод Циля - Нильсена. Раствор карболовой кислоты разрыхляет клеточную стенку бактерий, и повышает ее тинкториальные свойства. Высокая концентрация красителя и нагревание в процессе окраски усиливают реакцию взаимодействия красителя с бактериальными клетками, которые окрашиваются в красный цвет. При обработке препарата серной кислотой некислотоустойчивые бактерии обесцвечиваются и окрашиваются метиленовым синим в голубой цвет, а кислотоустойчивые бактерии остаются окрашенными фуксином в красный цвет.

ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ МАЗКА ИЗ МОКРОТЫ

Небольшое количество мокроты переносят стерильной петлей на середину предметного стекла и покрывают вторым так, чтобы осталась свободной треть первого и второго стекол. Стекла раздвигают в стороны и получают два больших мазка одинаковой толщины.

ОКРАСКА МИКРООРГАНИЗМОВ ПО МЕТОДУ ЦИЛЯ - НИЛЬСЕНА

1. Фиксированный мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги и наливают карболовый фуксин Циля (можно использовать фильтровальную бумагу, предварительно пропитанную красителем и высушенную). Мазок подогревают над пламенем горелки до появления паров, затем отводят в сторону для охлаждения и добавляют новую порцию красителя. Подогревание повторяют 2 - 3 раза. После охлаждения снимают фильтровальную бумагу и промывают препарат.

2. Препарат обесцвечивают путем нанесения на него 5% раствора серной кислоты на 1 - 2 мин. и промывают несколько раз водой.

3. Окрашивают препарат водно-спиртовым раствором метиленового синего 3 - 5 мин., промывают водой, высушивают, микроскопируют.

4. СПОРЫ КАК СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ВИДА БАКТЕРИЙ

5.

Споры - форма сохранения жизнеспособности бактериальной клетки в неблагоприятных условиях внешней среды.

Стадии спорообразования:

- формирование спорогенной зоны внутри бактериальной клетки,
- образование проспоры,
- формирование оболочки споры,
- образование споры.



РИС. 9. СХЕМА РАЗРЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ СПОРЫ

Споры термостойчивы, длительное время сохраняются во внешней среде. Это связано с низким содержанием воды, повышенной концентрацией кальция, структурой и химическим составом оболочки споры. Патогенные спорообразующие микроорганизмы - роды - *Bacillus*,

Clostridium. Загрязнение спорами этих бактерий поврежденных участков кожи может привести к возникновению раневой инфекции и столбняка. В благоприятных условиях спора прорастает в вегетативную клетку в течение 4 - 5 часов. Образуются споры в течение 18 - 20 часов.

Споры можно обнаружить в нативном препарате с помощью фазово-контрастной микроскопии (блестящие зерна), в фиксированном препарате (простой метод окраски, окраска по Граму: споры видны как неокрашенные тельца на окрашенном фоне тела бактериальной клетки).

Окраска спор по методу Ожешко состоит из двух этапов: протравливание нефиксированного препарата 0,5% раствором хлороводородной кислоты при подогревании; окраска по Цилю - Нильсену. Споры бактерий окрашиваются в красный цвет, вегетативные формы - в синий.

6. КАПСУЛЫ БАКТЕРИЙ

Капсулы бактерий (макрокапсулы) представляют собой выраженный слизистый слой, снаружи покрывающий клеточную стенку. Он состоит из полисахаридов, иногда из полипептидов. Патогенные бактерии (пневмококк) образуют капсулы в организме человека и животных для защиты от фагоцитоза и действия антител. Капсульные бактерии (палочка озены, риносклеромы пневмонии и др.) образуют капсулу и в организме и на питательных средах.

Функции капсулы:

- предохраняет клетку от неблагоприятных условий среды обитания,

- с капсулами связаны патогенные и антигенные свойства бактерий.

Для обнаружения капсул можно использовать простые (метиленовым синим, фуксином) и сложные (по Граму, по Гинс - Бурри) методы окраски препаратов.

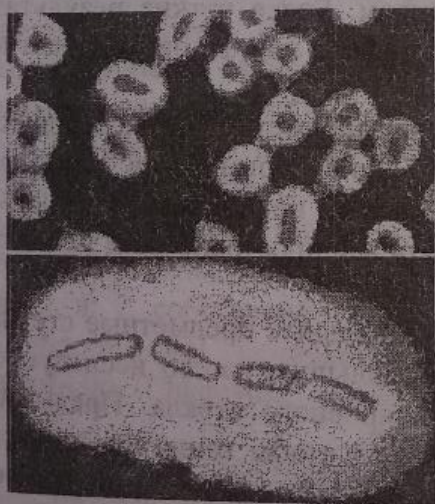


Рис. 10. КАПСУЛЫ БАКТЕРИЙ. Окраска по Гинс-Бурри

7. ПОДВИЖНОСТЬ БАКТЕРИЙ

Бактерии передвигаются с помощью жгутиков. В их состав входит белок флагеллин. Жгутики прикрепляются к базальному телу,

вмонтированному в цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку. Монотрихи - на одном из полюсов клетки находится один жгутик, лофотрихи - пучок жгутиков, у амфитрихов - жгутики располагаются на обоих полюсах клетки, у перитрихов - по всей их поверхности.

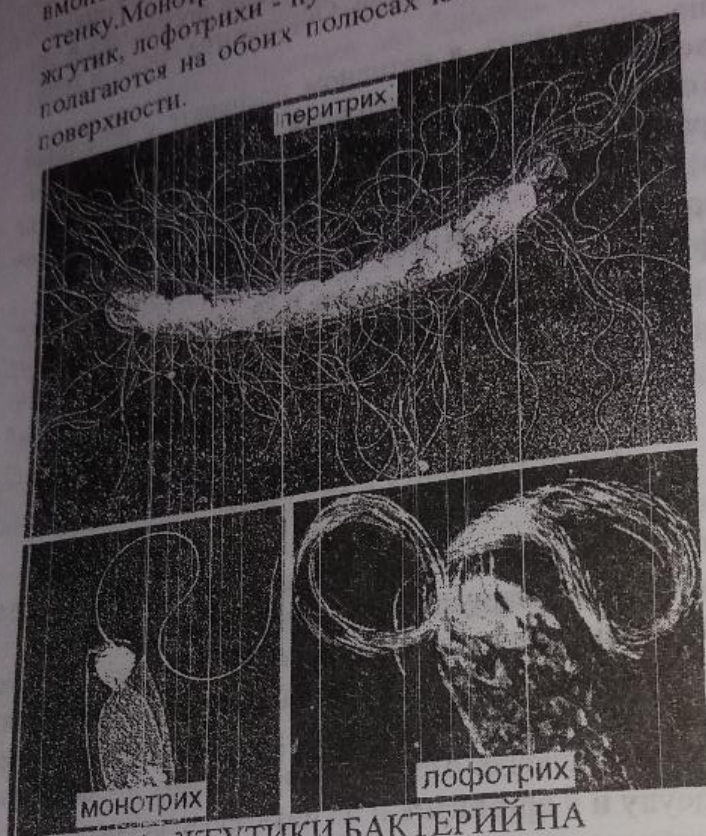


Рис. 11. ЖГУТИКИ БАКТЕРИЙ НА ЭЛЕКТРОНОГРАММАХ

Для обнаружения жгутиков используют сложные методы окраски (методы Леффлера, Грея и др.). Эти методы основаны на искусственном увеличении толщины жгутиков за счет нанесения протравы, а затем их окрашивания.

Подвижность микроорганизмов в живом состоянии изучают в препаратах,

приготовленных методом раздавленной или висячей капли. Микрографируют иммерсионным объективом. Более четкие результаты получают при микроскопии в темном поле или фазовоконтрастной микроскопии.

Раздавленная капля. На середину предметного стекла наносят каплю суточной бульонной культуры микроорганизмов. Каплю накрывают покровным стеклом так, чтобы не появились пузырьки воздуха. Жидкость должна заполнять все пространство и не выступать за края стекла.

Висячая капля. Используют специальные предметные стекла с углублением (лункой) в центре. Небольшую каплю исследуемого материала наносят на середину покровного стекла. Предметное стекло накладывают на покровное так, чтобы капля находилась в центре лунки. Затем его осторожно переворачивают и капля свисает в центре герметически закрытой полости лунки.

Занятие № 4. МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРА АКТИНОМИЦЕТОВ, ГРИБОВ И ПРОСТЕЙШИХ

Цель занятия :

Отработать методику приготовления мазков из культур микроорганизмов, выросших на жидкой или плотной питательной средах, окраски мазков простыми и сложными методами, получить представление о морфологии патогенных микроорганизмов.

Студент должен

Знать: - основные формы бактерий

- технику приготовления мазков

- простые и сложные методы окраски

- отношение бактерий к окраске по Граму

Уметь: - окрасить мазок фуксином, метиленовой синью;

- окрасить мазок по Граму.

Овладеть навыками:

- приготовления мазка из культур микроорганизмов, выросших на плотной и жидкой питательных средах

- дифференциации микроорганизмов по морфологическим и тинкториальным свойствам.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

Практическое занятие проводится для отработки практических навыков по занятиям №№ 1, 2, поэтому материалы для подготовки смотри в методических указаниях к этим занятиям.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Согласно современной систематике, патогенные микроорганизмы относятся к царству прокариот (Procarvotae), патогенные простейшие и грибы - к царству эукариот (Eucaryotae), вирусы объединяются в царство *Vira*.

Все прокариоты, имеющие единый тип организации клеток, объединены в один отдел *Bacteria*. Однако отдельные группы этих микроорганизмов отличаются друг от друга структурными и физиологическими особенностями. На этом основании они выделяются в: собственно бактерии (*Bacteria*), актиномицеты (*Actinomycetes*), спирохеты (*Spirochaeta*), риккетсии (*Rickettsia*), хламидии (*Chlamydia*), микоплазмы (*Mycoplasma*).

МОРФОЛОГИЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРА БАКТЕРИЙ

(см. Методические указания к практическим занятиям № 1,2,4)

К классу *Actinobacteria* относятся в который включены также нокардии и микобактерии.

Актиномицеты (греч. *Mykos* - гриб, *actis* - луч) – лучистые грибы, представляют собой нитевидные ветвистые клетки, напоминающие мицелий грибов. В результате фрагментации мицелия могут иметь вид палочек. Это одноклеточные микроорганизмы. Тело актиномицетов состоит из несептированного мицелия, который имеет вид ветвящихся тонких нитей (0,2-1,2 мкм). Нити мицелия имеют длину 100 - 600 мкм и толщину 0,5-1,2 мкм. Хорошо окрашиваются всеми анилиновыми красителями, грамположительные. Некоторые актиномицеты вокруг нитей имеют капсулу. У актиномицетов, как и у бактерий, выполняет функцию нуклеида.

В нитях мицелия находятся зерна хроматина. Размножаются актиномицеты при помощи специальных органов плодоношения, путем прорастания спор, простым делением и почкованием. Многие представители актиномицетов обладают способностью вырабатывать антибиотические вещества.

Большинство актиномицетов являются свободноживущими микроорганизмами. Патогенные виды являются возбудителями актиномикоза человека. В организме актиномицеты формируют друзы – своеобразное склпление мицелия.

Нокардии напоминают микобактерии, но отличаются от них нитевидной формой клеток. На питательных средах дают мицелий. Вызывают у человека нокардиоз.

Патогенные грибы (*Fungi*) отнесены к растительным гетеротрофным организмам - эукариотам, лишены хлорофилла. Форма клеток у молодых культур может быть круглая, яйце-



Рис. 12. МОРФОЛОГИЯ АКТИНОБАКТЕРИЙ

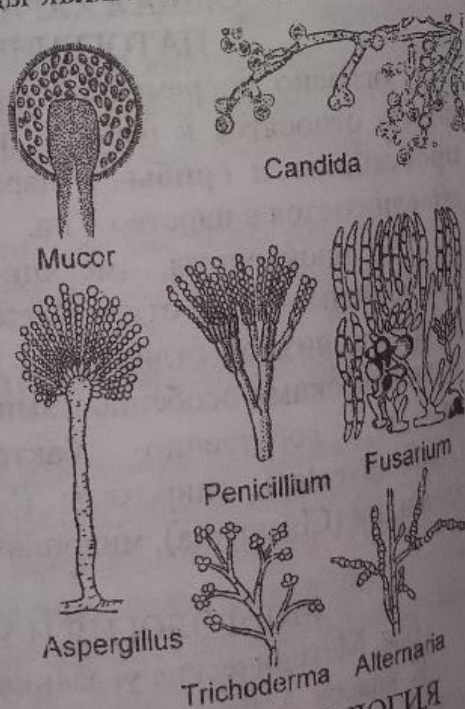


Рис. 13. МОРФОЛОГИЯ ГРИБОВ

видная, веретенообразная, амебовидная. Грибы обладают дифференцированным ядром (одним или несколькими), клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной. В цитоплазме содержатся митохондрии, аппарат Гольджи, вакуоли, включения.

Основным структурным компонентом клеток грибов является мицелий, состоящий из разветвленных бесцветных нитей (гиф) 1-10 мкм в диаметре и 4-70 мкм длиной. Грибы размножаются делением, прорастанием, почкованием, спорообразованием и половым путем. Заболевания, вызываемые патогенными грибами, называются микозы.

Простейшие (Protozoa)- одноклеточные эукариотные животные организмы, более высокоорганизованные по сравнению с бактериями. Они имеют цитоплазму, дифференцированное ядро, оболочку, примитивные органоиды. Простейшие размножаются простым и множественным делением, половым путем, а также сложным способом- половым и бесполом. Могут образовывать цисты. Более детальное описание и характеристика простейших дается в курсе биологии. К патогенным простейшим относятся возбудители лейшманиоза, трипаносомоза, трихомониоза, лямблиоза, амебиаза, малярии, токсоплазмоза, балантидиоза. Морфология простейших подробно изучалась в курсе медицинской биологии.

* * *

Занятие № 5. ФИЗИОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ. ДЕЗИНФЕКЦИЯ

Цель занятия:

Ознакомиться с аппаратурой, питательными средами, принципами культивирования бактерий, аппаратурой для стерилизации, дезинфицирующими растворами, аппаратурой для культивирования бактерий с целью создания навыков и умений проведения дезинфекции, культивирования микроорганизмов, стерилизации, необходимых для дальнейшего изучения курса микробиологии и последующей практической работы.

Студент должен:

Знать:

- основные процессы жизнедеятельности микроорганизмов (питание, дыхание, размножение);
- условия культивирования бактерий, классификацию питательных сред;

- методы и режимы стерилизации, дезинфекции;
 - приготовление простых питательных сред.
- Уметь:
- выбрать режим стерилизации для питательных сред и других объектов;
 - контролировать эффективность стерилизации химическими и бактериологическими тестами.
- Овладеть навыками:
- соблюдения правил противэпидемического и санитарно-гигиенического режима,
 - техники безопасности,
 - стерилизации петли прокаливанием,
 - приготовления мазка из культур бактерий,
 - обеззараживания инфицированного материала,
 - антисептической обработки рук

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. ПИТАНИЕ БАКТЕРИЙ

Физиология бактерий изучает физические, химические и биологические процессы в бактериальной клетке, а также физические, химические и биологические превращения, вызываемые бактериями в окружающей среде.

Питание бактерий (анаболизм, пластический метаболизм).

Для осуществления процессов роста и размножения бактерий необходимы питательные вещества из окружающей среды. Поступление питательных веществ в бактериальную клетку происходит за счет пассивной диффузии, облегченной диффузии и активного транспорта с помощью белков - пермеаз. Необходимое условие - усваиваемая форма питательных веществ.

Все микроорганизмы по способности усваивать источники углерода делятся на две группы - автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы (аутоотрофы) синтезируют все углеродсодержащие компоненты клетки из CO_2 , как единственного источника углерода.

Гетеротрофы - источником углерода служат разнообразные сложные органические углеродсодержащие соединения.

Гетеротрофы в свою очередь делят на сапрофитов и паразитов.

Сапрофиты - используют органические вещества, находящиеся во внешней среде.

Паразиты - требуют сложных органических соединений, питаются за счет организма хозяина.

По способности усваивать источники азота микроорганизмы делятся на две группы - прототрофы и ауксотрофы.

Прототрофы - синтезируют органические вещества (углеводы, аминокислоты и др.) из глюкозы и солей аммония.

Ауксотрофы - ассимилируют эти соединения в готовом виде из окружающей среды или организма хозяина. Патогенные и условно-патогенные для человека микроорганизмы являются ауксотрофами. Кроме азота и углерода для жизнедеятельности микроорганизмов необходимы витамины, ростовые факторы и другие соединения.

Соответственно типу питания все бактерии по требовательности к питательным средам разделяют на нетребовательные (размножающиеся на универсальных питательных средах) и требовательные (требующие специальных питательных сред).

2. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ (КАТАБОЛИЗМ, ДЫХАНИЕ БАКТЕРИЙ)

Для процессов жизнедеятельности бактерий необходима энергия, которую бактерии получают в результате дыхания, или биологического окисления.

Все микроорганизмы по типу дыхания делятся на 4 группы (см. содержание протокола):

Облигатные (строгие) аэробы нуждаются в свободном кислороде.

Микроаэрофилы и капнофилы - нуждаются в небольших количествах кислорода и повышенной концентрации углекислоты.

Факультативные анаэробы способны менять тип дыхания с аэробного на анаэробный.

Облигатные анаэробы получают энергию при отсутствии кислорода, за счет ускоренного, но не полного расщепления питательных веществ.

3. РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Рост бактерий - воспроизведение всех клеточных структур, ведущее к увеличению массы клетки.

Размножение бактерий - увеличение числа клеток во популяции. Большинство прокариот размножается поперечным делением, некоторые почкованием, грибы - спорообразованием. Размножение бактерий определяется временем генерации, т.е. периодом, в течение которого происходит деление клеток. Время генерации зависит от вида бактерий, возраста, питательной Среды, температуры и других факторов и колеблется от 20 мин. до 3 - 5 недель.

Фазы развития бактериальной культуры:

I - фаза адаптации или исходная стационарная фаза. В это время идет приспособление бактерий к питательной среде.

II - фаза логарифмического роста, когда идет увеличение числа живых клеток в геометрической прогрессии за счет размножения. Логарифм концентрации живых клеток растет пропорционально времени.

III - фаза стационарного максимума. В эту фазу сохраняется постоянное количество живых клеток вследствие того, что число отмерших клеток уравнивается с числом вновь образовавшихся. Культура достигает M-концентрации. M-концентрация - максимальная концентрация живых бактерий в единице объема питательной среды, величина постоянная для определенного вида бактерий в определенных условиях.

IV - фаза логарифмического отмирания, когда идет массивная гибель бактерий, логарифм их концентрации уменьшается пропорционально времени.

V - фаза покоя. Постепенно замедляется скорость отмирания, отдельные клетки сохраняют жизнеспособность, но потом наступает полная гибель культуры.

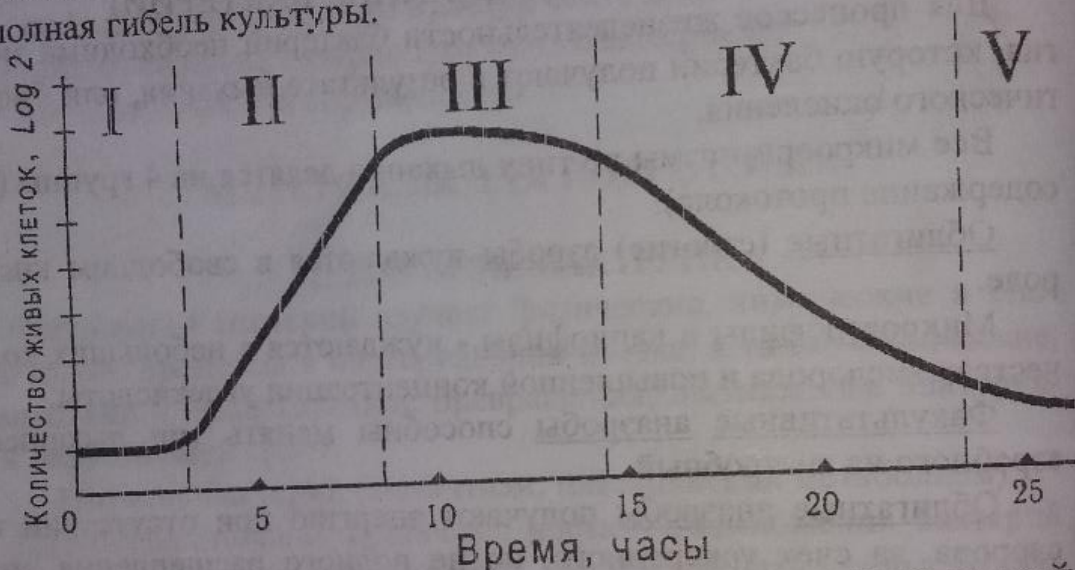


Рис. 14. ГРАФИК РАЗМНОЖЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ В ЖИДКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ. Римскими цифрами указаны основные фазы размножения)

4. УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

Для роста и размножения бактерий необходимо создать условия, определенные для каждого вида:

1. Подходящая питательная среда.

Требования к питательной среде: среда должна содержать необходимые питательные вещества в легкоусваиваемой форме, иметь оптимальные влажность, вязкость, pH, быть изотоничной, стерильной, нужной консистенции, по возможности быть прозрачной, удобной расфасовки, экономичной.

2. Определенные условия аэрации.

В зависимости от типа дыхания бактерий им необходимо создать соответствующие условия.

3. Определенная температура.

Нужные температурные условия создаются в термостатах. Все микроорганизмы по отношению к температурному режиму разделяют на психрофильные (холодолюбивые), мезофильные (средние) и термофильные (теплолюбивые). Большинство патогенных бактерий относятся к мезофилам. Оптимальная температура для них 37°C.

4. Отсутствие вредных воздействий.

Губительно на бактерии влияют температура, некоторые химические вещества, излучение.

5. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОСТЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Питательные среды - среды, содержащие различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размножения микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях.

Питательные среды готовят из продуктов животного или растительного происхождения. В бактериальной практике чаще всего используют сухие питательные среды. Они могут длительно храниться, удобны при транспортировке, имеют относительно стандартный состав.

По консистенции питательные среды могут быть жидкими, полужидкими, плотными. Плотные среды готовят путем добавления к жидкой среде 1,5 - 2% агара, полужидкие - 0,3 - 0,7% агара.

Агар представляет собой продукт переработки особого вида морских водорослей. Он затвердевает при температуре около 40°C и в застывшем состоянии придает среде плотность.

По назначению питательные среды делят на простые, специальные, дифференциально-диагностические, селективные и консервирующие (см. содержание протокола).

Микротест-системы (МТС) - полистироловые пластины с лунками, в которых содержатся стерильные дифференциально-диагностические питательные среды.

Основные питательные среды - мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА) выпускают в сухом виде. Навеску порошка, указанную на этикетке, размещивают в дистиллированной воде, кипятят (1 - 3 мин.), фильтруют, разливают в колбы или пробирки, стерилизуют при 120 °C в течение 20 мин. МПА разливают в стерильные чашки Петри.

Другие питательные среды выпускают заводы бактериальных и вирусных препаратов или готовят в специальных отделах микробиологических лабораторий.

6. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АНАЭРОБОВ

Для выращивания строгих анаэробов применяются способы культивирования: в термостате - анаэростате (анаэростат - специальный прибор, из которого можно откачивать воздух либо заменять воздух инертным газом), в аппарате Аристовского или эксикаторе (используются химические поглотительные смеси), на специальных питательных средах, например, среде Китт - Тароцци (пробирка с глюкозным бульоном и кусочком печени, залитая сверху вазелиновым маслом), в толще глюкозного питательного агара (в высоких пробирках, трубках Бурри, трубках Виньяль - Вейона).

В настоящее время для диагностического культивирования анаэробов и микроаэрофилов применяют одноразовые полимерные пакеты или боксы, в которых создаются необходимые условия аэрации благодаря специальным химическим регенераторам см. рис.



Рис. 15. ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОБЛИГАТНЫХ АНАЭРОБОВ И МИКРОАЭРОФИЛОВ (а - бокс на 10 чашек ; б - пакет на 1-2 чашки с питательной средой).

Техника посева на питательную среду Китт-Тароцци.

Посев обычно проводят пипеткой Пастера правой рукой. Вначале открывают пипетку: фиксируют капилляр пипетки в пламени,

капилляр изгибается от места нагрева книзу, затем обожженным пинцетом отламывают конец пипетки.

Затем левой рукой берут пробирки с исследуемым материалом и средой Китт-Тароцци, обе пробки одновременно прижимают к ладони мизинцем правой руки и открывают пробирки. Обжигают края пробирок в пламени горелки, пастеровскую пипетку плотно закрывают указательным пальцем правой руки и входят в пробирку с исследуемым материалом. Указательный палец отводят от края пипетки - капилляр заполняется исследуемым материалом (в нашем случае - суспензией почвы). Затем снова плотно закрывают пипетку указательным пальцем правой руки и переносят пипетку в пробирку со средой Китт-Тароцци. Слегка нагрев толстый конец пипетки в пламени выдувают содержимое ее в среду Китт-Тароцци (за счет расширения воздуха при нагревании). Пипетку Пастера извлекают из пробирки, опускают в дезинфицирующий раствор, а пробирки обжигают в пламени горелки и закрывают пробками.

Посев надписывают стеклографом (номер исследования, дату посева). В нашем случае - пишем номер группы и дату посева.

Посевы помещают в термостат при 37 °С.

Для уничтожения сопутствующих неспорообразующих микроорганизмов исследуемый материал или посевы прогревают при 80 °С в течение 20 мин.

7. АСЕПТИКА. АНТИСЕПТИКА. СТЕРИЛИЗАЦИЯ. ДЕЗИНФЕКЦИЯ.

Асептика - система мероприятий, предупреждающих попадание микроорганизмов из окружающей среды в ткани или полости человеческого организма при лечебных и диагностических манипуляциях, а также в материал для исследования, в питательные среды и культуры микроорганизмов при лабораторных исследованиях. Целью асептики является создание безмикробной зоны или зоны с резко сниженной численностью микроорганизмов в местах нахождения больных, или проведения медицинских вмешательств и лабораторных исследований. Асептика предусматривает стерилизацию инструментов и материалов, специальную обработку рук медицинских работников, соблюдение особых санитарно-гигиенических правил и приемов работы. Правила асептики должны строго соблюдаться при производстве лечебных и профилактических препаратов, в работе микробиологических лабораторий.

Асептика использует прямые (стерилизацию, дезинфекцию, антисептику) и косвенные (разделительные меры) методы воздействия на микроорганизмы.

Стерилизация - это полное освобождение объектов от всех форм микроорганизмов. Основной целью стерилизации является предупреждение заноса микробных клеток в организм человека при медицинских манипуляциях, в питательные среды и культуры клеток при микробиологических исследованиях.

Стерилизацию проводят физическими методами:

- 1) воздействием высокой температуры;
- 2) путем ультрафиолетового и гамма-облучения;
- 3) механическим путем - фильтрацией жидкостей через бактериальные фильтры (фильтры Зейтца, свечи Шамберлана), химическими методами (см. содержание протокола).

Контроль стерилизации проводят с помощью специальных тестов или посевов исследуемых образцов и смывов с предметов на питательные среды.

Дезинфекция - это совокупность химических, физических и механических способов полного уничтожения вегетативных и споровых форм патогенных и условно-патогенных для человека микроорганизмов.

Целью дезинфекции является предупреждение передачи возбудителей от инфицированного организма неинфицированному через объекты внешней среды. Для этого чаще используют химические вещества, которые обладают антимикробными свойствами.

К наиболее распространенным дезинфицирующим веществам относятся хлорная известь (0,1 - 10% раствор), хлорамин (0,5 - 5% раствор), фенол или карболовая кислота (3 - 5% раствор), лизол (3 - 5% раствор) и др.

Антисептика - комплекс лечебно-профилактических мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов, способных вызвать инфекционный процесс на поврежденных или неповрежденных участках кожи и слизистых оболочках человека. В качестве антисептиков используют химические вещества, оказывающие антимикробное действие (преимущественно бактериостатическое) - 70% этиловый спирт, 5% спиртовой раствор йода, 0,5 - 1% раствор формалина, 1 - 2% спиртовые растворы метиленового синего или бриллиантового зеленого и др.

* * *

Занятие № 6. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АЭРОБОВ И АНАЭРОБОВ

Цель занятия:

Изучить общие правила и методы выделения чистых культур аэробов и анаэробов.

Студент должен:

Знать :

- схемы выделения чистых культур аэробов и анаэробов.

Уметь :

- готовить мазок из исследуемого материала (гной, кровь, спинномозговая жидкость, мокрота, отделяемое слизистой зева)
- пересевать из среды Китта-Тароцци на питательную среду в чашке Петри.

Овладеть навыками:

- первичной микроскопии исследуемого материала;
- дифференциации бактерий по морфологическим и тинкториальным свойствам в мазках, окрашенных по Граму;
- посева петлей на питательную среду для получения изолированной колонии микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ И ЕЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯ - ОСНОВА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ

Бактериологический метод исследования заключается в выделении чистой культуры бактерий из исследуемого материала и является основой бактериологического метода диагностики инфекционных заболеваний. Бактериологический метод диагностики - наиболее доказательный метод диагностики заболевания путем выделения возбудителя в чистой культуре и его идентификации (определение вида выделенного микроорганизма из исследуемого материала).

Для выделения чистой культуры бактерий из сложных смесей разных видов бактерий применяют методы, основанные на:

- механическом разобщении бактерий (разобщение бактерий в глубине или на поверхности плотной питательной среды по Коху - метод Дригальского, выбор бактериальной клетки под микроскопом с последующим ее посевом на питательную среду, метод серийных разведений в жидкой питательной среде по Пастеру);

- уничтожении сопутствующей микрофлоры с помощью химических веществ (обработка кислотой для выделения кислотоустойчивых бактерий), антибиотиков (для выделения антибиотикорезистентных микроорганизмов кишечной группы);

- создании селективных условий культивирования (анаэробные, микроаэрофильные условия), отбор подвижных (жгутиковых) бактерий (посев по Шукевичу),

уничтожении неспорных форм бактерий путем прогревания питательной среды сразу после посева (при выделении чистой культуры клостридий);

- биологическом разделении бактерий путем проведения через организм лабораторного животного для освобождения от непатогенных микробов.

В диагностической практике для выделения чистой культуры наиболее часто используется метод механического разобщения бактерий на плотной питательной среде в чашке Петри.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОНЯТИЙ: «КОЛОНИЯ», «ИЗОЛИРОВАННАЯ КОЛОНИЯ», «ПОДОЗРИТЕЛЬНАЯ КОЛОНИЯ»

Колония - результат размножения одной бактериальной клетки на плотной питательной среде.

Изолированная колония - колония, отделенная от других колоний стерильной питательной средой.

Подозрительная колония - колония, которая по морфологии и микроскопическому составу похожа на колонию подозрительного или выделяемого микроорганизма.

3. СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ АЭРОБОВ

Схема выделения чистой культуры аэробов и основное содержание каждого этапа приведены в таблице (см. «Альбома... »)

4. СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ АНАЭРОБОВ

Выделение чистой культуры анаэробов (см. табл. 2 (см. «Альбома... ») построена на том же принципе, что и выделение чистой культуры аэробов - на механическом разобщении бактерий на плотной питательной среде с последующим получением изолированной колонии. Отличия каждого этапа связаны с особенностями биологии анаэробов и, следовательно, условиями культивирования: на всех этапах выделения чистой культуры необходимо обеспечивать анаэробные условия культивирования.

5. ТЕХНИКА ПОСЕВОВ И ПЕРЕСЕВОВ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

5.1. Посев бактериологической петлей.

Чашку Петри с мясопептонным агаром помещают на столе вверх дном.

Петлей берут исследуемый материал так же, как и при приготовлении мазка (см. методические указания к занятиям № 1-2), однако основную массу взятого материала стряхивают, не вынимая петли из пробирки, чтобы уменьшить количество микроорганизмов.

Берут пальцами левой руки за края крышки чашки и переворачивают чашку так, чтобы дно ее легло на ладонь. Захватывают левой рукой дно чашки, а крышку кладут на стол.

При взятии материала петлю обычно держат в положении «писчего пера» большим, указательным и средним пальцами правой руки. Перед посевом переводят петлю в положение «смычка»: прижимают петлю большим пальцем к четырем остальным пальцам правой ладони.

Петлю под максимально возможным острым углом прижимают к поверхности питательного агара и легкими движениями, не повреждая поверхности среды, верхнюю треть чашки густо заштриховывают зигзагообразными движениями петли от края к краю чашки, после чего делают менее густые штрихи в остальной части питательной среды (на рисунке - вариант № 3). В результате масса бактерий остается в густозасеянной части чашки, что дает возможность на остальной поверхности чашки получить изолированные колонии.

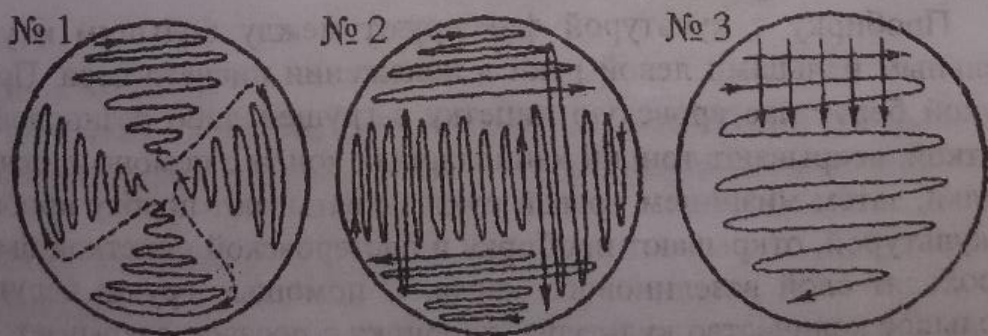


Рис. 16. ВАРИАНТЫ ПОСЕВА ПЕТЛЕЙ НА ПЛОТНУЮ ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ В ЧАШКЕ ПЕТРИ

На дне чашки стеклографом надписывают номер исследования в (нашем случае указывают фамилию студента, производившего посев) и дату посева.

Посев шпателем.

Исследуемый материал петлей или пипеткой наносят на поверхность питательного агара в чашке Петри и равномерно распределяют стерильным шпателем. Затем этим шпателем, не прожигая в пламени горелки, материал распределяют по поверхности агара во второй и третьей чашках. После посева чашки переворачивают дном кверху, надписывают и помещают в термостат при 37 °С на 18-24 ч.

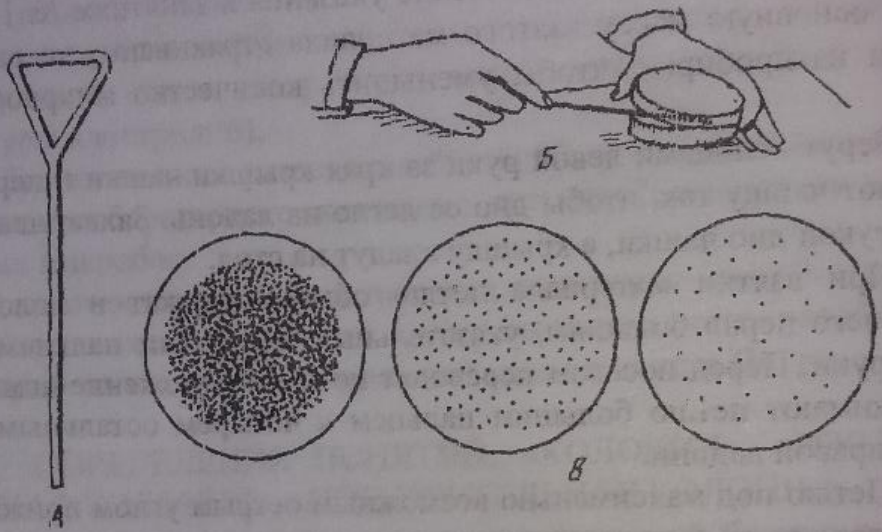


Рис. 17. ПОСЕВ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА НА ПОВЕРХНОСТЬ ПИТАТЕЛЬНОГО АГАРА В ЧАШКЕ ПЕТРИ ШПАТЕЛЕМ.

5.2. Техника работы при выделении чистой культуры анаэробов

Техника приготовления мазка из культуры, выросшей на среде Китт-Тароцци.

Пробирку с культурой фиксируют между большим и указательным пальцами левой руки в положении писчего пера. Правой рукой берут пастеровскую пипетку с грушей либо резиновой пипеткой, вскрывают тонкий капиллярный конец с помощью огня горелки, затем мизинцем правой руки захватывают пробку пробирки с культурой, открывают пробирку и пастеровской пипеткой быстро проходят слой вазелинового масла. С помощью груши берут небольшое количество культуры, пробирку с посевом закрывают ватной пробкой и помещают в штатив.левой рукой удаляют стерильным ватным тампоном остатки масла с поверхности капилляра пастеровской пипетки, тампон помещают в дезинфицирующий раствор. Наносят 1-2 капли взятой культуры на предметное стекло, равномерно распределяют на небольшой площади стекла, подсушивают, фиксируют, окрашивают и микроскопируют.

После микроскопии мазка культуру, выросшую на среде Китт - Тароцци, пересевают на плотные питательные среды: на сахарный кровяной агар Цейссlera в чашке Петри для получения изолированных колоний при культивировании в анаэроостате с последующим пересевом подозрительных колоний на среду Китт-Тароцци для накопления чистой культуры анаэробов.

Техника посева культуры анаэробов для получения изолированных колоний.

Пересев культуры, выросшей на среде Китт-Тароцци, производят следующим образом. Штатив с пробирками, из которых делают посев, помещают слева от бактериолога, чашку с глюкозным кровяным агаром Цейссlera вверх крышкой - справа. Берут материал пастеровской пипеткой так же, как и при приготовлении мазка (смотри выше), наносят 1 каплю материала на поверхность питательной среды в чашке Петри. Для этого приоткрывают крышку чашки Петри левой рукой, вносят каплю материала, закрывают крышку, а пастеровскую пипетку помещают в дезинфицирующий раствор.

Затем делают посев бактериологической петлей так, как это описано при выделении чистой культуры аэробов.

Культивирование проводят при температуре 37 °С в течение 24 ч в анаэроостате. В дальнейшем - смотри схему выделения чистых культур анаэробных бактерий (табл. 2.).

* * *

Занятие № 7. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ

Цель занятия:

Научиться выделять чистые культуры аэробных и анаэробных бактерий и дифференцировать их по культуральным свойствам.

Студент должен:

Знать:

- схему и технику выделения чистых культур аэробов и анаэробов;

- методику изучения морфологии колоний;

- роль пигментообразования в жизнедеятельности бактерий;

методику изучения культуральных свойств бактерий;

Уметь:

- проводить выбор подозрительной колонии;

Овладеть навыками:

- приготовления мазков из колоний и пересева колонии на скошенный мясо-пептонный агар.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АЭРОБОВ И АНАЭРОБОВ (см. Методические указания для подготовки к практическому занятию № 6 - таблицы №№ 1 и 2).

2. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ - требовательность к питательным средам, тип дыхания, температурный оптимум, морфология (характер) роста на жидкой питательной среде и на скошенном мясо-пептонном агаре, морфология колоний (см. ниже).

Требовательность к питательной среде изучают путем одновременного (параллельного) посева на ряд (несколько) питательных сред с определением качества и скорости роста. Тип дыхания - путем определения характера роста в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях (иногда проводится культивирование в разных условиях аэрации). Температурный оптимум определяется по характеру роста при разной температуре.

Морфология роста на жидкой питательной среде может быть различной: диффузное помутнение с последующим образованием осадка; осадок (крошковидный, придонный, пристеночный, в виде комочка ваты при прозрачной среде над осадком: пленка - холерный вибрион, микобактерии туберкулеза, чумный микроб - "сталактитовая пещера"). Морфология роста на скошенной питательной среде: обильный либо скудный рост, сухой, влажный, слизистый, несливающийся ("шагреновая кожа" при росте палочки дифтерии на свернутой сыворотке).

3. ПИГМЕНТЫ БАКТЕРИЙ

Пигменты бактерий - биологические красители, продуцируемые некоторыми бактериями. Пигменты бывают водорастворимыми, липохромными, - растворимыми в органических растворителях, нерастворимыми. Физиологическая роль пигментов может заключаться в их ферментативных свойствах (участие в процессах дыхания), защите от светового излучения.

Пигменты имеют значение для выбора подозрительной колонии при выделении чистых культур некоторых бактерий. Пигмент

синегнойной палочки имеет значение для клинической диагностики синегнойной инфекции раны.

4. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ И МИКРОСКОПИЧЕСКОГО СОСТАВА КОЛОНИЙ

Морфологию колоний изучают визуально (*ad oculus*), с помощью лупы, микроскопа при малом увеличении, стереомикроскопа. Основные признаки колонии - размеры, форма, цвет, форма краев, характер поверхности колонии, структура, консистенция, прозрачность. Морфология колоний изучается невооруженным глазом, а также с помощью лупы или малого увеличения микроскопа. Обращают внимание на признаки, перечисленные в таблице (см. «Альбом...»). Примеры морфологии колоний представлены на рисунке.

Рис. 18. ТИПЫ КОЛОНИЙ

№ 1 - круглые с ровными краями;

№ 2 - круглые, выпуклые, блестящие слизистой консистенции;

№ 3 - с неровными краями;

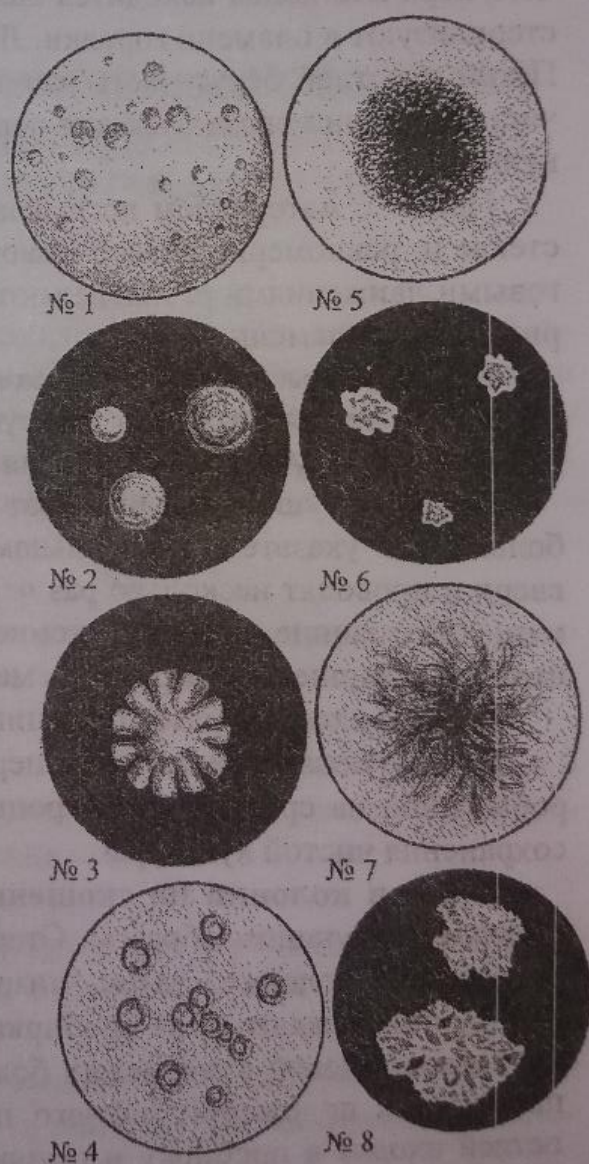
№ 4 - круглые, с валликом по периферии;

№ 5 - зернистые;

№ 6 - плоские листовидные;

№ 7 - ветвистые;

№ 8 - складчатые.



Микроскопический состав колоний изучают путем приготовления мазка из колонии, его окраски и микроскопии. Одновременно определяют чистоту выбранной колонии.

5. ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ МАЗКА ИЗ КОЛОНИИ И ПЕРЕСЕВА ЕЕ НА МПА И СРЕДУ КИТТА-ТАРОЦЦИ

Приготовление мазка из изолированной колонии

Предварительно выбирают изолированную колонию, выросшую на питательной среде в чашке Петри. На середину предметного стекла помещают каплю воды. В правой руке в положении писчего пера или копыя находится бактериологическая петля, которую стерилизуют в пламени горелки.левой рукой приоткрывают чашку Петри и петлей берут часть изолированной колонии, оставшуюся часть колонии используют для пересева с целью получения чистой культуры.

Петлю с материалом погружают в каплю воды на предметном стекле и равномерно размешивают материал в капле, а затем круговыми движениями распределяют на площади 1-2 см². Петлю стерилизуют в пламени горелки.

Препарат высушивают при комнатной температуре, а если необходимо, то подогревают в струе теплого воздуха над пламенем горелки, не допуская перегревания мазка.

После высушивания препарат фиксируют в пламени горелки: большим и указательным пальцами берут за край стекла мазком вверх и проводят несколько раз через наиболее горячую часть пламени (на границе светлой и темной его части). Следует помнить, что при излишнем перегревании мазок портится.

После фиксации мазок окрашивают и микроскопируют.

Оставшуюся часть колонии пересевают на скошенный агар (аэробы) либо на среду Китта-Тароцци (анаэробы) для накопления и сохранения чистой культуры.

Пересев колонии на скошенный питательный агар осуществляют следующим образом. Стерильной петлей берут часть изолированной колонии, затем мизинцем правой руки фиксируют пробку и извлекают ее из пробирки со скошенным агаром, которая находится в левой руке между большим, указательным и средним пальцами в положении писчего пера. Затем бактериологической петлей входят в пробирку и осторожными зигзагообразными движениями делают посев, продвигаясь к верхней части пробирки. Пробкой закрывают пробирку, бактериологическую петлю стерилизуют в огне горелки, на пробирке делают надпись и ставят в термостат.

Для накопления культуры анаэробных микроорганизмов производят пересев колонии в среду Китта-Тароцци. Стерильной бактериологической петлей берут изолированную колонию, в левой руке находится пробирка со средой Китта-Тароцци, фиксированная большим и указательным пальцами, мизинцем правой руки берут ватную пробку, открывают пробирку и в пробирку вносят петлю, быстро проходят слой вазелинового масла, и легким движением петли сеют материал, извлекают петлю, закрывают пробирку пробкой, стерилизуют петлю, кладут в штатив, на пробирке делают надпись и помещают в термостат.

* * *

Занятие № 8. БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ

Цель занятия:

Ознакомиться с методами идентификации чистых культур бактерий по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам. Обратит особое внимание, что идентификация чистых культур является конечной целью бактериологического метода диагностики инфекционных заболеваний.

Студент должен:

Знать:

- принципы идентификации чистых культур микроорганизмов по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам;
- методы определения биохимических свойств бактерий и основные дифференциально-диагностические питательные среды для изучения биохимических свойств.

Уметь:

- идентифицировать чистую культуру бактерий по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам.

Овладеть навыками:

- определения чистоты выделенной культуры;
- пересевать чистую культуру на дифференциально-диагностические среды;
- учитывать биохимические свойства микроорганизмов на дифференциально-диагностических средах.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ, ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

Ферменты - биологические катализаторы, которые осуществляют и ускоряют химические реакции и не входят в состав конечных продуктов. Все процессы жизнедеятельности на Земле - это прежде всего процессы обмена веществ, которые осуществляется с помощью ферментных систем. Для жизнедеятельности любого животного существа, в том числе и микроорганизмов, необходимы ферменты. Ферменты - белки, синтез которых контролируется генами, поэтому каждый вид бактерий имеет характерные для этого вида ферменты. Выявление (установление, определение) набора ферментов у бактерий необходимо для видовой идентификации. Некоторые ферменты обуславливают патогенные свойства бактерий. Ряд ферментов применяют для хозяйственных и медицинских целей.

Биохимическая классификация ферментов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, лигазы, изомеразы. В микробиологии имеет значение не столько механизм действия ферментов, сколько их способность расщеплять определенные вещества - субстратная специфичность. По субстратной специфичности ферменты бывают: сахаролитические (гликолитические), протеолитические, липолитические

ферменты, а также нуклеазы и оксидоредуктазы.

Биохимические свойства бактерий изучают путем посева на дифференциально-диагностические среды.

Технику пересева чистой культуры бактерий на пробирки с питательной средой см. на рис. 19.

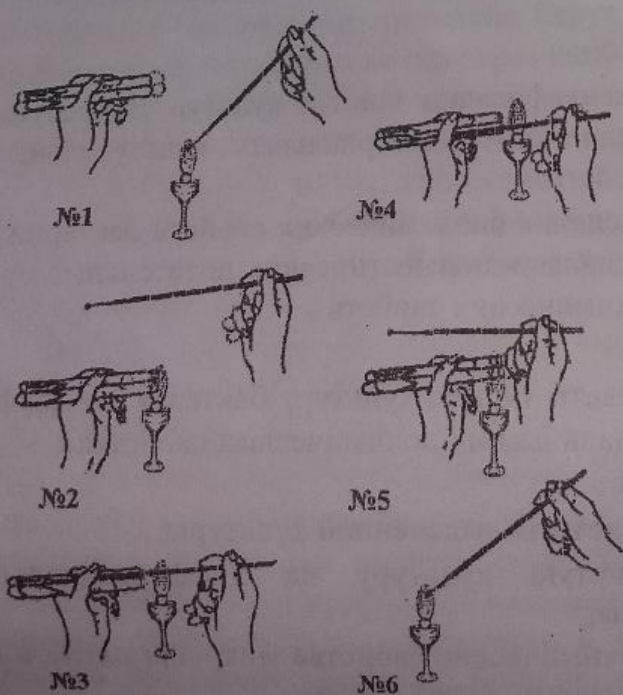


Рис. 19. ТЕХНИКА ПЕРЕСЕВА КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ ИЗ ПРОБИРКИ В ПРОБИРКУ

2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ (САХАРОЛИТИЧЕСКИХ) СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ

Сахаролитические (гликолитические) свойства изучают на средах с углеводами: Эндо, Левина, Плоскирева (для кишечной группы бактерий). Среда Эндо состоит из мясо-пептонного агара, лактозы, индикатора (фуксин в обесцвеченной форме). При расщеплении лактозы под влиянием кислоты фуксин восстанавливается, колонии таких микроорганизмов окрашиваются в красный цвет. Из группы кишечных бактерий только кишечная палочка ферментирует лактозу, вследствие этого колонии, образованные кишечной палочкой, окрашены в красный цвет.

Универсальными дифференциально-диагностическими средами для определения сахаролитических свойств являются среды Гисса (полужидкий агар с одним из углеводов и индикатором бромкрезоловым пурпурным), при расщеплении углеводов образуется кислота, под влиянием которой изменяется цвет индикатора, и газ, который обнаруживается в столбике агара в виде пузырьков.

Короткий пестрый ряд Гисса содержит лактозу, глюкозу, маннит, мальтозу и сахарозу.

3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ

Протеолитические свойства изучают на мясо-пептонной желатине (происходит разжижение желатины), проявление (форма) разжижения разное у различных видов бактерий, свернутой сыворотке - для определения прямых протеолитических свойств.

Протеолитические свойства бактерий можно обнаружить путем определения конечных продуктов распада белков - аммиака, индола и сероводорода. Для этого производят посев бактерий на мясо-пептонный бульон, между пробкой и внутренней стенкой пробирки помещают индикаторные бумажки: на индол - смоченную шавелевой кислотой - розовое окрашивание бумажки; на сероводород - смоченную ацетатом свинца - бумажка чернеет; на аммиак - красная лакмусовая бумажка - синее.



Рис.20. ОБНАРУЖЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ СЕРОВОДОРОДА И ИНДОЛА С ПОМОЩЬЮ ИНДИКАТОРНЫХ БУМАЖЕК.

4. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ

Липолитические свойства изучают на питательной среде с яичным желтком, который содержит лецитин. Колонии микробов, обладающие лецитиназными свойствами и выросшие на желточносоевом агаре, будут окружены зоной помутнения, так как при расщеплении лецитина образуются нерастворимые в воде продукты. Нуклеазные свойства изучают на среде с добавлением ДНК. После культивирования бактерий в течение 18-24 часов чашку со средой заливают разбавленной кислотой, колонии нуклеаз активных бактерий будут окружены зоной просветления, так как деполимеризованная (расщепленная) кислота не дает помутнения (высокополимерная ДНК) коагулирует и мутнеет.

Оксидоредуктазы изучают на средах с добавлением определенных веществ. Чаще всего изучают каталазную активность: каплю перекиси водорода смешивают на предметном стекле с колонией бактерий, при наличии каталазной активности наблюдается выделение пузырьков кислорода вследствие расщепления перекиси.

Комплексная (универсальная) дифференциально-диагностическая среда - молоко, на котором можно определить сахаролитические, протеолитические и липолитические свойства.

При расщеплении лактозы образуется кислая среда, молоко свертывается вследствие перехода казеиногена молока в нерастворимый казеин. Протеолитические свойства проявляются в расщеплении сгустка казеина и просветлении молока; липолитические свойства - в просветлении молока и всплывании желтого кольца жирных кислот

5. ПОНЯТИЯ: ВИД, ВАРИАНТ, ШТАММ, КЛОН

Вид - эволюционно сложившаяся совокупность особей, имеющих единый генотип, который в стандартных условиях проявляется сходными морфологическими, физиологическими и другими признаками.

Вариант - микроорганизм, отличающийся некоторыми признаками от стандартного типа (морфовар - морфологическими свойствами, биовар - биологическими, ферментовар - продукцией различных ферментов и др.).

Штамм - культура микроорганизма, выделенная из определенных источников (организма человека, животных, окружающей среды).

Клон - культура микроорганизмов, полученная из одной клетки «одноклочная» культура).

6. МЕТОДИКА ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

Идентификация культуры бактерий - определение вида (видовой принадлежности) путем изучения видовых признаков:

морфологических,
тинкториальных,
культуральных,
биохимических,
биологических,
серологических (антигенных),
фаголизабельных.

Морфологические и тинкториальные свойства бактерий изучают путем приготовления мазка, окраски и микроскопии. Морфологические свойства: форма бактерий, размеры, характер расположения микробов в мазке, наличие структурных элементов - спор, капсул, включений, жгутиков.

Тинкториальные свойства - отношение к окраскам: хорошо или плохо окрашиваются микробы, равномерность окраски, метакроматичность, отношение к окраске по Граму, кислотоустойчивость.

Культуральные свойства: требовательность к питательным средам, тип дыхания, температурный оптимум, характер роста на жидких и плотных питательных средах, морфология колоний (изучается на всех этапах выделения чистой культуры и ее идентификации).

Биохимические свойства изучают путем посева на дифференциально-диагностические среды (см. выше).

Методы определения биологических, серологических и фаголизабельных свойств будут изучены на последующих практических занятиях.

Идентификация культуры бактерий - определение вида (видовой принадлежности) путем изучения видовых признаков: морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, биологических, серологических (антигенных), фаголизабельных.

Морфологические и тинкториальные свойства бактерий изучают путем приготовления мазка, окраски и микроскопии. Морфологические свойства: форма бактерий, размеры, характер расположения микробов в мазке, наличие структурных элементов - спор, капсул, включений, жгутиков.

Тинкториальные свойства - отношение к окраскам: хорошо или плохо окрашиваются микробы, равномерность окраски, метакроматичность, отношение к окраске по Граму, кислотоустойчивость.

Культуральные свойства: требовательность к питательным средам, тип дыхания, температурный оптимум, характер роста на жидких и плотных питательных средах, морфология колоний (изучается на всех этапах выделения чистой культуры и ее идентификации).

Биохимические свойства изучают путем посева на дифференциально-диагностические среды (см. выше).

Методы определения биологических, серологических свойств и чувствительности к фагам будут изучены на последующих практических занятиях.

* * *

Занятие № 9. ФАГИ. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия :

Ознакомиться с теоретическими аспектами и практическим значением учений о бактериофагии и генетике микроорганизмов; с основными свойствами фагов и их применением в биологии и медицине, материальной основой наследственности микроорганизмов, с законами наследственности и изменчивости микроорганизмов.

Студент должен:

знать:

- понятие, структуру, морфологию фагов;
- взаимодействие фагов с бактериальной клеткой;
- практическое применение фагов в микробиологии и медицине;

и;

- особенности генетики микроорганизмов;
- основные понятия генетики микроорганизмов;
- формы изменчивости микроорганизмов;
- практическое применение учения о генетике и генной инженерии.

уметь:

- с помощью фагодиагностики провести идентификацию выделенной чистой культуры, определить фаговар микроорганизма, провести эпидемиологический анализ инфекционного заболевания с целью установления источника инфекции и путей ее передачи;
- провести индикацию микроорганизмов в окружающей среде (в водоеме).

овладеть навыками:

- фаготипирования;
- учета результатов титрования фага по Аппельману;
- определение подвижности бактерий.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

1. ФАГИ, ПРИРОДА, СТРУКТУРА

Фаги - специфические вирусы бактерий, их лизирующие.

Большинство фагов состоит из головки, (в ее полости располагается плотно скрученная ДНК или РНК) и хвостового отростка.

Наиболее изучены Т-фаги кишечной палочки. Их отросток представляет собой полый цилиндр (стержень), покрытый сокращающимся чехлом и, заканчивающийся базальной пластинкой, к которой прикреплены белковые нити - рецепторы. Под чехлом дистальной части отростка содержится литический фермент - лизоцим.

Базальная пластинка и нити -рецепторы осуществляют процесс адсорбции фага на бактериальной клетке.

Головку фага окружает белковая оболочка - "капсид" со строго ориентированными капсомерами.

Размеры фагов, форма и величина головки, длина и строение отростка различны у разных фагов.

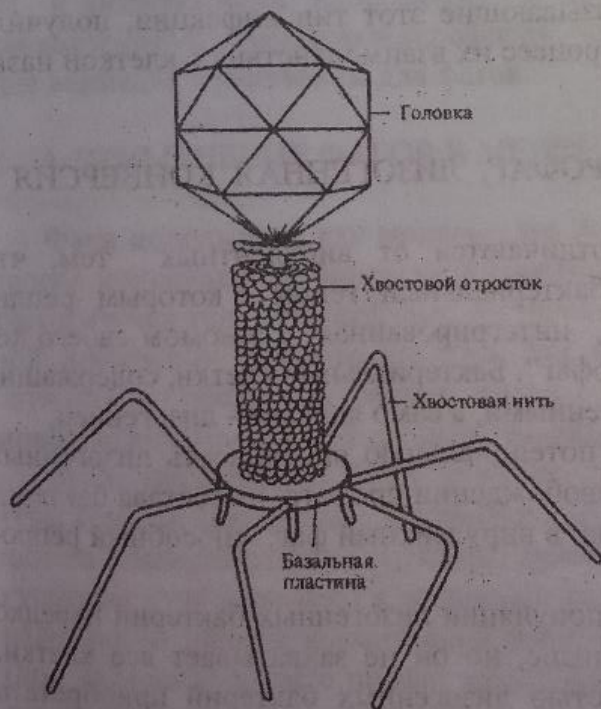


Рис. 21. СХЕМА СТРОЕНИЯ ФАГА

последовательные стадии.

Этапы репродукции фага

Адсорбция фага на бактериальной клетке происходит только при соответствии фаговых рецепторов, расположенных на конце

2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАГА И БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

По механизму взаимодействия фагов с бактериальными клетками различают: вирулентные и умеренные фаги.

Процесс взаимодействия вирулентного фага с клеткой протекает по типу продуктивной инфекции и обычно заканчивается лизисом бактериальной культуры. Взаимодействие фага с чувствительной клеткой проходит через

отростка, с рецепторами бактериальной клетки, связанными с клеточной стенкой. Некоторые фаги адсорбируются на половых ворсинках, контролируемых F или R-плазмидами. На бактериях, лишенных клеточных стенок (протопласты), адсорбция фагов не происходит.

Проникновение фага в бактериальную клетку происходит путем инъекции нуклеиновой кислоты фага через канал отростка. При этом капсидные белки головки и отростка фага остаются вне клетки.

Репликация фаговой нуклеиновой кислоты и синтез фагоспецифических ферментов внутри клетки.

Сборка и формирование зрелых фаговых частиц заключается в заполнении фаговой ДНК капсида головки.

Выход зрелых фагов из бактериальной клетки в результате ее лизиса при участии фагового лизоцима или без него.

Наряду с описанным (**продуктивным типом**) взаимодействия фага с бактериальной клеткой, заканчивающимся образованием фагового потомства и лизисом бактерий. Фаги, вызывающие продуктивную инфекцию, обычно являются вирулентными фагами.

Но взаимодействие фага с клеткой может идти по **интегративному** пути. Фаги, вызывающие этот тип инфекции, получили название умеренных, а процесс их взаимодействия с клеткой называют **лизогенией**.

3. ЛИЗОГЕНИЯ, ПРОФАГ, ЛИЗОГЕННАЯ КОНВЕРСИЯ

Умеренные фаги отличаются от вирулентных тем, что встраивают свою ДНК в бактериальный геном с которым реплицируются. Фаговая ДНК, интегрированная с геномом своего хозяина носит название "профаг". Бактериальные клетки, содержащие профаг, называются лизогенными, а само явление - лизогенией.

Лизогения отражает потенциальную способность лизогенных бактерий к лизису при освобождении профага из состава бактериального генома и перехода в вирулентный фаг, способный репродуцироваться.

В отдельных клетках популяции лизогенных бактерий нередко происходит спонтанный лизис, но он не захватывает все клетки. Это связано со способностью лизогенных бактерий приобретать иммунитет к последующему заражению одноименным фагом, вследствие чего остальные лизогенные клетки в бактериальной популяции полностью сохраняют свою целостность и жизнеспособность.

Лизогенизация лежит в основе фаговой или лизогенной конверсии, наблюдаемой у бактерий. Она заключается в приобрете-

нии лизогенными бактериями новых свойств, например: способность продуцировать токсины, изменять морфологию, антигенные свойства и др. признаки. Эти признаки контролируются генами профага и бактериальной клетки или только профага.

Механизм этого явления связан с внесением новой информации генами профага в бактериальную клетку. Например, нетоксигенные штаммы коринебактерий дифтерии в результате лизогенизации превращаются в токсигенные.

Умеренные фаги могут быть дефектными, т. е. неспособными образовывать фаговое потомство, например: трансдуцирующие фаги. Их используют в качестве векторов в генной инженерии.

Распространение фагов в природе - повсеместное. Фаги встречаются там, где находятся чувствительные к ним микроорганизмы: в воде, почве, сточных водах, выделениях человека и животных и т. д. Практически все известные бактерии являются хозяевами специфических для них фагов.

Устойчивость фагов к физическим и химическим факторам выше, чем у вегетативных форм их хозяев. Фаги выдерживают нагревание до 80 °С, длительное высушивание. Они не чувствительны к антибиотикам, хлороформу и другим веществам, уничтожающим сопутствующую микрофлору. Кислоты и дезинфицирующие вещества губительны для фагов.

4. ПРИМЕНЕНИЕ ФАГОВ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ

Фаги используют как модель для решения кардинальных вопросов молекулярной биологии и генетики. С помощью умеренных фагов изучен генетический код, достигнуты большие успехи в генной инженерии и биотехнологии. Их используют для изучения опухолевого роста, как фактор наследственности и изменчивости микроорганизмов и в других исследованиях.

Фаги оказались удобной моделью для изучения тонкой структуры гена, молекулярных механизмов мутагенеза и влияния радиации на наследственные структуры организма. Так как лизогенные культуры чувствительны к радиации, они служат для определения надежности защиты космических кораблей от космических лучей (при надежной защите профаг переходит в вирулентную форму и лизирует культуру).

Строгая специфичность бактериофагов позволяет использовать их в медицинской практике: фаготерапии, фагопрофилактике и в медицинской микробиологии для фагодиагностики.

В настоящее время применение фагов с лечебной и профилактической целью ограничено в связи с широким применением более

эффективных этиотропных средств - антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов.

Препараты бактериофагов применяются для лечения дизентерии, сальмонеллезов, гнойных инфекций, вызванных антибиотико-резистентными бактериями и др., а при наличии любых осложнений, вызываемых другими препаратами (например, лекарственная аллергия при применении антибиотиков и т. д.) - фаги незаменимы.

Фагопрофилактика проводится только по эпидемиологическим показаниям, например, при дизентерии, брюшном тифе, холере, сальмонеллезной инфекции в детских коллективах для предупреждения заболеваний среди лиц, находящихся в эпидемическом очаге.

В нашей стране выпускают препараты дизентерийного, сальмонеллезных, коли-протейного, стафилококкового и других бактериофагов.

Фагодиагностика. Строгая специфичность бактериофагов позволяет использовать их для фаготипирования и дифференцировки бактериальных культур, а также для индикации их во внешней среде, например в водоемах.

Метод фаготипирования широко применяется в микробиологической практике. Он позволяет не только определить видовую принадлежность исследуемой культуры, но и ее фаговар. Использование наборов типоспецифических фагов дает возможность проводить фаготипирование исследуемых культур с целью эпидемиологического анализа инфекционных заболеваний: установления источника инфекции и путей ее передачи.

Кроме того, по наличию фагов во внешней среде (водоемах) можно судить о содержании в них соответствующих бактерий, представляющих опасность для здоровья человека.

Для индикации патогенных бактерий во внешней среде, применяется реакция нарастания титра фага (РНТФ). Она основана на способности специфических индикаторных фагов репродуцироваться в строго определенных бактериальных культурах в лабораторных условиях. При внесении такого фага в исследуемый материал, содержащий искомый возбудитель, происходит нарастание титра фага.

Определение титра фага производится по методу Аппельмана в жидкой питательной среде или по методу Грациа на плотной питательной среде.

На жидких средах лизис бактерий под действием фага проявляется в просветлении бактериальной суспензии, на плотных - в формировании участков отсутствия роста, которые называют стерильными пятнами, бляшками или негативными колониями.

Титрование фага по методу Аппельмана.

Готовят десятикратные последовательные разведения фага в бульоне от 10^{-1} до 10^{-7} . Опыт сопровождается контролями фага и тест культуры.

Во все пробирки, кроме контроля фага, вносят по 1 капле (0.05 мл.) взвеси тест культуры. Помещают в термостат на 18-20 часов. Учет результатов начинают с контролей: в контроле культуры наблюдается помутнение за счет размножения бактерий. В контроле фага - жидкость остается прозрачной.

Титр фага устанавливают по наибольшему его разведению, в котором произошел лизис культуры, содержимое пробирки прозрачное. (схема постановки опыта см. табл. 1).

Реакция нарастания титра фага (РНТФ) - является ускоренным методом диагностики и не требует выделения чистой культуры возбудителя.

Исследуемый материал (от больного или из объектов внешней Среды) и индикаторный фаг, титр которого строго установлен, вносят в бульон. После инкубации в термостате в течение суток, определяют титр фага по Аппельману или Грациа.

Увеличение титра фага в 5 раз и более говорит о том, что в исследуемом материале есть соответствующие возбудители, в которых фаг размножился.

РНТФ была разработана применительно к определению возбудителей кишечных и стафилококковых инфекций, бруцеллеза, холеры, чумы и др.

Метод фаготипирования бактерий.

Испытуемую суточную бульонную культуру бактерий засевают на поверхность питательного агара в чашке Петри, слегка подсушивают, дно чашки делят на квадраты, на агар которых пастеровской пипеткой наносят по одной капле различных типоспецифических фагов.

После суточной инкубации просматривают чашку, отмечая те квадраты, в которых имеется лизис бактерий. Фаговар бактериальной культуры определяется тем типом фага, который вызывает ее лизис. Фаготипирование применяют для типирования *S. typhi*, *Sh. sonnei*, *St. aureus*, *V. cholerae* и др.

5. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Генетика микроорганизмов - наука о законах наследственности и изменчивости микроорганизмов.

Генетика микроорганизмов - популяционная генетика. Она изучает свойства не отдельных особей, а свойства популяции микроорганизмов. Это связано не со сложностью изучения свойств от-

дельных микроорганизмов, а с тем, что микробные популяции всегда гетерогенны и содержат микроорганизмы, иногда существенно отличающиеся по ряду признаков.

Быстрое размножение микроорганизмов, гаплоидность генов, отсутствие надежных механизмов стабилизации генетического материала, приводит к быстрой изменчивости микробов, поэтому даже клоновые культуры вскоре становятся гетерогенными.

6. МАТЕРИАЛЬНАЯ ОСНОВА НАСЛЕДСТВЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ. ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА МИКРООРГАНИЗМОВ. ГЕНОТИП, ФЕНОТИП, ГЕН. ФУНКЦИИ ГЕНА. ТЕОРИЯ ГЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА

Материальной основой наследственности, определяющей генетические свойства всех организмов, в том числе бактерий и вирусов, является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Исключение составляют только РНК-содержащие вирусы, у которых генетическая информация закодирована в РНК. В отличие от хромосомы эукариот гены прокариот организованы в более простую структуру, представляющую собой только молекулу ДНК, нередко замкнутую в кольцо, которую называют - нуклеоидом.

Доказательством генетической роли нуклеиновой кислоты является, например, тот факт, что при фаговой инфекции в бактериальные клетки попадает только нуклеиновая кислота фага и это приводит к формированию полноценных фаговых частиц.

В настоящее время получены синтетические гены - участки ДНК, которые выполняют генетические функции.

Генотип - система самовоспроизводящихся структур (генов), контролирующих обмен веществ и осуществляющих передачу признаков в ряду поколений. В этом определении подчеркивается функция генотипа.

Фенотип - комбинация признаков в конкретных условиях существования. В фенотипе проявляется лишь часть признаков, заложенных в генотипе. Поэтому потенциальные возможности генотипа всегда шире фенотипического проявления признаков.

Ген - функциональная и структурная единица генотипа (участок молекулы нуклеиновой кислоты), контролирующей синтез одной полипептидной цепи.

Многие функционально активные белки состоят из нескольких полипептидных цепей, причем, синтез каждой из них может управляться разными генами. Например, для синтеза иммуноглобулина может потребоваться работа трех групп генов.

Функции гена. Ген выполняет автокаталитическую функцию (самовоспроизведение для сохранения признаков в ряду поколений) и гетерокаталитическую (управление обменом веществ через управление биосинтезом белков-ферментов).

Автокатализ осуществляется путем репликации нуклеиновых кислот. Если геном представлен двухспиральной ДНК (у большинства микроорганизмов), то репликация идет по полуконсервативному типу: молекула ДНК раздваивается на две спирали и происходит достройка недостающей комплементарной спирали с помощью ДНК-полимеразы, впервые открытой у *E. coli*. В результате образуются две дочерние молекулы ДНК, каждая из которых содержит одну материнскую и одну, вновь синтезированную, дочернюю нити ДНК. За счет соблюдения принципа комплементарности происходит точное копирование структуры генома и сохранения генов в ряду поколений.

Гетерокатализ реализуется через перенос наследственной информации от гена на структуру полипептидной цепи.

Смысл генетической информации - определение порядка включения аминокислотных остатков в пептидную цепь. Генетическая информация записана в виде генетического кода в молекуле ДНК или РНК.

Перенос наследственной информации идет в соответствии с формулой Ф. Крика ДНК → РНК → белок, в которую добавили процесс обратной транскрипции - построение ДНК-овой копии РНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы, открытой у онкогенных вирусов.

Регуляция биосинтеза белка - осуществляется также генетически по принципу обратной связи. Генетический материал подразделяется на опероны, включающие гены-регуляторы, гены операторы и структурные гены. Ген-регулятор несет информацию о синтезе регуляторного белка-репрессора, способного подавлять функционирование структурных генов за счет соединения с геном оператором (промотором), если он не соединен с субстратом. При появлении субстрата (например, лактозы), белок-репрессор соединяется с ним и в таком состоянии не способен репрессировать гены, структурные гены дерепрессируются и идет синтез ферментов, необходимых для расщепления субстрата.

Если оперон управляет ферментами, обеспечивающими синтез, а не расщепление какого-либо вещества, то белок-репрессор подавляет ген-оператор лишь тогда, когда он соединен с этим веществом.

Теория генной регуляции биосинтеза белка была создана французскими микробиологами Жакобом и Моно при изучении лактозного оперона *E. coli*.

Исходя из такого процесса регуляции биосинтеза понятно, что часть генов может находиться в репрессированном состоянии, а функционируют лишь гены, обеспечивающие необходимые метаболические процессы в данных условиях.

Внехромосомные факторы наследственности у бактерий.
Генетический материал бактерий называют бактериальной хромосомой или нуклеоидом. Помимо нуклеоида генетический материал у бактерий может содержаться в плазидах, транспозонах и Is - последовательностях, которые являются молекулами ДНК. Эти внехромосомные наследственные элементы не являются обязательными, но могут придавать бактериям селективные преимущества, например резистентность к антибиотикам.

Плазмиды - внехромосомные генетические элементы, представляющие собой небольшие, замкнутые в кольцо нити ДНК. Они могут находиться в автономном состоянии в цитоплазме и самостоятельно реплицироваться независимо от хромосом. Плазмиды могут быть встроены в состав хромосомы, т. е. находиться в интегрированном состоянии, в этом случае они воспроизводятся вместе с хромосомой и передаются в ряду поколений.

Профаг - может служить моделью плазмиды, так как он способен существовать в автономном и интегрированном состоянии и не является обязательным генетическим элементом бактерий. С интегрированием профага в бактериальную хромосому и приобретением бактериями лизогенных свойств одновременно у бактерий могут появляться новые свойства, привнесенные фагом. Этот процесс называют лизогенной конверсией. Например дифтерийная палочка токсигенна лишь тогда, когда она лизогенна (токсигенная конверсия).

F-плазида, или половой фактор (фактор фертильности, плодовитости). Она контролирует синтез половых ворсинок с помощью которых устанавливается связь между F+ ("мужскими") и F- ("женскими") клетками, по которым происходит передача генов при конъюгативном процессе. При удалении F - плазмиды клетки теряют свойства доноров генов и приобретают свойства их реципиентов - превращение "мужской" особи в "женскую".

Процесс конъюгации обеспечивает бактериям возможность обмена генами, что служит одним из важных факторов приобретения селективных преимуществ в меняющихся условиях существования.

R-плазида (фактор лекарственной устойчивости) - определяет устойчивость бактерий к одному или многим лекарственным препаратам. Передача R-плазмид от одних бактерий к другим приводит к широкому распространению их не только среди патогенных, но и условно-патогенных бактерий благодаря тому, что их наличие дает селективные преимущества в условиях широкого

применения антибиотиков. У грамотрицательных бактерий передача R-плазмид может осуществляться при конъюгации, у грамположительных - чаще путем трансдукции (переноса с помощью умеренного фага).

Бактериоциногенные плазмиды (Col-плазмиды) контролируют синтез антибиотических веществ-бактериоцинов. Бактериоцины губительно действуют на бактерии того же вида или близких видов, не обладающих фактором бактериоциногенности. Бактериоцины обнаружены у многих бактерий: - кишечных бактерий (колицины), палочки чумы (пестицины), стафилококков (стафилоцины) и др. Если клетка продуцирует бактериоцин, она погибает, но образующиеся бактериоцины влияют на формирование микробных ассоциаций.

Изучение бактериоциногенности является одним из способов типирования бактерий, что дает возможность более надежно определять источники инфекции при эпидемиологическом анализе.

Транспозоны - представляют собой нуклеотидные последовательности, которые несут генетическую информацию, необходимую для транспозиции-перемещения внутри бактериальной хромосомы либо с хромосомы на плазмиды и наоборот, что приводит к мутациям.

Транспозоны не способны к самостоятельной репликации, они способны воспроизводиться только в составе хромосомы. Некоторые транспозоны, так же как и плазмиды выполняют регуляторную и кодирующую функции. В частности они могут нести информацию для синтеза бактериальных токсинов и ферментов.

Is-последовательности - представляют собой фрагменты ДНК, содержащие информацию только для транспозиции, перемещения в различные участки ДНК. При перемещении Is-последовательностей изменяется функционирование хромосомных генов - они могут инактивироваться, либо экспрессироваться, в них могут возникать мутации.

7. ФОРМЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИКРОБОВ

Изменчивость морфологических свойств (гетероморфизм) может наблюдаться при старении культуры и действии неблагоприятных факторов. Пример изменчивости тинкториальных свойств - окраска грамотрицательных гонококков при хронической гонорее грамположительно и др.

Изменчивость бактерий с изменением свойств наблюдается при S и R диссоциации. Она возникает в результате изменений в генотипе бактерий (например, интеграции профага) и характеризуется появлением двух типов колоний: гладких-S форм и шероховатых-R форм. Большинство бактерий вирулентно в S-форме, при

ВИДЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

По характеру меняющихся признаков	морфологических тинкториальных культуральных биохимических биологических серологических фаголизабельных бактериоциногенных чувствительности к лекарственным препаратам.
По диапазону изменчивости	внутривидовая ненаследственная внутривидовая наследственная видообразующая
По механизму изменчивости	мутационная: - спонтанные мутации; - индуцированные мутации; адаптивная: - модификация; - длительная модификация; комбинативная: - трансформация; - трансдукция, лизогенная конверсия; - конъюгация.

переходе в R-форму вирулентность снижается. Однако возбудители чумы, туляремии, сибирской язвы, туберкулеза, дифтерии и некоторые другие обычно вирулентны в R-форме.

Под действием пенициллина у некоторых бактерий наблюдается переход в L-форму, названную так в честь института им. Д.Листера, в котором они были открыты.

При переходе бактерий в L-форму они теряют способность образовывать клеточную стенку, превращаются в гигантские шары, которые как бы расшнуровываются на мелкие авизуальные фильтрующиеся формы.

L - формы играют важную роль в патологии человека, т. к. длительно сохраняются в организме.

Возможно изменение и других признаков, которые изучают при идентификации бактерий. Например, изменение биологических свойств имеет значение для получения вакцин, а изменение чувствительности к лекарственным препаратам играет важную роль при антибиотико - и химиотерапии.

СВОЙСТВА КЛЕТОК ИЗ S- И R-КОЛОНИЙ

S –тип	R-тип
Колонии гладкие, правильные, выпуклые	Колонии шероховатые, неровные, уплощенные
Колонии образуют дочерние узелки	Редко образуют дочерние узелки
У подвижных видов имеются жгутики	У подвижных видов жгутики могут отсутствовать
У капсульных видов хорошо виден слизистый слой	Капсулы отсутствуют
Биохимически более активен	Биохимически менее активен
У большинства патогенных видов вирулентная стадия	Слабо или совсем не вирулентная стадия
Обычно выделяется в остром периоде заболевания	Связан преимущественно с хроническими формами заболевания и носительством
Чувствителен к фагу	Менее чувствителен к фагу
Фагоцитируется слабо	Легко фагоцитируется

Мутационная, адаптивная и комбинативная формы изменчивости микроорганизмов.

Мутации - быстрые, ненаправленные, случайные изменения свойств, связанные с изменениями в генотипе. Их условно подразделяют на спонтанные и индуцированные.

Спонтанные мутации появляются под влиянием разнообразных причин: мутагенного фона излучения; ошибок в репликации нуклеиновых кислот; встраивания в бактериальную хромосому плазмид, транспозонов, Is- последовательностей и пр.

Индукцированные мутации возникают под влиянием мутагенных факторов (рентгеновского, гамма-, ультрафиолетового излучения). Мутагены не обладают специфичностью действия. Они мо-

гут вызывать мутационные изменения в разных генах с различными последствиями.

В результате мутаций изменяются различные свойства микроорганизмов, например, способность продуцировать определенные ферменты, чувствительность к лекарственным препаратам и пр.

Адаптивная изменчивость (модификационная) - это фенотипические изменения признаков микроорганизмов, не сопровождающиеся изменениями структуры генома и вскоре утрачивающиеся. Они являются приспособительными в ответ на меняющиеся условия внешней среды и обусловлены индукцией или репрессией соответствующих генов. Примером модификации может служить образование под влиянием пенициллина L-форм бактерий, способных реверсировать в исходную форму после прекращения действия пенициллина.

Модификационные изменения не наследуются, так как не связаны со структурным изменением генотипа.

Комбинативная форма изменчивости бактерий.

В отличие от эукариот, у которых в процессе полового размножения происходит взаимный обмен фрагментами хромосом "мужских" и "женских" половых клеток, у прокариот нет полового размножения. Однако генетический обмен с образованием рекомбинантных геномов между микроорганизмами возможен и необходим. Рекомбинация у прокариот возможна в результате внутригеномных перестроек, а также при проникновении в клетку-реципиент части ДНК клетки донора.

Комбинативная форма изменчивости является геномной, наследуется и может происходить при процессах трансформации, трансдукции (а также лизогенной конверсии) и конъюгации от клетки-донора к клетке-реципиенту. Таким образом, бактерия-реципиент получает небольшой фрагмент ДНК донора, обычно содержащий один ген. Этот фрагмент включается в структуру хромосомы реципиента, принося новый наследственный признак.

Процесс трансформации является важным механизмом межклеточного обмена у бактерий и служит для расширения адаптивных возможностей микроорганизмов.

Трансдукция - перенос наследственных признаков с помощью бактериофага. При репродукции фага в бактериальной клетке в момент сборки фаговых частиц в головку фага может проникнуть фрагмент ДНК бактерии-донора.

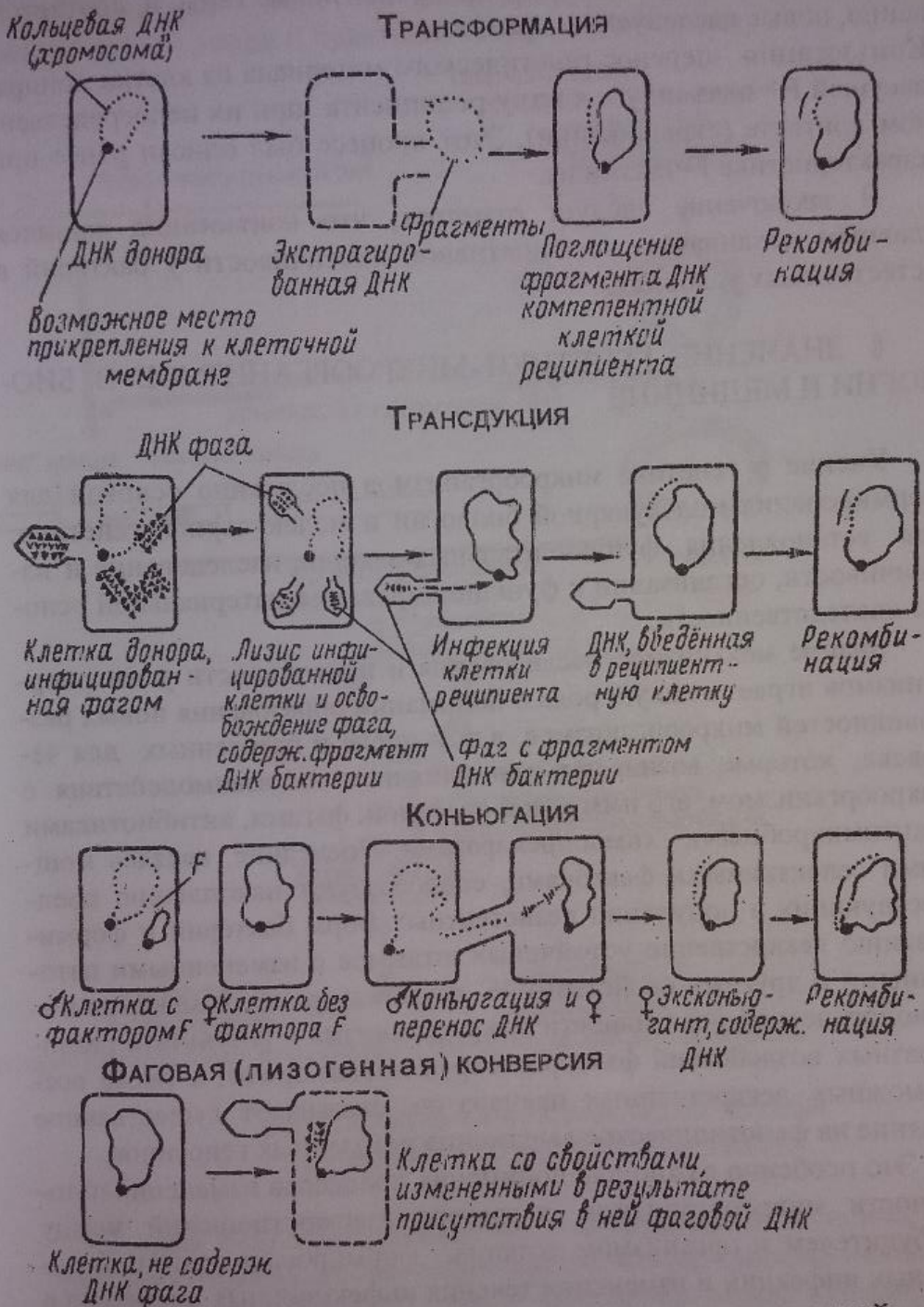


Рис. 22. СХЕМА ТИПОВ ПЕРЕДАЧИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У БАКТЕРИЙ

Трансформация - превращение одной разновидности бактерий в другую в результате непосредственной передачи фрагмента ДНК

Вследствие утраты части своего генома, фаг оказывается дефектным и при проникновении его в реципиентную клетку не происходит лизиса бактерий, но гены донора рекомбинируют с хромо-

сомой реципиента и последний получает новые гены, и, соответственно, новые наследуемые признаки.

Конъюгация - перенос генетического материала из клетки донора, несущей F+ плазмиду в клетку реципиента при их непосредственном контакте (скрещивании). Этот процесс был описан ранее при характеристике F-плазмиды.

В заключение следует отметить, что конъюгация является главным механизмом комбинативной изменчивости у бактерий в естественных условиях.

8. ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Учение о генетике микроорганизмов послужило основой для формирования молекулярной биологии и молекулярной генетики; для установления фундаментальных законов наследования и изменчивости, организации и функционирования материальной основы наследственности.

Знание механизмов наследования и изменчивости у микроорганизмов играет важную роль в понимании образования новых разновидностей микроорганизмов, в том числе и патогенных для человека, которые возникают под влиянием их взаимодействия с макроорганизмом, его иммунной системой, фагами, антибиотиками и антимикробными химиопрепаратами. Последние, являясь мощными селективными факторами, способствуют накоплению предшествующих в популяции резистентных форм бактерий и формированию лекарственно устойчивых штаммов с измененными патогенными и другими свойствами. С другой стороны, изменения иммунологической реактивности макроорганизма в результате разнообразных воздействий факторов окружающей среды, а также всевозможных лекарственных препаратов, оказывают существенное влияние на фенотипическое выражение патогенных генотипов.

Это особенно важно для понимания процессов изменения патогенности микроорганизмов, характера взаимоотношений между возбудителем и организмом хозяина, формирования внутрибольничных инфекций и изменения течения инфекционных процессов в современных условиях.

Важным практическим значением генетики микроорганизмов является использование ее закономерностей для получения новых вакцинных штаммов, штаммов продуцентов антибиотиков и других лекарственных препаратов из микроорганизмов.

Достижения генетики микроорганизмов позволили создать новый раздел науки и практики - генную инженерию.

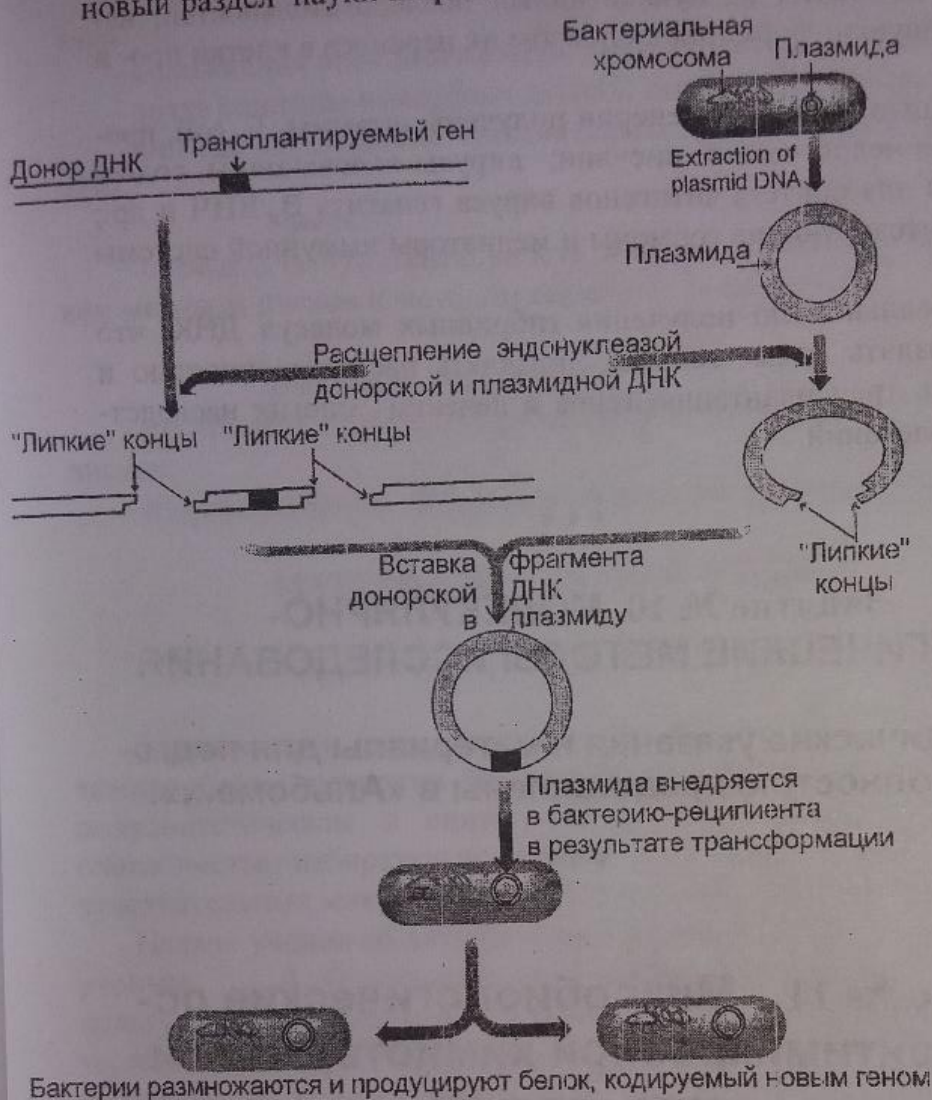


Рис. 23. ОБЩАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

Генная инженерия занимается конструированием новых генетических структур за счет искусственного комбинирования генов.

Созданные методом генной инженерии новые генетические структуры представляют собой рекомбинированные молекулы ДНК, которые включают два компонента: вектор (переносчик) и клонируемую "чужеродную" ДНК. В качестве вектора используют такие репликоны, как плазмиды, умеренные фаги, вирусы животных, имеющие циркулярную замкнутую структуру ДНК. Клонированная ДНК представляет фрагмент ДНК, несущий необходимый ген, контролирующий синтез нужного продукта.

Достижения генной инженерии позволяют создавать новые генетические элементы из нуклеотидных последовательностей, несущие заданную информацию; способы их переноса в клетки прокариот.

С помощью генной инженерии получены штаммы *E. coli*, продуцирующие человеческий инсулин; вирусы осповакцины, содержащие гены для синтеза антигенов вируса гепатита В, ВИЧ и др.; дрожжи, синтезирующие гормоны и медиаторы иммунной системы и др.

Стало реальностью получения гибридных молекул ДНК, что позволит создать новые геномы, управлять наследственностью и использовать трансплантацию генов в лечении многих наследственных заболеваний.

Занятие № 10. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методические указания и материалы для подготовки полностью представлены в «Альбоме...».

Занятие № 11. Микробиологические основы антимикробной химиотерапии и антисептики

Цель занятия:

Ознакомиться с учением об антибиотиках; с принципами классификации и основными механизмами ингибирующего действия антибиотиков на микробную клетку; с возможными осложнениями при антибиотикотерапии и принципами их профилактики. Иметь представление о механизмах формирования антибиотикорезистентных штаммов. Научиться методике определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

Студент должен:

Знать:

- определение понятия "антибиотики";
- источники получения антибиотиков;
- принципы классификации;

- механизмы формирования лекарственно-устойчивых штаммов;
- осложнения антибиотикотерапии и их профилактику;
- знать единицы измерения активности антибиотиков;
- методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

Уметь:

- определить чувствительность микроорганизмов к антибиотикам методом дисков и методом серийных разведений.

Овладеть навыками:

- постановки и учета антибиотикограммы методом стандартных дисков;
- выбора наиболее эффективных антибиотиков для терапии.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

1. АНТИБИОТИКИ, ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ

Антибиотики (от греческого *anti* - против, *bios* - жизнь) - антимикробные препараты биологического происхождения или их полусинтетические и синтетические производные, обладающие способностью избирательно подавлять развитие и вызывать гибель чувствительных микроорганизмов и опухолевых клеток.

Начало учения об антибиотиках положено в 1929 г. английским ученым А. Флемингом, показавшим, что фильтрат бульонной культуры плесневого гриба, *Penicillium notatum*, обладает антибактериальными свойствами. Очищенный препарат пенициллина для клинического использования получили английские исследователи Э. Чейн и Г. Флори в 1940 г. Советский микробиолог З. В. Ермольева применила для получения пенициллина другой вид плесени *Penicillium crustosum*, (1942) и явилась организатором производства пенициллина в СССР во время Отечественной войны. Успех клинического применения пенициллина послужил сигналом для поиска и получения новых антибиотиков во всех странах мира.

2. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ

Классификация антибиотиков может быть основана на различных принципах: по источнику получения, химическому составу, механизму и спектру антимикробного действия, способу получения. Чаще всего антибиотики классифицируют по: источнику получения, направленности ингибирующего действия, по механизму и спектру антимикробного действия.

Источником получения антибиотиков служат: разнообразные микроорганизмы, обладающие антимикробной активностью. Антибиотики выделяют из плесневых грибов (пенициллин и др.); актиномицетов (стрептомицин, тетрациклин и др.); бактерий (грамидин, полимиксин). Вещества, обладающие антибиотическим действием, получают также из высших растений (фитонциды); тканей животных и биосинтетическим путем.

По направленности ингибирующего действия различают: антибактериальные, противоопухолевые и другие антибиотики. По спектру антимикробного действия антибиотики могут обладать узким спектром действия (например, бензилпенициллин, цефалоспорины), оказывающие губительное действие только на гноеродные кокки, некоторые грамположительные бактерии и спирохелеворин и другие, действующие только в отношении некоторых грибов и простейших.

Антибиотики широкого спектра действия обладают антибактериальной активностью в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий, хламидий, микоплазм и др. К ним относятся: аминогликозиды, тетрациклины, левомицетин, макролиды и др.

Основное значение имеет классификация антибиотиков по механизму антимикробного действия.

Чувствительность микробов к антибиотикам связана с наличием в их составе "мишеней" - структур на которые антибиотики оказывают повреждающее действие. Такими мишенями могут быть клеточная стенка, особенно ее пептидогликан, цитоплазматическая мембрана и расположенные в ней ферменты, клеточные органеллы, генетические структуры. Кроме того антибиотики могут оказывать действие на отдельные этапы метаболизма - синтез белка, нуклеиновых кислот, липидов.

Важнейшие группы антибиотиков и "мишень" на которую направлено их ингибирующее действие, представлены в таблице 1.

В зависимости от важности "мишеней" для жизненных функций микроорганизмов и их обратимости антибиотики оказывают на чувствительные к ним бактерии бактериостатическое либо бактерицидное действие.

В первом случае речь идет о полном или частичном подавлении роста и размножения бактерий, во втором - об их гибели. Большинство антибиотиков (бензилпенициллин и его полусинтетические производные, все цефалоспорины, аминогликозиды, рифамицины) обладают бактерицидным действием. Некоторые антибиотики (левомицетин, тетрациклин, макролиды) оказывают на чувствитель-

ные к ним бактерии бактериостатическое действие. Характер действия зависит как от антибиотика, так и от его концентрации.

МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ВАЖНЕЙШИХ ГРУПП АНТИБИОТИКОВ НА МИКРОБНУЮ КЛЕТКУ

Антибиотики	“мишень”, на которую направлено ингибирующее действие
Пенициллины, цефалоспорины, циклосерин.	ингибирование синтеза клеточной стенки
Полиеновые антибиотики, полимиксины.	нарушение функций цитоплазматической мембраны
Аминогликозиды, тетрациклины, левомицетин, макролиды.	ингибирование синтеза белков на рибосомах
Рифамицины	ингибирование ДНК-зависимой РНК-полимеразы.

3. БАКТЕРИЦИДНОЕ И БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ. ЕДИНИЦЫ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ (ЕД; мкг)

Антимикробное действие антибиотиков ранее измеряли в единицах действия (ЕД), содержащихся в 1 мл. раствора препарата или в 1 мг. химически чистого вещества.

В настоящее время активность подавляющего большинства антибиотиков измеряется в микрограммах. 1 мкг. химически чистого препарата соответствует 1 ЕД.

4. ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ОТ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ. ПРИНЦИПЫ ПРОФИЛАКТИКИ ОСЛОЖНЕНИЙ

Наряду с терапевтическим эффектом, химическое применение антибиотиков нередко осложняется их прямым токсическим действием, развитием лекарственной аллергии, кандидомикозным дисбактериозом; угнетением иммунного ответа и переходом болезни в хроническую форму; появлением антибиотико-резистентных штаммов. Наиболее грозным осложнением является анафилактический шок.

Антибактериальные вещества могут вызывать нарушения генетического аппарата клеток макроорганизма, обуславливать хромосомные абберации, а некоторые из них обладают тератогенным

действием, приводящим к возникновению уродств плода при употреблении их в первые месяцы беременности.

Принципы профилактики осложнений.
Перед парентеральным введением антибиотиков ставят внутривенную пробу, чтобы исключить повышенную чувствительность организма к антибиотикам (во внутреннюю поверхность предплечья вводят 0,1 мл. антибиотика, наблюдают 20-30 минут). При положительной реакции, (диаметр папулы более 1 см., выраженная гиперемия, припухлость) назначение антибиотика отменяется.

Во избежание развития вторичных инфекций, кандидомикоза назначают нистатин и другие полиеновые антибиотики, а для профилактики дисбактериоза - колибактерин, бифидумбактерин, бификол и другие эубиотики (лекарственные средства, содержащие в качестве действующего вещества определенные штаммы представителей микрофлоры здорового организма человека.).

При необходимости длительного применения антибиотиков проводят комбинированное лечение с использованием новых антибиотических препаратов к которым еще не сформировалась устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний.

Необходимо рациональное применение, дозирование антибиотиков, а также правильный выбор их с учетом чувствительности возбудителей к данному антибиотику. Считается целесообразным не назначать антибиотикотерапию при легких формах дизентерии, колиэнтеритах и других заболеваниях, а также с профилактической целью при хирургических вмешательствах и т. п.

5. МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ АНТИБИОТИКО-УСТОЙЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам может быть связана, главным образом, со следующими причинами:

1. превращением активной формы антибиотика в неактивную путем ферментативной инактивации и модификации;
2. утратой проницаемости клеточной стенки для определенного антибиотика;
3. нарушениями в системе специфического транспорта данного препарата в бактериальную клетку;
4. возникновением у микроорганизмов альтернативного пути образования жизненно важного метаболита, заменяющего основной путь, блокированный препаратом.

По генетическим механизмам лекарственная устойчивость бактерий может быть первичной (естественная устойчивость, обусловленная отсутствием "мишени" для действия антибиотика (например, у микоплазм к пенициллину из-за отсутствия клеточной стен-

ки) и приобретенной, возникающей в результате мутаций в хромосомных генах, контролирующих синтез компонентов клеточной стенки, рибосом или транспортных белков. Такого рода мутации делают бактериальную клетку неуязвимой для определенного антибиотика в связи с изменением "мишени". Чаше всего приобретенная устойчивость возникает в результате переноса R плазмиды, контролирующей множественную устойчивость бактерий, к 2-м, 3-м и более антибиотикам (например, возникновение множественной лекарственной устойчивости). Гораздо реже приобретенная устойчивость может быть обусловлена приобретением хромосомных генов резистентности путем конъюгации, трансдукции или трансформации. Наряду с подавлением процессов жизнедеятельности микробных клеток, антибиотики, являясь мощными селективными агентами, способствуют формированию лекарственно устойчивых бактерий путем селекции.

Массовой селекции и распространению антибиотикорезистентных бактерий способствует бесконтрольное и нерациональное применение антибиотиков для лечения и особенно для профилактики различных инфекционных заболеваний без достаточных к тому оснований.

В связи с широким распространением антибиотикорезистентных бактерий и возможными осложнениями при антибиотикотерапии, выбор препарата для лечения определенного больного зависит от чувствительности к тому или иному антибиотику микроорганизма, выделенного от больного.



Рис. 24. СХЕМА ПОСТАНОВКИ АНТИБИОТИКОГРАММЫ

6. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ (МЕТОД СТАНДАРТНЫХ ДИСКОВ И МЕТОД СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ)

Метод стандартных дисков.

Для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом стандартных дисков исследуемую культуру засевают газоном на питательный агар в чашке Петри: на поверхность агара наносят 1-2 мл. испытуемой культуры, равномерно распределяют ее по поверхности среды, подсушивают. Стерильным пинцетом накладывают на расстоянии 2 см друг от друга и от краев чашки стандартные диски, пропитанные различными антибиотиками. Стандартные индикаторные диски готовятся в производственных условиях с точным содержанием антибиотика. Диски готовятся из фильтровальной бумаги и имеют маркировку - отпечатанный с двух сторон код антибиотика. В настоящее время используют только неокрашенные диски. Инкубируют при 37 °С в течение суток.

О чувствительности культуры к соответствующим антибиотикам судят по величине диаметра зоны задержки роста бактерий вокруг диска (табл. 1). Интерпретацию результатов чувствительности культуры к различным антибиотикам проводят по пограничным значениям диаметров зон задержки роста, приведенным в табл. 2. В том случае, если диски пропитаны разными концентрациями одного и того же антибиотика, можно установить наименьшую дозу препарата, к которой чувствительна исследуемая бактериальная культура.

Для сокращения объема работы по определению чувствительности микроорганизмов методом дисков ВОЗ предлагает использовать класс-диски, содержащие один из антибиотиков, близкий по спектру группы. С этой же целью инструкцией 1983 г. допускается предварительное испытание чувствительности микроорганизмов к антибиотикам проводить путем прямого посева патологического материала, а не чистой культуры.

Для получения количественных результатов по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и по определению минимальной дозы антибиотика, ингибирующей рост исследуемой культуры бактерий, используют методы серийных разведений в жидкой или плотной питательной среде.

Метод серийных разведений более чувствителен и точен, чем метод индикаторных дисков.

Бактериостатическую дозу определяют по наименьшей концентрации антибиотика, в присутствии которой и обнаруживается видимый рост бактерий.

Активность антибиотиков выражают в ЕД/мл или мкг/мл.

Метод серийных разведений в жидкой питательной среде (техника постановки)

Готовят основной раствор, содержащий определенную концентрацию антибиотика в мкг/мл или ЕД/мл.

Затем в 12 стерильных пробирок разливают по 1 мл питательного бульона; в 1-ю вносят 1 мл основного раствора антибиотика, содержащего, например, 32 ЕД в 1 мл и методом перекачки делают ряд последовательных разведений до 10-й пробирки, из которой 1 мл удаляют, т. о. в 1-й пробирке будет 16 ЕД, во 2-й - 8 и т. д. Содержимое 11-й пробирки - служит контролем роста бактерий, а 12-й - контролем стерильности питательной среды.

Во все пробирки, кроме 12-ой, вносят по 0,1 мл испытуемой культуры. Посев инкубируют при 37 °С в течение суток и регистрируют помутнение питательной среды, сравнивая с контрольной культурой.

Учет результатов проводят при наличии роста в контроле культуры и отсутствии роста в контроле питательной среды.

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) - концентрация антибиотика, при которой полностью подавляется размножение микроорганизмов.

МПК выражается в мкг/мл или ЕД/мл.

В настоящее время существуют автоматизированные методы определения лекарственной чувствительности микроорганизмов, позволяющие в течение 5-6 часов получать точные результаты в отношении большого набора лекарственных препаратов.

Занятие № 12. УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель занятия:

Изучить формы симбиоза, основные положения учения об инфекции и инфекционном процессе, инфекционной болезни, возбудителе инфекционного заболевания, познакомиться с методами изучения свойств микроорганизма-возбудителя и биологическим методом исследования.

Студент должен:

Знать: определение понятий «инфекция», «инфекционный процесс», «инфекционное заболевание», «патогенность», вирулентность»;

- определение единиц измерения вирулентности микроорганизмов и активности токсинов;

Уметь: - технику заражения лабораторных животных

густоту бактериальной взвеси по стандарту мутности, определить

- заразить лабораторных животных бактериальной взвесью

внутрибрюшинно.

Навыки:- приготовления, фиксации, окраски мазков по Граму; микроскопия мазков.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. ФОРМЫ СИМБИОЗА

Взаимоотношение между различными организмами выражается в своеобразных формах, объединенных под общим названием симбиоз (сожительство). К этим формам относятся:

- **Комменсализм.** Некоторые микроорганизмы являются постоянными обитателями макроорганизма, они живут за счет организма, не причиняя ему вреда:

- **Мутуализм** - форма взаимоотношений, при которой различные микроорганизмы извлекают взаимные выгоды. Например, в макроорганизме кишечные палочки питаются остатками пищи, а продуцируемые некоторыми их представителями витамины используются макроорганизмом.

- **Паразитизм** - состояние симбиоза, при котором один организм живет за счет другого и наносит ему вред, вызывая различные формы инфекции.

2. ИНФЕКЦИЯ, ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

Инфекция - внедрение и размножение патогенного микроорганизма в восприимчивом макроорганизме.

Инфекция (инфекционный процесс) - это эволюционно сложившаяся форма взаимодействия патогенного микроорганизма с восприимчивым макроорганизмом в определенных условиях внешней и социальной среды, крайней степенью которого является инфекционная болезнь.

степень проявления инфекционного процесса, характеризующаяся определенными клиническими симптомами.

Инфекционная болезнь характеризуется, в отличие от неинфекционных заболеваний, следующими признаками: она вызывается живым микроорганизмом-возбудителем, заразительна, т.е. способна передаваться от больных к здоровым, имеет скрытый, инкубационный, период и приводит к иммунологическим сдвигам в организме, развитию иммунитета и аллергии.

Процессы, вызванные простейшими и гельминтами принято называть не инфекциями, а инвазиями.

3. ФАКТОРЫ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Для возникновения и развития инфекционного процесса необходимо участие трех факторов:

- микроорганизма-возбудителя
- восприимчивого макроорганизма
- условий внешней и социальной среды.

Возбудитель инфекционного заболевания - микроорганизм, вызывающий это заболевание. В данном случае понятие возбудителя рассматривается применительно к этиологии (причине) инфекционного заболевания. Поэтому говорят: возбудителем брюшного тифа является *Salmonella typhi*.

Учение о возбудителях инфекционных болезней развивалось после работ Л.Пастера в XIX веке. В то время приобрела популярность триада Генле-Коха, согласно которой микроорганизм может признаваться возбудителем инфекционного заболевания, если:

- 1) он обнаруживается во всех случаях этого заболевания и не встречается у здоровых лиц;
- 2) он выделен в чистой культуре из организма больного;
- 3) чистая культура этого микроорганизма вызывает у восприимчивых животных сходное заболевание с болезнью человека.

В свое время эта триада сыграла важную роль в развитии микробиологии и учения об инфекционных заболеваниях, но в настоящее время ни один из названных постулатов триады не может считаться абсолютно необходимым для признания этиологической

причастности микроорганизма: мы знаем о распространенности «здорового» микробносительства, не все возбудители выделены нами в чистой культуре, не для всякого микроорганизма-возбудителя можно выбрать восприимчивое животное.

При диагностике инфекционных заболеваний мы всегда стремимся определить возбудителя - это микроорганизм, вызвавший заболевание у этого больного. Необходимо подчеркнуть, что возбудитель - это не просто патогенный микроорганизм, обнаруженный в организме, а микроорганизм, вызвавший заболевание. А это не всегда одно и то же. При заболевании, вызванном одним возбудителем, может обнаруживаться «здоровое» носительство патогенно-патогенного стафилококка может заболеть не стафилококковой пневмонией, а крупозной, вызванной пневмококком. В этом случае его возбудителем пневмонии повлечет ошибочное назначение антибактериальной терапии без учета чувствительности истинного возбудителя к лекарственным препаратам.

Возбудителем болезни могут быть патогенные, условно-патогенные, а иногда - и непатогенные микроорганизмы.

Патогенные микроорганизмы в первую очередь являются возбудителями заболеваний. Патогенные микроорганизмы - это микроорганизмы, способные вызывать инфекционный процесс. Часть из них вызывают инфекционные, заразные, болезни, а часть - заболевания, не считающиеся инфекционными.

Условно-патогенные микроорганизмы - микроорганизмы, способные вызывать заболевание только при определенных условиях. Они чаще всего являются естественными обитателями организма человека и вызывают заболевания при резком снижении общей и местной невосприимчивости организма.

Непатогенные (апатогенные) микроорганизмы - сапрофитические микроорганизмы, которые, как правило, неспособны вызывать заболевания. В настоящее время все чаще наше представление о принадлежности микроорганизмов к этим группам меняется. Нередки случаи, когда микроорганизмы, считавшиеся ранее апатогенными, вызывают заболевания. Это бывает, например, при слабости защитных сил макроорганизма - у иммунодефицитов.

Имеет значение также доза проникших в организм микробов. Количество микроорганизмов, способных вызвать инфекционное заболевание, называется «**инфицирующей дозой**».

Второй существенный фактор инфекционного процесса - **восприимчивый макроорганизм**.

Прежде всего, имеет значение биологический вид макроорганизма. Возбудитель, патогенный для животных, может быть непатогенным для человека и наоборот. Играет существенную роль возраст - восприимчивость человека к ряду инфекционных болезней меняется с возрастом. Состояние макроорганизма (сопутствующие болезни, голодание, облучение, гиповитаминоз и др.) также отражается на возможности возникновения и характере течения инфекции. Более подробно об участии макроорганизма в инфекционном процессе мы будем говорить при изучении иммунологии.

Третий фактор инфекционного процесса - условия внешней и социальной среды, в которых происходит взаимодействие микроорганизма-возбудителя и восприимчивого макроорганизма.

Влияние внешней среды проявляется в сезонности некоторых инфекционных болезней (острые респираторные заболевания - в зимний период, кишечные инфекции, а также некоторые инфекции, передающиеся кровососущими насекомыми - в летне-осенний, и др.). Сезонность заболеваемости связана с возможностью реализации путей передачи инфекции, а также с изменением восприимчивости людей к возбудителям. Роль внешней среды проявляется и в различном географическом распространении ряда инфекционных заболеваний, что связано как с климатическими особенностями, так и с распространением насекомых-переносчиков и возможностью сохранения резервуара инфекции.

Роль социальной среды проявляется в различной распространенности ряда инфекционных болезней в странах с разным уровнем экономического и социального развития. Условия труда и быта, экономический статус населения, религиозные и бытовые особенности населения, развитие системы государственного здравоохранения и его роль в профилактике заболеваемости весьма важны как для уровня распространения, так и характера течения инфекционных заболеваний. Многие заболевания, редко встречающиеся в экономически развитых странах с эффективной системой здравоохранения, продолжают быть частыми в развивающихся странах.

4. ПАТОГЕННОСТЬ. ВИРУЛЕНТНОСТЬ. ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Патогенность - потенциальная способность определенных микроорганизмов вызывать инфекционный процесс. Это - генотипический признак, обусловленный соответствующим набором генов, контролирующих синтез микроорганизмом биологически активных веществ, обуславливающих проявление его патогенных свойств в восприимчивом организме. Патогенность характеризуется специфичностью, т.е. способностью вызывать типичные для этого вида микроорганизмов патологические изменения в организме

при естественных способах заражения. Этим определяется клиническая картина инфекционных заболеваний, которая позволяет врачу ставить предварительный диагноз на основании характерных клинических симптомов болезни.

Вирулентность - количественная мера патогенности данного штамма микроорганизма. Это - фенотипическое проявление патогенного генотипа, вирулентность обусловлена степенью образования факторов, обуславливающих участие патогенного микроорганизма в инфекционном процессе. Вирулентность может быть выражена условно принятыми единицами - Dlm, Dcl, Ld₅₀. Dlm (Dosis letalis minima) - минимальная смертельная доза, которая вызывает гибель 95 % зараженных животных. Dcl (Dosis certa letalis) вызывает гибель 100 % зараженных животных. Ld₅₀ вызывает гибель 50 % зараженных животных, так как на графике зависимости процента гибели животных от логарифма дозы в зоне 50 % гибели отмечается прямая пропорциональная зависимость, позволяющая математически точно рассчитать эту дозу по результатам эксперимента. Ld₅₀ используется также в фармакологии и токсикологии для оценки токсичности лекарственных препаратов и других веществ.

Вирулентность может широко варьировать у разных штаммов одного вида микроорганизмов, что обусловлено разной выраженностью у них факторов вирулентности. Факторы вирулентности - это структурные и физиологические факторы микроорганизма, обеспечивающие ему возможность быть возбудителем инфекционного процесса. А для этого ему необходимо после попадания в макроорганизм:

- прикрепиться к эпителию входных ворот - быть адгезивным;
- внедриться в ткани организма - обладать инвазионностью;
- размножиться и распространиться по организму, сопротивляясь его защитным силам - быть агрессивным;
- вызвать повреждение организма, чтобы обеспечить возможность своего размножения в нем - быть токсичным.

Соответственно факторами вирулентности являются адгезивность, инвазивность, агрессивность и токсичность.

Адгезивность (прилипчивость) обеспечивается не столько физико-химическими процессами прилипания за счет гидрофильно-гидрофобных взаимодействий поверхностей микроорганизмов и клеток макроорганизма, сколько специфическим взаимодействием специальных группировок на их поверхности. У микроорганизма эти реагирующие группировки называются адгезинами, у клеток макроорганизма - рецепторами. Между ними происходит комплексное взаимодействие, обеспечивающее специфичность адгезии. Поэтому и наблюдается тропизм определенных видов возбу-

телей к определенным тканям макроорганизма. Адгезины грамотрицательных бактерий - это белки, связанные с ворсинками (пилями) на поверхности бактериальных клеток. У грамположительных бактерий адгезины представлены комплексами белков и липотейхоевых кислот в клеточной стенке (подчеркнем, что различия между Gr^+ и Gr^- бактериями - проявляются во многих существенных биологических свойствах).

Рецепторы клеток разделяют на нативные (всегда располагаются на поверхности эпителиальных клеток и взаимодействуют с адгезинами бактерий), индуцированные (появляются в результате репродукции вируса в клетках, в результате чего, например, при гриппе на поверхности инфицированных клеток появляется вирусный гемагглютинин, служащий рецептором для стафилококка и других бактерий дыхательных путей) и приобретенные (появляются иногда и состоят из иммуноглобулинов и других белков, которые образуют своеобразные «мостики» между адгезинами бактерий и клетками макроорганизма).

Мы подробно останавливаемся на адгезивности с учетом того, что в большинстве доступных Вам учебников этому вопросу внимание практически не уделяется. В то же время, именно этот этап, этап адгезии, является начальным при любом инфекционном процессе, определяющим исход взаимодействия возбудителя с организмом. Мы должны стремиться блокировать вирулентные свойства возбудителя именно на этом этапе, чтобы предупредить развитие инфекционного процесса.

Прикрепившийся микроб-возбудитель далее должен внедриться в организм, то есть проникнуть через слизистые и соединительно-тканые барьеры в подлежащие ткани. Такое проникновение называют инвазией.

Инвазионность возбудителя обеспечивается продукцией ферментов, разрушающих подлежащие ткани.

Как известно, вездесущая соединительная ткань состоит из клеток, волокон и межклеточного вещества. Многие патогенные микроорганизмы продуцируют протеазы, расщепляющие межклеточные связи, нуклеазы, повреждающие ядра клеток, лецитиназу, действующую на оболочки клеток. Продукция **нейраминидазы** позволяет многим бактериям проникать внутрь клеток. Многие патогенные бактерии образуют **коллагеназу** и **эластазу**, расщепляющие волокна соединительной ткани. Продукция **гиалуронидазы**, расщепляющей гиалуроновую кислоту основного вещества соединительной ткани, повышает проницаемость тканей организма для возбудителя. Инвазионность (инвазивность) является одним из проявлений агрессивности микроорганизма.

Агрессивность возбудителя обеспечивает ему способность преодолевать защитные барьеры организма, прежде всего - фагоцитирование нейтрофилами и макрофагами. К таким факторам относятся образование капсулы, полисахаридные и протеиновые компоненты которой делают микроорганизм резистентным к фагоцитозу и действию комплемента. В клеточной стенке могут содержаться вещества, препятствующие фагоцитозу - протеин А стафилококка, протеин М стрептококка, липополисахариды энтеробактерий. Протеин А стафилококка, например, связывает иммуноглобулины (антитела), что делает их неспособными активировать фагоцитоз.

Ранее полагали, что некоторые микроорганизмы продуцируют специальные вещества - **агрессины**, называвшиеся веществами Байля, которые подавляли фагоцитоз, не обладая самостоятельной токсичностью. По-видимому, речь может идти о комплексе бактериальных экзопродуктов, обладающих антифагоцитарным действием.

При проникновении микроорганизмов через раневую поверхность значительную роль играет воспалительная реакция макроорганизма с выделением фибринозной пленки, препятствующей внедрению возбудителя. Многие бактерии продуцируют **фибринолизин**, расщепляющий эту пленку. С другой стороны, продукция стафилококком **плазмокоагулазы** приводит к быстрому образованию фибринозной капсулы вокруг микроорганизмов, что обеспечивает им защиту от фагоцитоза и гуморальных факторов резистентности макроорганизма до тех пор, пока размножившиеся микробы с помощью фибринолизина не расщепляют фибринозную пленку и не выходят в ткани.

Токсичность микроорганизмов-возбудителей обуславливается образованием ядовитых веществ - токсинов.

5. ТОКСИНЫ БАКТЕРИЙ. ТОКСИГЕННЫЕ БАКТЕРИИ

Токсины бактерий - это ядовитые продукты жизнедеятельности и распада бактерий.

В настоящее время разработана классификация бактериальных токсинов на группы по механизму их действия и прочности связи с бактериальной клеткой. Соответственно токсины (экзотоксины) делят на цитотоксины, мембранотоксины, функциональные блокаторы, а также эксфолиатины и эритрогенины. Однако вряд ли целесообразно подробно рассматривать токсин каждого микроорганизма в таком направлении, детализация учения о токсинах более уместна при рассмотрении вирулентных свойств конкретного возбудителя и патогенеза вызываемой им инфекции в курсе специальной медицинской микробиологии. С точки зрения понимания общих особенностей токсического действия бактериальных продуктов при-

менительно к изучению общих вопросов инфекции и иммунитета достаточно, по нашему мнению, ограничиться традиционным делением токсинов на экзотоксины и эндотоксины.

Экзотоксины - белковые токсины, которые более или менее легко диффундируют из бактериальной клетки, накапливаясь в культуральной среде и поступая в ткани и жидкости макроорганизма.

Эндотоксины - прочно связаны с бактериальной клеткой и выделяются только при их распаде.

В таблице приведены основные отличительные признаки экзотоксинов.

Токсигенные бактерии - бактерии, продуцирующие экзотоксины. Эндотоксичность присуща всем патогенным бактериям. В качестве примера токсигенных бактерий следует назвать палочки дифтерии, столбняка, ботулизма, газовой анаэробной инфекции, стафилококк, холерный вибрион и др.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ

Экзотоксины (белковые) токсины	Эндотоксины
Белки, некоторые обладают свойствами ферментов и получены в кристаллическом состоянии	Глюцидо-липидно-отеиновые комплексы
Продуцируются бактериями наружу	Прочно связаны с телом бактерий и выделяются при их распаде
Высокотоксичны, характеризуются избирательностью действия	Менее токсичны, токсическое действие разных эндотоксинов практически не различается
Термолабильны	Термостабильны
Переходят в анатоксины под действием формалина	Под действием формалина в анатоксины не переходят
Полностью нейтрализуются антителами-антитоксинами	Нейтрализация антителами неполная

6. СПОСОБЫ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕННОСТИ

Для определения свойств, которые могут характеризовать патогенность некоторых микробов, могут быть использованы опыты на экспериментальных животных.

В ряде случаев мы можем лишь косвенно судить о патогенных свойствах микрорганализма (особенно — если он непатогенен для

лабораторных животных) по наличию у него факторов вирулентности.

Токсигенность в последнее время чаще определяют при помощи реакции преципитации в геле (будет изучена на последующих занятиях). При сомнительных случаях прибегают к опытам на животных. Для этого ставят пробы с внутрикожным или подкожным введением материала.

Изучают также продукцию ферментов вирулентности — плазмскоагулазы, фибринолизина, гиалуронидазы, лецитиназы, нуклеазыи др.

7. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Обычно используются мыши, крысы, морские свинки, кролики. Могут использоваться хомяки, хлопковые крысы, собаки, кошки, обезьяны, крупный и мелкий рогатый скот (овцы, козы, телята), лошади, свиньи и т. д.

Заражение лабораторных животных.

Этот метод применяют с целью воспроизведения заболевания или идентификации выделенной культуры, определения вирулентности, токсигенности исследуемой культуры, контроля безвредности, стерильности и т. д. Выбор лабораторных животных основывается на знании чувствительности отдельных видов животных к микроорганизмам.

Так, кролики чувствительны к стафилококкам, стрептококкам, пневмококкам, возбудителям туберкулеза, сибирской язвы, столбняка, ботулизма, сифилиса; морские свинки - к возбудителям туберкулеза, дифтерии, бруцеллеза, туляремии, столбняка, ботулизма; белые мыши - пневмококкам, некоторым видам сальмонелл, возбудителям сибирской язвы, туляремии, ботулизма, бешенства, арбовирусам, столбняка; белые крысы — к возбудителям бешенства, токсоплазмоза и др.; хомячки сирийские — к возбудителям бруцеллеза, полиомиелита, бешенства, лейшманиоза, токсоплазмоза и др.

Лабораторные животные воспроизводятся и содержатся в вивариях, условия их содержания строго регламентируются. Для получения воспроизводимых и надежных результатов стараются работать с животными чистых линий. Чистые линии получают путем близкородственного скрещивания (инбридинг), в результате которого все животные одной линии имеют одинаковый генотип и одинаково реагируют на различные воздействия. Примером таких линий могут быть крысы линии «Wistar», мыши линий «Balb» и др.

8. МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ВЗВЕСИ

Взвесь бактерий готовят из 18-20 часовых культур микроорганизмов. В пробирку с культурой, выросшей на скошенном мясо-пептонном агаре, наливают 3-5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия и встряхивают для получения суспензии бактерий. Суспензию переносят в стерильную пробирку и определяют ее густоту. Для этого к 0,2 мл полученной взвеси нужно добавить изотонический раствор NaCl в таком количестве, чтобы оптическая плотность взвеси визуально сравнялась с оптической плотностью стандарта, и рассчитать густоту взвеси.

ПРИМЕР РАСЧЕТА: к 0,2 мл взвеси добавлено 2,2 мл. Общий объем - 2,4 мл. Следовательно, в 0,2 мл маточной взвеси содержалось 2,4 млрд микробных тел, так как в 1 мл оптического стандарта находится 1 млрд микробных тел. Пропорция:

0,2 мл исходной взвеси - 2,4 млрд

1 мл - х млрд

$$x = (2,4 \times 1) : 0,2 = 12 \text{ млрд/мл.}$$

8. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологический метод исследования в микробиологии заключается в заражении лабораторных животных микроорганизмами или их токсинами.

Биологический метод исследования применяется для:

- моделирования инфекционного процесса с целью изучить этиологию, патогенез заболевания, разработать методы профилактики, диагностики и лечения;
- изучения вирулентности и патогенности выделенных штаммов микроорганизмов и определения их смертельной дозы;
- изучения токсигенности выделенных штаммов и определения активности токсинов;
- постановки реакции биологической нейтрализации для титрования лечебных и профилактических иммунных сывороток, а также выявления в сыворотках людей антител к токсинам и возбудителям с целью диагностики;
- выделения чистых культур некоторых микроорганизмов путем заражения лабораторных животных исследуемым материалом (при этом сопутствующие непатогенные микроорганизмы погибают, а патогенный микроорганизм вызывает инфекционный процесс у животного, что дает возможность выделить чистую культуру возбудителя путем посева материала от зараженного животного на питательные среды);

культивирования некоторых микроорганизмов (клетей, хламидий, простейших) и вирусов - «культура в логической пробы (биопробы).

Биологический метод диагностики (биопроба) - диагностика заболевания путем выявления возбудителя или его токсина при введении исследуемого материала лабораторным животным с помощью диагностической развивающейся инфекции или интоксикации у животного, нередко - с одновременной постановкой реакции биологической нейтрализации для идентификации вида и серотипа возбудителя и его токсина.

Этот метод диагностики применяется в настоящее время относительно редко. Он имеет ограничения, связанные с тем, что далеко не все возбудители заболеваний у человека патогенны для животных, а определение в организме человека бактериальных токсинов таким методом ограничивается необходимостью высокого содержания токсина. Обычно биопроба используется при диагностике чумы, туляремии, ботулизма, сальмонеллезов и является дополнительным методом прямого выявления возбудителя в организме больного. Биологический метод диагностики обычно дает результат в течение одних или более суток.

При биологическом исследовании в опыт берут здоровых и стандартизированных по породе, массе, полу, возрасту животных. В большинстве случаев животное заражают исследуемым материалом или выделенной чистой культурой. Перед заражением операционное поле обрабатывают спиртом, йодом. Материал можно вводить накожно, подкожно, внутривожно, внутримышечно, внутривенно, внутрибрюшинно, интрацеребрально, перорально, интраназально, ингаляционно др.

Подкожное введение материала производят кроликам, морским свинкам на животе, а мышам - на спине. На месте инъекции обрабатывают шерсть, и материал вводят стерильным шприцем.

Внутрикожное введение требует более тщательной обработки кожи. Кожу в виде складки захватывают 2 пальцами и иглу вводят почти параллельно поверхности кожи. Внутрикожно обычно вводят не более 0,1-0,2 мл.

Внутримышечное введение обычно проводят в мышцы бедра. Кролику можно ввести от 1,0 до 8 мл, морской свинке и крысе до 4 мл, мышам - 0,2 мл.

Внутривенное введение кроликам проводят в краевую ушную вену. Белым мышам и крысам внутривенные введения проводят в вены хвоста.

При внутрибрюшинном введении следует обращать внимание на то, чтобы не повредить внутренних органов. Поэтому инъекции

делают в нижнюю половину живота, держа животное в наклонном положении. Кроликам можно ввести до 30-40 мл, морской свинке до 15 мл, белой мыши до 1 мл.

Пероральное введение проводится после предварительного инфицирования пищи, либо путем закапывания животному материала в рот.

Интраназальное введение проводят под легким эфирным наркозом. Дают животному подышать с ваты, смоченной эфиром, и затем капают в ноздри 1-2 капли заразного материала.

Ингаляционное введение проводят в специальных ингаляционных камерах.

Зараженных животных маркируют, содержат с соблюдением санитарно-противоэпидемических правил и наблюдают в течение соответствующего срока.

* * *

Занятие № 13. УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРУПОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Знать: основные звенья эпидемического процесса, понятие о патогенезе инфекции, динамике инфекционного процесса, знать технику бактериологического исследования трупов лабораторных животных.

Уметь: вскрыть труп лабораторного животного, сделать посе-вы крови и органов на питательную среду. Приготовить препара-ты-опечатки органов.

Навыки: окраска мазков-отпечатков по Граму, микроскопия.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. ДИНАМИКА ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

В развитии инфекционного процесса принято выделять 4 пе-риода.

Инкубационный период - время от проникновения возбу-дителя до первых клинических проявлений заболевания. Продолжи-тельность этого периода зависит в первую очередь от биологи-ческого вида возбудителя. Например, при гриппе инкубационный пе-риод короткий - от 12 до 72 часов, при лепре он может растягивать-ся на несколько лет. Кроме того, продолжительность инкубацион-ного периода зависит от вирулентности возбудителя, количества проникшего возбудителя, входных ворот, состояния макроorganiz-

ма. При большинстве инфекционных заболеваний инкубационный период в среднем равен 2-м неделям.

Продромальный период - период предвестников заболевания, когда появляются первые, часто неопределенные симптомы болезни. При многих инфекционных заболеваниях наблюдаются почти одинаковые явления, к которым нередко относят повышение температуры, головные боли, понижение или отсутствие аппетита, общее недомогание, слабость и др. Лишь при некоторых заболеваниях (корь) в продроме наблюдаются характерные признаки.

Период разгара болезни - период основных клинических проявлений заболевания.

Начало заболевания может иметь различный характер. Это связано не только со свойствами микроорганизма, но и с реактивным состоянием макроорганизма, его специфическими и неспецифическими защитными свойствами. В соответствии с этими особенностями начало болезни может быть внезапное, в редких случаях молниеносное, острое с прогрессивным развитием клинических явлений. В других случаях начало заболевания может быть медленным, без особых внешних проявлений.

В период разгара болезни наблюдается лихорадка, иногда появляются высыпания различного характера на коже и слизистых, изменения со стороны крови, нарушения со стороны центральной и периферической нервной системы. Подъем температуры имеет непосредственную связь с проникновением в кровь пирогенных веществ микробного или тканевого характера. При некоторых бактериальных и вирусных заболеваниях (брюшной тиф, корь) наблюдается состояние бактериемии и вирусемии, что обуславливает также появление высокой температуры. Понижение температуры связано с прекращением поступления антигенов и продуктов тканевого лизиса в кровеносную систему и действием формирующихся антибактериальных и противовирусных веществ.

Исход болезни - период окончания инфекционного процесса. Исходы могут быть разными: реконвалесценция (выздоровление), летальный исход (смерть), хронизация процесса (переход в хроническое заболевание), переход в здоровое микробоносительство (сохранение в организме, размножение и выделение возбудителя из организма при отсутствии клинических проявлений заболевания).

Инфекция может проявляться в разных формах. Классификация форм инфекции сложна и недостаточно определена. Приводим упрощенную, но вполне достаточную для изучения студентами классификацию форм инфекции.

2. ФОРМЫ ИНФЕКЦИИ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

ФОРМЫ ИНФЕКЦИИ

Признак	Формы инфекции
Природа возбудителя	бактериальная, вирусная, грибковая, протозойная
Происхождение	экзогенная, эндогенная, аутоинфекция
Локализация возбудителя в организме хозяина	местная (очаговая), общая (генерализованная): бактериемия, септицемия (сепсис), септикопиемия, токсико-септический шок, вирусемия
Число видов возбудителя	моноинфекция, смешанная инфекция, вторичная инфекция
Повторные заболевания	реинфекция, суперинфекция, рецидив
Клинические проявления	острая, хроническая, микробоносительство, манифестная, бессимптомная
Основной источник инфекции: человек животное внешняя среда	антропонозы зоонозы сапронозы

Мы разделяем инфекции по биологическому виду возбудителя, так как это накладывает отпечаток на патогенез, клинику, диагностику, лечение и профилактику инфекционного заболевания. Например, при лечении бактериальных инфекций широко используют антибиотики, которые при вирусных заболеваниях неэффективны.

Экзогенная инфекция развивается в результате заражения микроорганизмами извне, эндогенная - вызывается микроорганизмами, находившимися в организме до заболевания. Конечно, и в последнем случае микроорганизм поступил когда-то в организм человека извне, но в данный момент нельзя и бессмысленно отыскать источник инфекции. При экзогенной инфекции всегда есть источник инфекции, который необходимо найти и обезвредить при проведении противоэпидемических мероприятий. Эндогенная инфекция может вызываться условно-патогенными

микроорганизмами нормальной микрофлоры при иммунодефиците, но аутоинфекция может быть вызвана и безусловно патогенным микроорганизмом, который находится в организме при микробоносительстве. Примером такой инфекции могут быть рецидивы

разных заболеваний - герпеса, рожистого воспаления. Аутоинфекция - разновидность эндогенной инфекции, при которой происходит самозаражение путем переноса возбудителя из одного места локализации в другое.

Местная, очаговая инфекция характеризуется локализацией патологических изменений в местном очаге без распространения по организму (фурункул). При общей, генерализованной инфекции возбудитель распространяется по организму с развитием микробемии. Выше мы разбирали формы инфекции, связанные с нахождением возбудителя в крови. Следует лишь добавить, что при массовом поступлении микроорганизмов, продуктов их распада и токсинов в кровь развивается бактериальный токсико-септический шок.

Моноинфекция - инфекция, вызванная одним видом возбудителя, смешанная (ассоциированная) инфекция - несколькими видами, например - газовая анаэробная инфекция вызывается, чаще всего, ассоциацией *Cl. perfringens*, *Cl. novyi*, *Cl. septicum* между собой и с условно-патогенными и апатогенными микробами-ассоциантами. Смешанные инфекции (миксты) протекают тяжелее и труднее поддаются лечению, чем моноинфекции.

Вторичные инфекции - инфекции, присоединяющиеся к основному заболеванию, которое создает условия для развития вторичной инфекции. В этом случае нельзя говорить о смешанной инфекции, так как последняя развивается при одновременном инфицировании, а вторичная инфекция обусловлена основным заболеванием. Классический пример - грипп, при котором наблюдается "двугорбая лихорадка": вначале клинические проявления и высокая температура обусловлены вирусным поражением, к третьему дню температура снижается. Затем, вследствие местного и общего ослабления резистентности организма, присоединяется вторичная бактериальная инфекция за счет активирования условно-патогенной микрофлоры дыхательных путей. Это приводит к повторному повышению температуры с развитием катаральных симптомов.

Реинфекция - повторное заболевание после клинического выздоровления, вызванное тем же видом возбудителя. Реинфекция возможна, если перенесенное заболевание не оставляет после себя напряженного иммунитета. Примером могут служить повторные заболевания гонореей, которая практически не вызывает развитие постинфекционной невосприимчивости. Суперинфекция возникает при инфицировании тем же видом возбудителя (более вирулентным, иного серовара) при незаконченном первом заболевании. Это имеет особое значение для выздоравливающих, которые могут инфицироваться от других больных в палате (скарлатина). Рецидив -

возврат заболевания без повторного заражения, за счет микроорганизмов, оставшихся после перенесенного заболевания. Классический пример - рецидивные формы сыпного тифа (болезнь Брилля), развивающиеся через несколько лет после выздоровления.

Острая и хроническая инфекции характеризуются выраженностью симптомов и длительностью заболевания, это клиническая характеристика болезни. При хронической инфекции наблюдается **персистенция**, т.е. длительное пребывание возбудителя в макроорганизме. **Бессимптомная** или **инаппарантная** инфекция характеризуется отсутствием клинических проявлений, но возбудитель не только находится в организме, но и размножается и распространяется по организму. Инаппарантные формы инфекции выявляются при обследовании контактных лиц. Такая форма инфекции может закончиться выздоровлением или переходом в **манифестную** острую или хроническую инфекцию.

Микробоносительство (здоровое) - нахождение возбудителя в организме с его размножением и выделением в окружающую среду без клинических проявлений заболевания. Оно может быть: а) при бессимптомной инфекции; б) после клинического выздоровления, когда человек уже клинически здоров, но еще выделяет возбудителя; в) в конце инкубационного периода некоторых заболеваний, когда человек еще клинически здоров, но уже является источником инфекции.

Существенным является классификация инфекций в зависимости от источника инфекции. Источник инфекции - объект, из которого возбудитель поступает в организм человека. Существует три возможных источника инфекции, соответственно которым выделяются формы инфекции. **Антропонозы** - заболевания при которых основным источником инфекции является человек (больной и микробоноситель). Примером могут быть брюшной тиф, грипп и др. **Зоонозы** - заболевания при которых основным источником инфекции является животное (больное и микробоноситель), а передача инфекции от человека к человеку хотя и возможна, но может не играть существенной эпидемиологической роли. Примеры - бруцеллез, туляремия, сибирская язва и др.

Сапронозы - заболевания, при которых источником инфекции являются объекты внешней среды. Следует различать сапронозы и инфекции, при которых объекты внешней среды являются факторами передачи инфекции. Например, при дизентерии факторами передачи могут быть вода, овощи, фрукты и т.п. Но источником инфекции при дизентерии является только человек, из организма больного или носителя возбудитель дизентерии попадает в окружающую среду, но в ней не размножится и не сохраняется длительное время. При сапронозе возбудитель находится во внешней

среде, там размножается и попадает в организм человека. Примером может служить болезнь легионеров, при которой возбудитель может размножаться в воде (кондиционера, душа), грунте, а передача инфекции от больного к здоровым не установлена. По-видимому, в дальнейшем мы будем обнаруживать сапронозный характер все большего числа инфекционных заболеваний. Например, обнаружена возможность размножения во внешней среде возбудителя холеры.

3. ПАТОГЕНЕЗ ИНФЕКЦИИ

Патогенез инфекции - механизм развития инфекционного процесса.

При рассмотрении вопросов патогенеза мы должны иметь в виду оба фактора инфекционного процесса - судьбу микроорганизма-возбудителя и изменения со стороны макроорганизма, вызванные повреждающим действием возбудителя ответной реакцией организма.

Соответственно необходимо выделять **входные ворота** инфекции, **пути распространения** возбудителя по организму, **место окончательной локализации**, механизмы повреждающего действия возбудителя и его продуктов жизнедеятельности и распада на организм, **пути выделения** возбудителя из организма.

Возбудитель проникает в восприимчивый макроорганизм через **входные ворота**. Ими могут быть кожа (поврежденная) и слизистые оболочки дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, мочевыводящих путей, плацента. Далее он распространяется по макроорганизму разными путями: **гематогенным** (по крови), **лимфогенным** (по лимфатической системе), **нейрогенным** (по периневральным влагалищам), **по физиологическим путям** (по ходу пищеварительного, дыхательного тракта и т.п.), **по протяжению** (проникая в подлежащие ткани).

В связи с распространением микроорганизма по крови возникают состояния, называемые **бактериемией** (микробемией), **септициемией** и **септикопиемией**. **Бактериемия** - циркуляция бактерий в крови без их размножения. Возбудитель следует к месту своей окончательной локализации в органах и тканях. При **септициемии** происходит размножение микроорганизмов в крови, при **септикопиемии** одновременно с размножением микробов наблюдаются метастазы гнойных очагов в тканях организма. Наконец, клиницисты выделяют еще **сепсис** - нахождение микробов в крови на фоне резкого снижения защитных сил организма. При сепсисе специфичность возбудителя отходит на задний план, клиническая картина при разной этиологии сепсиса практически одинакова. Термины

“сепсис” и “септицемия” обозначают одно и то же состояние, но термин “сепсис” носит более клинический, а “септицемия” - патогенетический характер.

Окончательная локализация возбудителя в организме зависит от вида микроорганизма-возбудителя, его тропности к отдельным органам и тканям. Некоторые возбудители размножаются преимущественно во входных воротах (при дифтерии, столбняке и др.), другие - локализуются во внутренних органах, в которые проникают в основном гематогенным и лимфогенным путем (при брюшном тифе, гепатитах, сифилисе и др.).

Повреждающее действие возбудителя может быть связано преимущественно с продукцией им экзотоксинов (дифтерия, столбняк, ботулизм, холера, некоторые формы дизентерии и др.). В этом случае говорят о **токсикоинфекции**, при которой происходит размножение возбудителя в организме, но основной симптомокомплекс связан с действием токсина.

При других инфекциях возбудитель не продуцирует типичного экзотоксина, повреждающее действие возбудителя связано, главным образом, с размножением его в тканях, токсическом действии эндотоксинов, выделяющихся при распаде микроорганизмов, образованием факторов вирулентности. Это - заболевания, которые носят характер типичной **инфекции** (брюшной тиф, бруцеллез, лептоспироз, протозойные, большинство вирусных инфекций и др.).

В патогенез инфекционного заболевания необходимо включать патологоанатомические, патофизиологические и клинические изменения в организме, развивающиеся в результате инфекционного процесса. На данном этапе изучения инфекций мы лишь в общих чертах можем останавливаться на основных клинических симптомах заболеваний, выделяя лишь наиболее характерные - сыпь различного характера (пятнистая, папулезная, везикулезная, пустулезная, геморрагическая), повышение температуры, нарушения деятельности желудочно-кишечного тракта (рвота, диарея и др.), печени (желтуха), почек, нервной системы и др.

Нужно также рассматривать иммунную перестройку организма - развитие постинфекционного **иммунитета** (напряженный, стойкий, стерильный, кратковременный, слабый, отсутствие иммунитета) и **инфекционной аллергии**.

Для характеристики патогенеза заболевания важно рассматривать течение периодов инфекционного заболевания, форму проявления инфекции и возможные исходы его.

Выделение возбудителя из организма может происходить с калом, мочой, мокротой, гнойным отделяемым.

Выделение микробов из организма может наблюдаться на протяжении конца инкубационного периода, продромы, периодов раз-

гара и реконвалесценции, что обеспечивает длительный период заразительности. инфекционного больного.

Целесообразно более широко толковать патогенез заболевания, включая в него не только взаимодействие возбудителя и макроорганизма, но и процессы, приводящие к попаданию возбудителя в организм человека. Таким образом, рассматривать надо не только патогенез болезни, а и механизм распространения заболевания среди населения, патогенез процесса на популяционном уровне.

Знание патогенеза инфекционного заболевания важно для решения вопросов его профилактики, лечения и диагностики.

Для примера без особой детализации рассмотрим патогенез дифтерии, актуальной в настоящее время инфекции. Источник и резервуар инфекции - человек, больной и носитель. Основной путь передачи возбудителя, *Corynebacterium diphtheriae*, - воздушно-капельный. Дополнительный путь - контактно-бытовой, через предметы обихода (игрушки, посуду т.п.), через третьих лиц. Входные ворота - слизистая зева, носа, конъюнктивы глаза, половых органов у девочек, редко - ухо и рана. На месте внедрения возбудителя после инкубационного периода в 5-10 дней развивается местный воспалительный процесс - дифтеритическое воспаление. Возбудитель развивается в месте первичной локализации, распространяясь по протяжению в нижележащие ткани за счет продукции ферментов (гиалуронидазы, нейраминидазы, фибринолизина) и вызывая воспалительные изменения и отек, которые могут приводить к развитию дифтерийного крупа, удушья, вследствие закупорки дыхательных путей.

Дифтерию рассматривают как токсикоинфекционное заболевание. Основное звено патогенеза дифтерии - интоксикация дифтерийным экзотоксином. Дифтерийный экзотоксин оказывает не только местное, но и общее действие на организм, так как происходит его всасывание в кровь. Дифтерийный экзотоксин является гистотоксином, поражает многие ткани организма, но наиболее наглядно проявляется три основные точки приложения его в организме: миокард (развивается токсический дифтерийный миокардит), мозговой слой надпочечников (снижается кровяное давление и развиваются ортостатические гемодинамические нарушения вследствие падения тонуса сосудов из-за подавления образования адреналина), центральная нервная система (возникают параличи мягкого неба, конечностей). Возбудитель дифтерии в крови не обнаруживается, наблюдается токсинемия. Выделяется возбудитель преимущественно с мокротой, при разговоре, кашле, чихании. Поскольку в патогенезе дифтерии ведущее место занимает интоксикация экзотоксином, а антитоксин нейтрализует действие токсина в организме, при лечении дифтерии применяется противодифтерийная анти-

токсическая сыворотка, а для профилактики используется дифтерийный анатоксин. Основным методом диагностики дифтерии является бактериологический - выделение и идентификация чистой культуры пленки, образующейся в результате развития дифтеритического воспаления во входных воротах инфекции (слизистой зева, носа и др.).

4. ПОНЯТИЕ ОБ ЭПИДЕМИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ

Эпидемический процесс - процесс распространения инфекционного заболевания среди населения.

Эпидемическая цепочка, обеспечивающая распространение заболевания, включает три звена: источник и резервуар инфекции, механизм передачи и восприимчивое население.

Источник инфекции - объект, из которого возбудитель поступает в организм человека (ранее мы останавливались подробно на возможных источниках инфекции). **Резервуар инфекции** - место сохранения и размножения возбудителя не только во время эпидемии, но и в межэпидемический период. Резервуаром инфекции для антропонозов является только человек, для зоонозов - в основном животное, для сапронозов - внешняя среда.

Механизм передачи включает пути передачи и факторы передачи. По предложению академика Л.В. Громашевского инфекционных заболеваний классифицируют по основным путям передачи:

- кишечные инфекции (фекально-оральный путь передачи);
- инфекции дыхательных путей (воздушно-капельный);
- кровяные инфекции (трансмиссивный);
- инфекции кожи (контактный);
- инфекции с разными (многими) путями передачи.

В каждой из названных групп выделяют также антропонозы и зоонозы.

К карантинным (особо опасным, инфекциям, на которые распространяются Международные медико-санитарные правила) относят в настоящее время натуральную оспу (заболевание полностью ликвидировано), чуму, холеру и желтую лихорадку.

Факторами передачи могут быть вода, пища, воздух, почва, грязные руки, предметы обихода. При трансмиссивных инфекциях фактором передачи является кровососущее насекомое - переносчик.

По характеру распространения инфекционные заболевания могут быть **спорадическими** (отдельные случаи заболевания, наблюдающиеся в местности), **эпидемиями** (значительное превышение обычно наблюдающейся в этой местности спорадической заболеваемости). **Пандемии** - эпидемия, распространяющаяся на значи-

тельные территории, несколько стран и даже континентов. Эндемии - заболевания, характерные для определенной территории, где климатические, экологические и социальные условия обеспечивают поддержание заболеваемости.

Летальность - процент умерших от числа заболевших этой инфекционной болезнью (показатель тяжести последствий заболевания), смертность - число умерших на 100 000 населения (указывает не только на тяжесть болезни, но и на ее распространенность).

5. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРУПА ЛАБОРАТОРНОГО ЖИВОТНОГО

Вскрытие экспериментального животного (мышь).

Инструменты стерилизуются кипячением. Труп животного брюшком вверх фиксируют на лотке с застывшим парафином. Шерсть и кожу животного в области разреза обрабатывают спиртом, спиртовым раствором йода и снова спиртом, после чего спирт поджигают. Скальпелем (ножницами) делают продольный разрез кожи от нижней челюсти до лобка, а затем в стороны конечностей. После этого отсепааровывают кожу и изучают строение подкожной клетчатки, лимфатических узлов.

Далее вскрывают грудную полость, для чего пинцетом приподнимают грудину за мечевидный отросток, рассекают диафрагму и с помощью ножниц отсекают грудину с участком ребер, таким образом, чтобы стали доступны легкие и сердце. Раскаленным пинцетом (либо пипеткой) прижимают стенку сердца (сердце фиксируется с помощью другого пинцета) и кончиком стерильной пастеровской пипетки прокалывают стенку сердца. Кровь сеют на глюкозный МПБ. Изучают состояние легких, обращают внимание на наличие в плевральной полости экссудата.

С помощью пинцета приподнимают брюшную стенку и делают на ней надрез, после чего вскрывают брюшную полость.

Изучают состояние внутренних органов брюшной полости, наличие в ней экссудата. Печень, селезенку, почки извлекают и помещают в стерильную чашку Петри для последующего микроскопического исследования.

Делают посев кусочков селезенки, печени и почки на глюкозный МПБ для выделения чистой культуры возбудителя.

Готовят мазки-отпечатки из печени, легких, лимфатических узлов. Фиксируют мазки, окрашивают и микроскопируют. Составляют протокол вскрытия.

Трупы животных после вскрытия сжигают, инструменты дезинфицируют, стерилизуют.

* * *

Занятие № 14. УЧЕНИЕ ОБ ИММУНИТЕТЕ. ВИДЫ ИММУНИТЕТА. НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ. ИММУННАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА. АНТИГЕНЫ. АНТИТЕЛА

Цель занятия:

Ознакомиться с развитием и современным состоянием учения об иммунитете, понятиями "иммунитет", "антиген", "антитело", видами иммунитета, неспецифическими факторами защиты организма, иммунной системой организма.

Студент должен:

Знать:

Определение понятий, классификацию иммунитета, формы иммунитета, основные факторы неспецифической защиты организма, свойствами антигена, антигенной структурой бактерий и организма человека.

Уметь:

Учесть результаты бактериологического исследования трупа лабораторного животного.

Овладеть навыками:

Вскрытия и производства бактериологического исследования трупов лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

1. ПОНЯТИЯ "ИММУНИТЕТ", "АНТИГЕН"-"АНТИТЕЛО".

Иммунитет - способ защиты организма от живых тел и веществ, несущих на себе признаки генетической чужеродности.

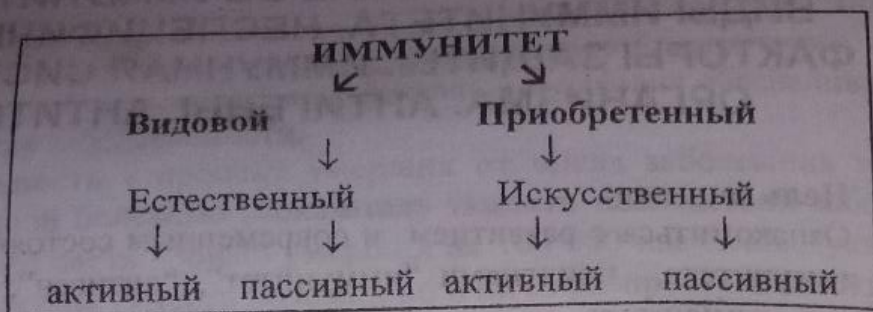
Антиген - вещество или живое тело с признаками генетической чужеродности, способное вызвать в организме иммунологические реакции (синтез антител, гиперчувствительность немедленного и замедленного типов, иммунологическую память, иммунологическую толерантность, идиотип - антиидиотипические взаимодействия).

Антитело - белок-иммуноглобулин, вырабатываемый в ответ на антиген и способный специфически взаимодействовать с антигеном.

2. ФОРМЫ ИММУНИТЕТА

Они классифицируются по происхождению, направленности и механизму.

а) по происхождению различают видовой и приобретенный иммунитет:



Естественный активный иммунитет вырабатывается организмом в процессе инфекционных заболеваний, его продолжительность от 1 года, 3-5-10 лет до пожизненного иммунитета, в зависимости от заболевания.

Искусственный активный иммунитет получают в результате проведения предохранительных прививок (вакцинации), его продолжительность от 0,5 года, 1-3-5 лет до 15 лет (прививка против желтой лихорадки).

Естественный пассивный иммунитет передается от матери своему ребенку через плаценту, длится 6 месяцев, плюс период кормления грудью. С грудным молоком мать может передать ребенку те антитела, которые у нее есть, выработанные ею в процессе инфекционных заболеваний, либо вакцинации.

Искусственный пассивный иммунитет создается введением в организм больного антител, полученные другим организмом (человеком или животным), в результате иммунизации, его продолжительность 3-4 недели. При введении иммунных сывороток: гомо- (человеческих) и гетеро- (животных), в организм вводятся чужие, генетически чужеродные альбумины, альфа-, бета-, гамма-глобулины (иммуноглобулины), которые для данного организма являются чужеродными антигенами и заставят организм защищаться выработкой антител против введенных сывороток. Через 2-3 недели (пик антител) чужеродная сыворотка будет выведена из организма, следовательно будет окончен искусственный пассивный иммунитет. Но при этом антитела против гетерогенных сывороток останутся на всю жизнь, поэтому повторное введение одной и той же гетерогенной сыворотки опасно, может возникнуть анафилактический шок, сывороточная болезнь.

б) По направленности иммунитет может быть антибактериальный, антивирусный, антипаразитарный, антигрибковый, анти-токсический, противоопухолевый, трансплантационный, их называют в зависимости от вида возбудителей инфекционных заболеваний либо их функциональной направленности.

Важно обратить внимание на факт, что каждая из этих форм специфического иммунитета имеет свое значение и обуславливает-

ся определенным комплексом из стандартных иммунологических механизмов.

Антимикробный иммунитет направлен против микробной клетки или вирусной частицы. В процессе эволюции защитных реакций организма развивалась способность создавать защиту не только против микробов, но и против их токсинов. Токсины обезвреживаются при нейтрализации антителами-антитоксинами. **Антитоксический иммунитет** направлен против бактериальных экзотоксинов.

Можно лишь добавить, что антиинфекционный иммунитет может быть стерильным и нестерильным.

Стерильный иммунитет - это форма иммунитета, при которой организм полностью свободен от возбудителя. Примером может служить иммунитет после кори, натуральной оспы, коклюша, холеры и др. заболеваний.

Нестерильный (инфекционный) иммунитет - иммунитет к суперинфекции (повторная инфекция тем же самым возбудителем при условии незаконченности ранее развившегося заболевания). Нестерильный иммунитет имеет место при туберкулезе, бруцеллезе и других хронических заболеваниях и отражает особенности взаимосвязи между организмом хозяина и паразитом и особенности иммунологической реактивности. При многих хронических заболеваниях возможно в течение длительного времени одновременное наличие в организме и возбудителя, и относительного иммунитета к повторному инфицированию или обострению существующей инфекции.

в) **Формы иммунитета по механизму.**

По механизму различают клеточный, гуморальный и функциональный иммунитет.

Клеточная, или тканевая, форма защиты - включает неспецифические клеточные защитные механизмы, связанные с фагоцитозом, барьерной функцией кожи, слизистых, лимфоузлов и других тканей.

Специфические клеточные факторы - специализированные клетки лимфоидной системы (различные субпопуляции эффекторных антигенреактивных Т-лимфоцитов). Эти клетки способны соединиться с клетками, на поверхности которых имеются чужеродные антигены и убивать их.

Специфические факторы гуморальной защиты - антитела, иммуноглобулины, продукты В-системы.

Функциональная форма защиты - совокупность физиологических процессов, направленных на поддержание постоянства внутренней среды организма, при нарушении его из-за действия мик-

роорганизмов и других патогенных факторов. Важную роль играет адаптивный синдром Г.Селье (будет изучаться студентами позже), увеличение температуры тела (из-за увеличения интенсивности метаболических процессов, термоинактивация некоторых возбудителей вирусной природы, повышения активности фагоцитоза и функции системы иммунитета), увеличение выделительной функции дыхательного тракта, желудочно-кишечного тракта, почек.

3. ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ

В таблице представлены основные факторы защиты организма.

ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА

Неспецифические факторы защиты	Иммунная реактивность
Непроницаемость покровов Бактерицидность покровов Пищеварительные соки Гидролитические ферменты Лизоцим Пропердин Бета-лизины, X-лизины, туберкулостатический фактор, интерферон, С-реактивный протеин и др.	1. Синтез антител 2. Гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ) 3. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) 4. Иммунологическая память 5. Иммунологическая толерантность 6. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия
комплемент фагоцитоз	Принимают участие как в неспецифической защите, так и в иммунной реактивности

В таблице перечислены далеко не все, а только основные факторы защиты организма, принимающие участие в иммунитете. Все шесть форм иммунного ответа будут разобраны подробно на следующих лекциях. Мы должны остановиться еще на одном важном вопросе - о соотношении неспецифических факторов защиты и иммунологической реактивности. В приведенной ниже таблице представлены факторы защиты организма от инфекционного начала.

Мы должны четко понимать, что невосприимчивость к инфекционным заболеваниям, как и функция иммунологического надзора над генетическим постоянством собственных клеток организма

обеспечивается сочетанным действием специфических и неспецифических факторов защиты организма, т.е. механизмами иммунологической реактивности и механизмами неспецифической резистентности.

Иммунологическая реактивность выражается в специфическом ответе организма на антиген. Вы должны сразу понять это главное положение в иммунологии - **специфичность иммунного ответа**. Оно означает, что антитело или антигенреактивная клетка, сформированные в организме в ответ на определенный антиген, могут реагировать только с этим антигеном. Это - закон, который неуклонно соблюдается (о возможных отклонениях мы поговорим позднее).

Неспецифические факторы защиты - неспецифичны по отношению к антигенам, они в равной мере направлены против разных веществ и клеток, различия зависят от химического состава клеток и способности их противостоять действию факторов резистентности организма.

Неспецифические факторы защиты - первый барьер на пути возбудителя. Обычно этот барьер непреодолим для непатогенных микроорганизмов, патогенные микробы его преодолевают. Тогда включаются иммунологические механизмы. Однако, их включение происходит позднее, когда возбудитель уже вызывает повреждение в организме, иногда такое запаздывание оказывается фатальным.

Кроме того, сами по себе иммунологические механизмы обычно не обеспечивают уничтожения и выведения из организма патогенного микроба-возбудителя. Роль иммунных механизмов чаще всего сводится к распознаванию "чужого" и "метке" его для механизмов неспецифической защиты - фагоцитоза и комплемента. Мы уже говорили о роли антител в активации фагоцитоза и комплемента. Таким образом, роль иммунных механизмов часто выражается в активировании неспецифических защитных механизмов, которые, собственно, и обеспечивают уничтожение инфекционного агента либо чужеродных клеток. Конечно, участие иммунных механизмов в защите сложнее и глубже.

В связи со сказанным необходимо внести ясность в терминологию. По мнению академика Р.В.Петрова, ведущего иммунолога стран СНГ, нельзя говорить о "неспецифическом иммунитете", следует употреблять термин "неспецифическая резистентность", "неспецифическая защита", "естественная невосприимчивость", "видовая невосприимчивость". Употребление термина "иммунитет", "иммунологический" говорит о специфическом процессе.

По-видимому, с этим можно согласиться, но при этом нужно понимать, что оба механизма, специфический и неспецифический, взаимосвязаны и направлены, каждый по-своему, на решение зада-

чи надзора над генетическим постоянством внутренней среды организма.

4. ИММУННАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА

Иммунная система организма, как и каждая система организма имеет центральные и периферические органы.

Центральными органами иммунной системы являются тимус (центральный орган Т-системы) и костный мозг (мы принимаем костный мозг за центральный орган В-системы).

Периферическими органами являются лимфоузлы, селезенка, скопления лимфоидной ткани в кишечнике и других органах. Центральные и периферические органы связаны между собой и с тканями организма лимфо- и кровотоком.

Иммунная система является лимфоидно-макрофагальной системой клеток, она состоит из системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), Т- и В-систем лимфоидной ткани. Студенты должны получить знания по этим вопросам в курсе гистологии, поэтому мы не рассматриваем строение иммунной системы в деталях.

Особенности иммунной системы:

1. Постоянная рециркуляция клеток из центральных в периферические органы, затем в ткани и снова в кровоток обеспечивает управление клетками иммунной системы. Благодаря рециркуляции осуществляется непрерывный контроль над всеми тканями организма со стороны клеток иммунной системы, которые обладают различной компетентностью. Каждая клетка иммунной системы изначально может реагировать только с ограниченным числом антигенов, поэтому для контроля над всеми антигенами организма необходимо участие всех иммунокомпетентных клеток. Это достигается непрерывной рециркуляцией многих клеток иммунной системы в организме, в результате чего клетки с различными свойствами проходят через все участки организма и осуществляют жизненно важные иммунологические реакции.

2. Постоянная репопуляция клеток, что обеспечивает осуществление функций иммунологического надзора молодыми функционально полноценными клетками и возможность гибкого ответа на меняющуюся антигенную ситуацию.

Клетки иммунной системы происходят из одной общей стволовой клетки и в результате дифференцировки превращаются в эффекторные клетки, которые способны выполнять специфические иммунологические функции. Клетка, прошедшая через определенную стадию дифференцировки, не может возвратиться к начальной полипотентной стадии. В то же время, недифференцированные клетки способны дифференцироваться в любом направлении, что обеспечивает в результате непрерывной репопуляции способность

иммунной системы к иммунному ответу на любой антиген, появляющийся в организме.

5. АНТИГЕНЫ. ГАПТЕНЫ. ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА

Антиген - вещество или существо с признаками генетической чужеродности, способное вызывать в организме иммунологические реакции (синтез антител, развитие гиперчувствительности немедленного типа, гиперчувствительности замедленного типа, иммунологической памяти, иммунологической толерантности, идиотип-антиидиотипические взаимодействия). Полноценные антигены (белки, полисахариды, липополисахариды, глико- и липопротеиды) обычно способны не только вызывать синтез антител, но и реагировать с ними в видимых реакциях.

Необходимое условие антигенности - способность нести признаки генетически чужеродной информации. Для белков - определяемая генетически первичная структура. Для липидов и полисахаридов - опосредованная связь с генами через комплекс ферментов, синтезирующих эти вещества.

Термин «антиген» относится к веществам, способным вызывать иммунный ответ или реагировать с антителами широко используется иммунологами. Согласно функциональной классификации антигены разделяются на вещества, способные вызывать иммунный ответ самостоятельно, которые называются **иммуногенами**, и молекулы, которые способны лишь реагировать с антителами, но не способны напрямую стимулировать их продукцию. Последние, чаще всего низкомолекулярные вещества, называются **гаптенами**.

Гаптены - неполноценные антигены, которые могут реагировать и соединяться с антителами, но не способны самостоятельно вызывать синтез АТ, например - антибиотики. Гаптены приобретают способность стимулировать продукцию антител в соединении с полноценным антигеном (эти крупные молекулы называются носителем, по-немецки - *Schlepper*) или в результате полимеризации. Ее в соединении с полным антигеном Гаптены липоидной природы приобретают антигенные свойства в смеси с белками, либо в химической связи, углеводы - только в химической связи) или в результате полимеризации. Гаптен образует на молекуле носителя специфическую группу, которая распознается иммунной системой и вызывает продукцию антител.

Гаптены могут быть преципитирующими и неprecипитирующими (их называли полугаптенами и определяли по ингибированию реакции преципитации).

Некоторые гаптены (протоантигены) могут соединяться в организме с белками, приобретая антигенные свойства: тяжелые метал-

лы - никель, хром, платина; пенициллин, стрептомицин, анилин, эфирные масла (примулин), динитрофторбензол. Следует подчеркнуть, что полноценный антиген имеет две функции антигена - вызывать выработку антител и реагировать с ними в специфических реакциях. Гаптен лишен первой функции - самостоятельно вызывать иммунный ответ.

6. СВОЙСТВА АНТИГЕНОВ

Чужеродность (генетическая). Чем дальше филогенетически тем выше антигенность для вида. Белки-антигены с одинаковой биологической функцией различаются меньше, чем вещества с разными функциями. Условие генетической чужеродности - не абсолютно, так как существуют аутоантигены, антигены собственных тканей. Они содержатся в «забарьерных органах» (хрусталик глаза, ткани половых органов, мозга и др.), которые изолированы от иммунной системы барьером и в норме содержат аутоантигенные вещества. При травме антигены поступают из забарьерных органов в кровь и имеет место аутоагрессия иммунной системы, которая является разрушающим действием аутоантител и аутоенсиблизированных клеток на ткани собственного организма.

На остальные собственные антигены иммунная система реагирует, но реагирует специальной формой иммунного ответа - иммунологической толерантностью - не вообще отсутствием ответа, а контролируемым ответом на собственные антигены. Иммунная система реагирует формированием антител и антигенреактивных лимфоцитов, которые являются специфичными для их собственных антигенов, в пороговых количествах. Это - одна из форм регуляции функций органов и тканей организма и, следовательно, условие чужеродности не абсолютно, имеются существенные исключения из правила чужеродности антигена как необходимого условия для проявления антигенных свойств.

2. Достаточная молекулярная масса. Для белков необходимо более 10000 дальтон. Молекулярная масса необходима для эффективного включения клеток иммунной системы в иммуногенез путем связывания нескольких клеточных рецепторов. При использовании стимуляторов удается получать антитела к веществам с меньшей молекулярной массой: к инсулину (6 кДа), к глюкагону (3,8 кДа), к вазопрессину (1 кДа).

Для полисахаридов - сотни тысяч дальтон. Даже низкомолекулярные вещества в соединении с полноценным антигеном, который называют шлеппером, проявляют свои антигенные свойства.

Антигенность - способность вызывать иммунный ответ. Зависит от молекулярной структуры (жесткость молекулы, обусловленная ароматическими аминокислотами). Желатин - высокомолекулярен, но содержит преимущественно алифатические аминокислоты и малоантигенен. Введение в молекулу желатина ароматических аминокислот повышает его антигенность. Сывороточный альбумин менее антигенен, чем сывороточный гамма-глобулин, это зависит от различий в молекулярной массе и структуры этих белков.

Иммуногенность - для характеристики микробных антигенов, входящих в вакцинные препараты. Протективные антигены, обеспечивающие создание эффективного иммунитета. Необходимо, чтобы вакцины содержали протективные антигены. Например, взвесь *Corynebacterium diphtheriae* обладает выраженными антигенными, но низкими иммуногенными свойствами, и введение такой взвеси не вызывает развития иммунитета к дифтерии. В то же время, обезвреженный формальдегидом дифтерийный токсин (анатоксин, токсид), также не являющийся высокоантигенным, обладает выраженными иммуногенными свойствами.

Бактерии образуют антигены, которые являются протективными (защитными) антигенами, которые создают эффективный иммунитет. Поэтому необходимо, чтобы вакцины содержали протективные антигены соответствующих возбудителей.

Специфичность, обусловленная антигенными детерминантами молекулы антигена. Благодаря специфичности мы можем говорить об уникальности антигена, отличиях одного антигена от других. Специфичность антигена проявляется в способности вызывать синтез строго специфичных антител и в способности специфично реагировать с антителами к этому антигену.

Антигенная детерминанта (иначе - эпитоп) - это участок молекулы антигена, определяющий специфичность антигена, его отличие от других антигенов в иммунологических реакциях. Эпитопы имеют конформационную природу, т.е. имеется зависимость эпитопа от конформации молекулы антигена, поэтому эпитоп может быть образован аминокислотами, далеко отстоящими друг от друга в пептидной цепи. За счет конформационных процессов эти аминокислоты оказываются рядом и образуют эпитоп. При денатурации молекулы антигена нарушается ее конформация и меняется антигенная структура. Антигенная детерминанта обычно состоит из 3 - 5 аминокислотных остатков. Антигены строго специфичны, каждый может реагировать только с антителом к этому антигену, но не с антителами против другого антигена. Перекрестно реагирующие антигены - результат общности антигенных детерминант в естественных антигенах. Возможность наличия разных АГ детерми-

нант в одной молекуле антигена обеспечивает способность антигена реагировать с антителами разной специфичности.

7. АНТИГЕНЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Антигенными свойствами обладают белки, полисахариды, липополисахариды бактерий. В составе бактерий различают:

1. **Групповые антигены** (общие для нескольких видов бактерий).
2. **Видовые** (характерные только для определенного вида).
3. **Вариантные** (по которым группы штаммов различаются внутри вида).
4. **Штаммоспецифические** (специфичные только для отдельных штаммов).

В бактериальной клетке выделяют **соматические О-антигены**, **жгутиковые Н-антигены**, **оболочечные** либо **капсульные К-антигены**.

Соматические антигены - антигены тела микроорганизма, они локализируются на мембране бактерий. Химически они являются протеинами, протеин-полисахаридами или протеин-полисахаридо-липидами и термостабильны, они могут не терять своих антигенных свойств после кипячения при $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ более двух часов. Бактерии всегда содержат О-антигены.

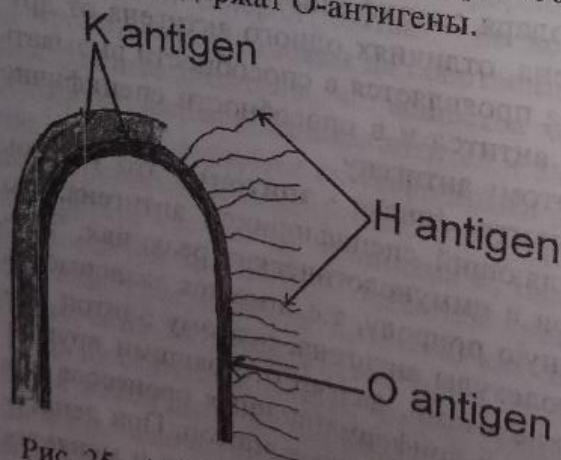


Рис. 25. АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА БАКТЕРИЙ

генов бактерий используется при серологической идентификации выделенной чистой культуры.

Серовары микроорганизмов - антигенные варианты микроорганизмов внутри вида.

Например, возбудитель ботулизма может иметь 7 серологических вариантов (сероваров), хотя каждый серовар продуци-

Протективные антигены - это антигены, способные вызывать в организме образование эффективного противомикробного иммунитета, например - антигены возбудителей чумы, сибирской язвы, коклюша. Антигенная структура бактерий имеет большое значение в идентификации выделенных чистых культур бактерий, определение антигенности культур бактерий, идентификация чистых культур бактерий.

рует ботулинический токсин, отличающийся по антигенной структуре от другого серовара. Это имеет большое значение при лечении антитоксической противоботулинической сывороткой, содержащей антитела против токсина одного серовара. Только некоторые серовары *Escherichia coli* вызывают вспышки колиэнтеритов. Поэтому определение серовара *E. coli* очень важно для диагностики колиэнтеритов у детей и взрослых.

8. АНТИГЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

Различают три основные группы антигенов тела человека - видовые антигены, антигены эритроцитов и антигены ядерных клеток. Видовые антигены характерны для биологического вида, у человека представлены сывороточными антигенами. В судебной медицине, например, используют выявление этих антигенов для определения видовой принадлежности белков крови или других биологических жидкостей. Групповые антигены - изоантигены, по которым люди различаются в пределах вида. К ним относятся антигены эритроцитов, их известно более 100, они объединяются в 19 изоэритроцитарных систем. Изоантигены эритроцитов систем АВО, резус имеют большое значение при переливании крови. Антигены ядерных клеток - HLA (человеческие лимфоцитарные антигены) - А, В, С (1-го класса) и HLA - D и DR (2-го класса) существенны для подбора трансплантата при пересадках органов и тканей. Установлена тесная связь некоторых антигенов HLA с определенными заболеваниями. Определение антигенов системы HLA имеет значение для исключения отцовства, материнства.

Антигены ядерных клеток также являются гликопротеинами клеточных мембран. Они называются HLA (human leukocyte antigens), так как на практике для подбора антигенной структуры донора и реципиента при пересадках органов определяются антигены лейкоцитов. Эти антигены составляют главный комплекс гистосовместимости. Антигены MHC (major complex of histocompatibility) присутствуют в мембранах всех ядерных клеток.

Имеется два главных класса HLA. HLA класса I состоят из 2 полипептидных цепей с различной молекулярной массой (альфа-цепь с молекулярной массой 44 kDa), (бета - цепь с 11,6 kDa). Главная биологическая роль этих антиген - маркировка для иммунной системы, «своё», не подвергать нападению. HLA класса I дифференцируются на А, В и С. Согласно данным ВОЗ (1980 г.) имеются 20 антигенов HLA-A, 42 антигена HLA - В и 8 антигенов HLA - С. Эти антигены определяются с помощью антител, образующихся в организме беременной женщины в результате иммунизации антигенами эмбриона.

HLA антигены класса II состоят из двух полипептидных цепей приблизительно одинаковой молекулярной массы (34 и 38 kDa). Эти антигены преимущественно представлены в мембранах клеток, принимающих участие в иммунитете - макрофагах, Т и В-лимфоцитах. Они разделяются на HLA-D и HLA-DR и определяются при совместном культивировании исследуемых и известных лимфоцитов. Антигены D совпадают с соответствующими антигенами DR. Антигены D/DR принимают участие в регуляции иммунитета.

Таким образом, известны 82 варианта антигенов системы HLA. Их присутствием в человеческом организме управляют гены шестой хромосомы. Статистика показывает, что совпадающий набор антигенов MHC может теоретически быть у двух людей из 5 миллиардов, только монозиготные близнецы могут обладать полностью совпадающим набором антигенов.

Установлено, что существует связь между некоторыми антигенами HLA и определенными болезнями. Например 71 из 100 % лиц, страдающих анкилозирующим спондилитом, обладают антигеном HLA-B27, в то же самое время среди здоровых этот антиген встречается только у 3-12 %. Люди с антигеном B27 часто характеризуются иммунологическим дефектом в отношении некоторых вирусов, которые могут вызывать у них скрытые вирусные инфекции.

Определение антигенов эритроцитов и HLA системы имеет значение для определения отцовства и материнства, так как существуют известные законы наследования этих антигенов.

Имеется органная, органоидная и стадиспецифичность. Например альфа - фетопроtein содержится в эмбриональном организме, но у взрослых он отсутствует. Если он обнаруживается во взрослом организме - это указывает на первичный рак печени.

Имеется также патологическая специфичность (ожоговые, лучевые, раковые антигены, аутоантигены), которая появляется в результате изменения структуры белков организма, адсорбции химических веществ на клетках, травмы.

9. АНТИТЕЛА (ИММУНОГЛОБУЛИНЫ). СТРУКТУРА, КЛАССЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Антитело - белок-иммуноглобулин, вырабатываемый в ответ на антиген и способный специфически взаимодействовать с антигеном. Теперь принято часто применять термин "иммуноглобулин". Оба термина нередко употребляются как синонимы.

Иммунная сыворотка - сыворотка крови, содержащая в большом количестве антитела к определенному антигену. Иммунные сыворотки получают путем иммунизации животных соответствующим антигеном и применяют для профилактики, лечения и диагностики инфекционных заболеваний.

Антитело - фактор специфического гуморального иммунитета, антигенраспознающая молекула.

Молекула иммуноглобулина состоит из двух типов цепей - тяжелых (H) и легких (L). Цепи связаны дисульфидными мостиками. Легкие цепи имеют молекулярную массу 20 кДа и наполовину имеют одинаковую первичную структуру независимо от специфичности к антигену. Вторая половина легких цепей - переменная, последовательность аминокислотных остатков в ней различна у антител к разным антигенам. Тяжелые цепи (м.м. 40 кДа) состоят на 3/4 из константной и на 1/4 из переменной части.

Активный центр антитела, реагирующий с антигеном, называется "паратопом". Паратоп образован переменными участками легких и тяжелых цепей.

При расщеплении папаином из молекулы иммуноглобулина образуются фрагменты: Fc-(константный) и 2 Fab-(антигенсвязывающих), при действии пепсина - Fc - и (Fab)₂ фрагменты.

Fc-фрагмент (fragment crystalline), кристаллизирующийся или кон-
 стантный
 фрагмент,
 имеет одина-
 ковую струк-
 туру неза-
 висимо от
 специфично-
 сти имму-
 ноглобулина
 к антигену.
 Он образован
 константны-
 ми участками
 двух тя-
 жеоых цепей.
 В области
 Fc-фрагмента
 располагают-



Рис. 26. СТРУКТУРА ИММУНОГЛОБУЛИНА

ся рецепторы для фагоцитов, комплемента, а также участки, определяющие видовую, групповую и индивидуальную антигенную специфичность молекулы иммуноглобулина. Несмотря на то, что Fc-фрагмент не реагирует с антигеном, он определяет биологическую активность иммуноглобулина и его участие в иммунологических реакциях.

Fab-фрагмент (fragment antigen-binding) - фрагмент, реагирующий с антигеном. Он образуется примерно половиной тяжелой цепи и легкой цепью, переменные части которых образуют активный центр - паратоп. $(Fab)_2$ - фрагмент является димером Fab-фрагмента и содержит 2 активных центра для связи с антигеном.

Имуноглобулины разделяются на 5 классов по структуре и биологическим свойствам.

IgG - основной класс иммуноглобулинов. В сыворотке содержится до 80% антител класса IgG. Молекулярная масса их около 160 кДа, это - 7 S-антитела, единственный класс антител, проходящий через плаценту и создающий естественный пассивный иммунитет. IgG принимают участие в основных реакциях организма на антиген, могут активировать комплемент и фагоцитоз.

IgM - макроглобулины, 5 - 10 % всех антител. Молекулярная масса около 1000 кДа, 19S-антитела. Это - пентамеры, структурно имеют 10 активных центров, хотя одновременно могут быть активными не более 5-ти. IgM ранее всех появляются в филогенезе и при иммунном ответе на антиген. Они высокоактивны, но специфичность их несколько меньше, чем у IgG.

IgA - секреторные антитела. Их может быть до 10 % в сыворотке, но основная масса их находится на слизистых. Молекулярная масса различна - 170-350 кДа (7S - 11S). Содержат секреторный компонент, стабилизирующий молекулу к действию протеолитических ферментов, поэтому IgA сохраняют активность на слизистых дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, мочевыводящих путей. Выполняют исключительно важную функцию в защите организма от инфекционного агента, нейтрализуя микроорганизмы во входных путях. Через плаценту не проходят, но передаются ребенку с молоком матери.

IgE - реагены, кожно-сенсibilизирующие, играют роль в аллергических реакциях. Содержат цитотфильный компонент для связи с тучными клетками, базофилами, клетками кожи.

IgD - мало изучены. Возможно, принимают участие в аутоаллергических процессах.

IgE и IgD относятся к 7S-антителам. Содержание иммуноглобулинов определяют количественно в реакции преципитации в геле по Манчини, для чего применяют на-

боры иммунных сывороток против тяжелых цепей иммуноглобулинов, по антигенной структуре которых иммуноглобулины различаются. Антигенная структура легких цепей у иммуноглобулинов разных классов одинакова. Основные свойства иммуноглобулинов представлены в таблице.

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА**

ХАРАКТЕРИСТИКА	ИЗОТИПЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ				
	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Концентрация в сыворотке (г/л)	14	1,5	3	0,05	0,00005
Молекулярная масса (kDa)	160	970	160	184	188
Углеводы(%)	2-3	12	7-11	9-14	12
Период полужизни (дни)	21	5	6	3	2
Тяжелые цепи	γ gamma	μ mu	α alpha	δ delta	ϵ epsilon

Изотипы иммуноглобулина определяются типом тяжелой цепи. Различные характеристики иммуноглобулинов также зависят от тяжелой цепи. Разновидности в пределах класса дают деление на субклассы иммуноглобулинов.

* * *

**Занятие № 15. ФАГОЦИТОЗ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ
ЗАЩИТЫ (ЛИЗОЦИМА, КОМПЛЕМЕНТА)**

Цель занятия:

Изучить фагоцитоз как клеточный фактор неспецифической защиты и методы оценки фагоцитарной активности лейкоцитов; изучить гуморальные факторы неспецифической защиты, методики определения показателей, характеризующих состояние неспецифической защиты организма.

Студент должен: знать:

- понятие о фагоцитозе, понятие о системе мононуклеарных фагоцитов (СМФ), роль фагоцитоза в иммунитете, этапы фагоцитоза,
- понятие об опсонинах, методы оценки фагоцитарной активности.

- функцию и роль основных гуморальных факторов неспецифической защиты лизоцима, комплемента, пропердина, нормальных антител, бета-лизинов, интерферона, лейкоцинов и др.

- иметь понятие о бактерицидной активности сыворотки крови
- значение определения гуморальных факторов защиты для оценки иммунного статуса организма и выявления иммунодефицитов.

Уметь:

определять и оценивать фагоцитарное число и фагоцитарный индекс.

- определить титр комплемента сыворотки и титр лизоцима слюны;
- бактерицидной активности сыворотки крови;
- титр бета-лизинов.

Овладеть навыками:

- приготовления мазков крови, микроскопии мазков, дифференциации лейкоцитов по морфологии, подсчета фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса.
- учета реакции иммунного гемолиза;

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

I. Клеточные факторы неспецифической защиты

1. ФАГОЦИТОЗ КАК КЛЕТОЧНЫЙ ФАКТОР НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ

Фагоцитоз - поглощение и переваривание частиц специализированными фагоцитирующими клетками. Фагоцитоз был открыт И.И.Мечниковым в 1882 г.

Процесс фагоцитоза включает следующие стадии.

1. Хемотаксис (приближение) - целеустремленное движение фагоцита к объекту фагоцитоза под влиянием химических веществ в окружающей среде, которая стимулирует направление движения фагоцита. Способность к хемотаксису определяется наличием рецепторов к хемоаттрактантам в мембране фагоцита.

2. Адгезия (прикрепление) осуществляется за счет неспецифического физико-химического взаимодействия мембраны фагоци-

та и объекта фагоцитоза или же за счет взаимодействия рецепторов фагоцита и микроорганизма.

3. **Эндоцитоз** (погружение) фагоцитируемой частицы внутрь тела фагоцита. Этот процесс осуществляется в отношении инертных частиц и непатогенных микроорганизмов без участия дополнительных факторов. Патогенные микроорганизмы фагоцитируются только после их опсонизации факторами, стимулирующими фагоцитоз. Это может быть комплемент и (или) антитела к поверхностным антигенам микроорганизма. В результате фагоцитоза внутри цитоплазмы формируется фагоцитарная вакуоль.

4. **Внутриклеточное переваривание** осуществляется в фаголизосомах, которые формируются в результате слияния фагосом с клеточными лизосомами. Вначале захваченные микроорганизмы погибают при действии бактерицидных механизмов (продукции активных форм кислорода вследствие «кислородного взрыва», действия катионных белков, лизоцима и др. Затем происходит ферментативное расщепление.

Однако фагоцитоз может быть незавершенным. Незавершенность фагоцитоза может быть результатом высоких защитных свойств микроорганизма, присутствия капсулы, плотности клеточной стенки, продукции агрессивных, вредного действия микроорганизмов на фагоциты, способности микроорганизмов к внутриклеточному паразитизму. В этом случае опсонизирующее действие антител и комплемента может приводить к завершенности фагоцитоза.

С другой стороны, незавершенный фагоцитоз может быть как последствие дефекта от стороны фагоцита - недостаточность его микробицидных механизмов.

И.И.Мечников выделил две формы фагоцитоза - макрофаги и микрофаги и определили главную особенность макрофагов - способность к фагоцитозу не только микроорганизма но также и клеток макроорганизма, в отличие от микрофагов, которые являются активными главным образом против микроорганизмов. К микрофагам относятся нейтрофильные гранулоциты. Мы различаем подвижные (моноциты, полибласты, гистиоциты) и неподвижные макрофаги (клетки Купфера печени, эндотелиальные клетки капилляров, клетки стромы селезенки и лимфатических узлов, альвеолярные макрофаги и др.).

1. ФАГОЦИТОЗ КАК КЛЕТОЧНЫЙ ФАКТОР НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ

Фагоцитоз является одним из главных механизмов естественного иммунитета (неспецифическим фактором клеточного иммунитета)

тета) и ранним этапом специфического иммунного ответа, состоящем в переработке антигена и представлении его лимфоцитам.

Фагоцитоз оказывает активирующее и супрессорное действие на лимфоциты, принимает участие в реализации иммунологической толерантности, антиинфекционного, трансплантационного и противоопухолевого иммунитета, некоторых форм аллергии.

2. ВИДЫ ФАГОЦИТОВ. МАКРОФАГИ. ПОДВИЖНЫЕ, ФИКСИРОВАННЫЕ ФАГОЦИТЫ. СИСТЕМА МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ (СМФ), МОНОЦИТЫ, СВОБОДНЫЕ И ФИКСИРОВАННЫЕ МАКРОФАГИ

Фагоциты - специализированная группа клеток, обладающих способностью к фагоцитозу живых и мертвых микробов, клеток, органических и неорганических частиц. Выделяют 2 группы фагоцитов: микрофаги (полиморфноядерные лейкоциты) и макрофаги, составляющие систему мононуклеарных фагоцитов (СМФ).

СМФ представлена моноцитами периферической крови и тканевыми макрофагами и объединяет следующие клетки:

- клетки костномозгового происхождения, обладающие способностью фагоцитировать,
- промоноциты костного мозга,
- моноциты крови и макрофаги, которые подразделяются на свободные (обладают способностью активно передвигаться) и фиксированные.

а) *свободные* - макрофаги соединительной ткани (гистиоциты), макрофаги серозных полостей, воспалительных экссудатов;

б) *фиксированные* - макрофаги печени (купферовские клетки), селезенки, костного мозга, лимфатических узлов, ЦНС, плаценты.

3. ЭТАПЫ ФАГОЦИТОЗА. ЗАВЕРШЕННЫЙ И НЕЗАВЕРШЕННЫЙ ФАГОЦИТОЗ

В процессе фагоцитоза выделяют 4 этапа:

- 1) прикрепление (прилипание, адгезия);
- 2) поглощение (захват частиц);
- 3) слияние фагосомы с лизосомой;
- 4) переваривание захваченных частиц.

Первый этап - прикрепление - начинается с приближения фагоцитов к объекту и обусловлено хемотаксисом. Одновременно с этим происходит подготовка объекта к захвату. Определенное ме-

сто в этом процессе отводится антителам - опсонинам, комплементу, иммуноглобулинам.

Второй этап - поглощение - начинается с движения цитоплазмы. Активность этого этапа зависит от размера фагоцита, степени его подвижности и фагоцитируемого объекта. Фиксирование фагоциты (купферовские клетки) образуют эктоплазматические отростки, которые выступают в просвет кровеносного русла.

Третий этап - слияние фагосомы с лизосомой - образование фаголизосомы, переваривание и разрушение фагоцитированной частицы.

Четвёртый этап - переваривание - в результате этого этапа центральным механизмом является активация мембранных оксидаз. В процессе переваривания в цитоплазматических гранулах увеличивается количество кислой фосфатазы, рибонуклеазы, β -глюкоронидазы, лизоцима, катепсина, липаз, и других ферментов. Указанные ферменты могут в течение длительного времени находиться в фагоцитах и иногда приводят к гибели последних.

Убитые бактерии, клетки и их ферменты перевариваются пищеварительными ферментами фаголизосом, (кислая фосфатаза, β -глюкоронидаза, коллагеназа, лизоцим и другие).

Живые микробы и клетки предварительно умерщвляются, а затем уже подвергаются перевариванию (завершённый фагоцитоз). Умерщвление может осуществляться несколькими путями. Так, возможен быстрый сдвиг pH в кислую сторону, действием лизоцима, лактоферрина, основных белков. Возможно и образование перекиси водорода и других веществ, оказывающих микробоцидное действие. В случаях устойчивости микробов к бактерицидным факторам или недостаточности их синтеза наступает так называемый незавершённый фагоцитоз.

Незавершённый фагоцитоз может проявляться внутриклеточным размножением микроба и гибелью фагоцита. Возможен перенос микроорганизмов с помощью подвижных фагоцитов из первичного очага в другие органы и ткани. Примером незавершённого фагоцитоза могут служить возбудители некоторых заболеваний (лепры, туберкулёза, гонореи), при которых возбудитель часто не только не погибает, но и размножается в лейкоцитах.

Но в большинстве случаев фагоцитарная реакция завершается перевариванием микробов - завершённый фагоцитоз.

4. ОПСОНИЗАЦИЯ. ОПСОНИНЫ. РОЛЬ ОПСОНИЗАЦИИ В ЗАВЕРШЁННОСТИ ФАГОЦИТОЗА.

Уже в первых своих исследованиях по фагоцитозу И.И. Мечников заметил, что фагоцитарная активность лейкоцитов выше в им-

мунной сыворотке, чем в нормальной. Это явление было объяснено специфическим свойством иммунной сыворотки, содержащей антитела - опсоины. Опсоины (греч. opson - пища) - антитела, подготавливающие микроорганизмы к их более интенсивному фагоцитированию.

Опсоины обеспечивают прикрепление фагоцитирующих клеток к микроорганизмам. Различают термоустойчивые и термолабильные опсоины.

Термоустойчивые опсоины являются антителами и относятся к IgG. В отдельных случаях фагоцитозу могут способствовать и опсоины, относящиеся к IgA и IgM. Данные об участии IgD и IgE в опсонизации до настоящего времени отсутствуют.

Термолабильные опсоины разрушаются при температуре 56°С в течение 20 минут.

5. ФАГОЦИТАРНАЯ ТЕОРИЯ ИММУНИТЕТА И.И. МЕЧНИКОВА

Основоположник учения о фагоцитозе - И.И. Мечников (1882), который открыл это явление в опытах на беспозвоночных, определил его биологическую сущность и значение в формировании клеточного иммунитета.

Фагоцитозом называется поглощение и переваривание лейкоцитами и другими клетками каких-либо чужеродных частиц, микроорганизмов.

Фагоцитоз осуществляется лейкоцитами, клетками РЭС (ретикулярные и эндотелиальные клетки селезёнки, лимфоузлов, костного мозга, купферовские клетки печени, эндотелиальные клетки коры надпочечников и гистиоциты), полибластами и другими.

Фагоцитоз является мощным фактором защиты и одним из главных механизмов естественного иммунитета, обеспечивая устойчивость макроорганизма к различным заболеваниям. Существует строгий параллелизм между фагоцитарной активностью и резистентностью организма. Так, факторы, ослабляющие фагоцитоз (токсины, капсульные вещества бактерий, агрессивные кортикостероиды, некоторые десенсибилизирующие вещества и др.) снижают и резистентность организма.

6. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ

Представление о фагоцитарной активности лейкоцитов крови можно получить по данным фагоцитарной активности лейкоцитов, определению фагоцитарного, опсоно-фагоцитарного индексов и показателей завершенности фагоцитоза.

1) Методика определения фагоцитарной способности лейкоцитов крови человека

В пробирку (лучше пользоваться пробирками с малым диаметром) пипеткой Панченкова вносят один объём (25 мл) 3% раствора лимонно-кислого натрия. Затем осторожно берут кровь (2 объёма) - 50 мл и осторожно смешивают с раствором цитрата натрия. В том случае, когда в опыт берётся уже смешанная кровь (как в нашем случае), для соблюдения обычных объёмных соотношений ингредиентов, в пипетку Панченкова следует набрать 3 объёма цитратной крови. Затем в пробирку вносят один объём (25 мл) взвеси стафилококка штампа 209 и пробирку помещают в термостат на 20 минут, для завершения процесса фагоцитоза.

После выдерживания в термостате из содержимого пробирки готовят мазок крови. Для этого небольшую каплю наносят на предметное стекло пипеткой Пастера и шлифованным стеклом кровь распределяют по всей поверхности предметного стекла. Мазок не должен быть слишком тонким, т.к. в этом случае потребуются много времени для подсчёта фагоцитарного показателя.

Затем мазок крови высушивают при комнатной температуре и фиксируют одним из фиксаторов (метиловый или этиловый спирт, смесь Никифорова), для чего достаточно опустить мазок в фиксатор на несколько секунд и сразу же поставить его ребром для высыхания. Допускается и нанесение фиксатора на поверхность мазка на несколько секунд.

Окрашивать мазок следует очень тщательно. При окраске необходимо добиться того, чтобы кокки, находящиеся внутри лейкоцита, были чётко видны.

РАСЧЁТ ФАГОЦИТАРНОГО ЧИСЛА

Фагоцитарное число - среднее количество кокков, поглощённых одним нейтрофильным лейкоцитом.

Для расчёта фагоцитарного числа в 25 лейкоцитах подсчитывают количество кокков и полученную сумму фагоцитированных кокков делят на 25.

Технически подсчёт производится следующим образом. На листе бумаги расчерчивают сетку на 25 квадратов. В каждый квадрат вписывают количество кокков, содержащихся в каждом лейкоците. После заполнения всех квадратов, то есть учёта количества кокков в 25 нейтрофильных лейкоцитах подсчитывают общее количество кокков, полученное число делят на 25. В результате деления получают фагоцитарное число - среднее количество кокков, фагоцитированное одним нейтрофилом.

Ниже приведён пример расчёта фагоцитарного числа.

Пример расчёта фагоцитарного числа:

2	3	0	6	2
4	0	5	4	2
5	0	6	2	1
2	3	4	2	0
4	1	5	2	1

$$\text{Ф.Ч.} = \frac{2 + 2 + 6 + 2 \text{ и т.д.}}{25} = \frac{66}{25} = 2,64$$

Примечание: В каждом квадрате записывается число кокков, поглощённых одним нейтрофилом. Если нейтрофил не участвовал в фагоцитозе, то проставляется "0".

Расчёт фагоцитарного числа:

число кокков, поглощённых всеми подсчитанными нейтрофилами

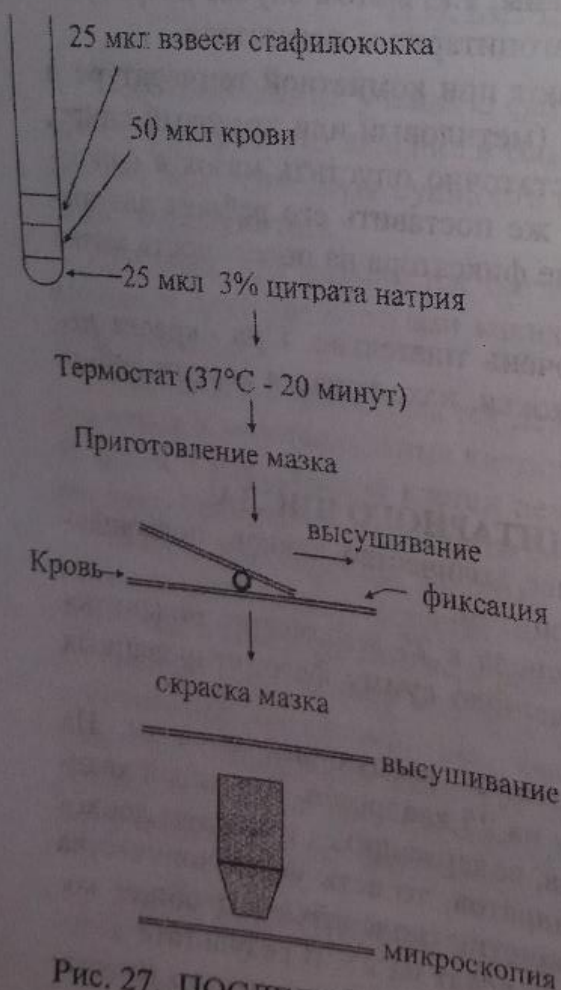
число всех подсчитанных нейтрофилов)

Расчёт фагоцитарного индекса:

(число нейтрофилов, проглотивших хотя бы один кокк)

(общее число подсчитанных нейтрофилов) × 100 %

$$\text{Фагоцитарный индекс} = \frac{20}{25} \times 100 = 80\%$$



Программа самостоятельной работы.

1. Поставить реакцию фагоцитоза с цитратной кровью и взвесью стафилококков.
2. Приготовить мазки крови.
3. Произвести подсчёт фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса в 25 нейтрофилах крови (демонстрационные мазки).

Рис. 27. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПОСТАНОВКИ ОПЫТА

II. Гуморальные факторы естественной резистентности

1. ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ

Система гуморальных факторов неспецифической защиты существует и работает в организме постоянно, независимо от внедрения чужеродных агентов. Синтез всех компонентов генетически детерминирован, они присутствуют в организме к моменту рождения. Гуморальные вещества продуцируются клетками иммунной системы и другими клетками.

К гуморальным факторам неспецифической защиты относятся: система комплемента, ферменты (лизоцим, пероксидаза), интерфероны, система пропердина, белки острой фазы, бета-лизины, лактоферрин, ингибиторы вирусной активности, др.

2. ЕСТЕСТВЕННЫЕ (НОРМАЛЬНЫЕ) АНТИТЕЛА.

Нормальные (естественные) антитела - неспецифические иммуноглобулины сыворотки крови здоровых людей, которые не подвергаются специфической иммунизации данными антигенами. Природа этих антител окончательно не установлена. Предполагают, что они могут возникнуть либо спонтанно (генетически обусловленный механизм), либо в результате скрытой иммунизации антигенами, поступающими с пищей, либо трансплацентарно или с молоком матери. В крови новорожденных нормальные антитела часто отсутствуют или определяются в очень низких титрах. Обнаружение нормальных антител в титрах 1:4 - 1:32 является показателем степени иммунологической зрелости организма и нормального функционирования иммунной системы. При иммунодефицитах и других патологических состояниях организма титры этих антител резко снижаются или не выявляются.

3. ЛИЗОЦИМ, ФУНКЦИЯ, МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ.

Лизоцим (мурамидаза) - полипептид, фермент, разрушает пептидополисахариды (муреин) клеточной стенки бактерий, что приводит к образованию у Gr⁺ микробов сферопластов и протопластов, термостабилен. В слезах лизоцим обнаружен в титре 1:40000, носовой слизи и мокроте - 1:13500, в слюне - 1:300, сыворотке крови - 1:270. Наибольшую активность лизоцим проявляет в отношении Gr⁺ микробов, меньшую - в отношении Gr⁻ микробов. Он продуцируется лейкоцитами и является микробоцидным фактором внутри фагоцитов, участвует в разрушении фагоцитированных микроорганизмов.

Лизоцим выполняют биологические функции: бактерицидное и противовоспалительное действие, влияние на активность комплексов антиген-антитело, стимулирующее воздействие на фагоцитоз, способность нейтрализовать некоторые микробные токсины; есть данные, что лизоцим действует совместно с антителами и комплексом.

Лизоцим в сыворотке крови определяется нефелометрическим способом или титрованием с *M. lysodeicticus*.

Лизоцим - фермент мурамидаза, который расщепляет пептидогликановый слой бактерий, что вызывает разрушение клеточной стенки. Между прочим мембраноатакующий комплекс обеспечивает доступ лизоцима во внутренний пептидогликановый слой. Большое количество лизоцима содержится в сыворотке крови, слюне, слезах.

3. КОМПЛЕМЕНТ, ЕГО КОМПОНЕНТЫ, ФУНКЦИИ КОМПЛЕМЕНТА. АКТИВАЦИЯ.

Гуморальная форма защиты связана с неспецифическими и специфическими (антитела) веществами в жидкостях организма.

Среди неспецифических факторов гуморальной защиты важную роль играет система комплемента.

КОМПЛЕМЕНТ - составной комплекс плазменных белков (приблизительно 20 компонентов), который обладает антимикробным и разрушающим клетки действием. Существенно, что этот комплекс находится обычно в неактивном состоянии и не вызывает никакого действия. Действие системы комплемента связано с каскадной активацией компонентов. Каскадная активация - это такая активация, когда продукт одной реакции является катализатором следующей реакции.

Имеются два пути активации комплемента - классический и альтернативный.

Классический путь активации комплемента запускается комплексом антитело-антиген. Когда антитело взаимодействует с антигеном, который находится в мембране микроорганизма, первый компонент комплемента (обозначенный C1) активируется, продукт активации C1 активизирует C4, далее: C2 → C3 → C5 → C6 → C7 → C8 → C9.

Альтернативный путь активации комплемента происходит без участия антител. Полисахариды многих клеток (в основном непатогенных, патогенные бактерии к устойчивы) действуют на комплемент и также могут его инактивировать) связывают и активируют C3, пропердин, еще один фактор неспецифической гуморальной защиты, присоединяется к C3 и

стабилизирует его. Впоследствии каскадная активация компонента проходит аналогично классическому пути активации: $C3 \rightarrow C5 \rightarrow C6 \rightarrow C7 \rightarrow C8 \rightarrow C9$.

Последний компонент $C9$ (вместе с $C5-C8$) накапливается в результате активации из двух молекул в «мембраноатакующий комплекс» в форме трансмембранного канала в клеточной стенке. Этот канал полностью водонепроницаем для воды и электролитов Na^+ , ионы и вода поступают внутри клетки через него, что заканчивается лизисом клеток. Таким способом происходит разрушение и лизис микроорганизмов, эритроцитов и других клеток. Поэтому комплемент выполняет важную защитную роль в организме.

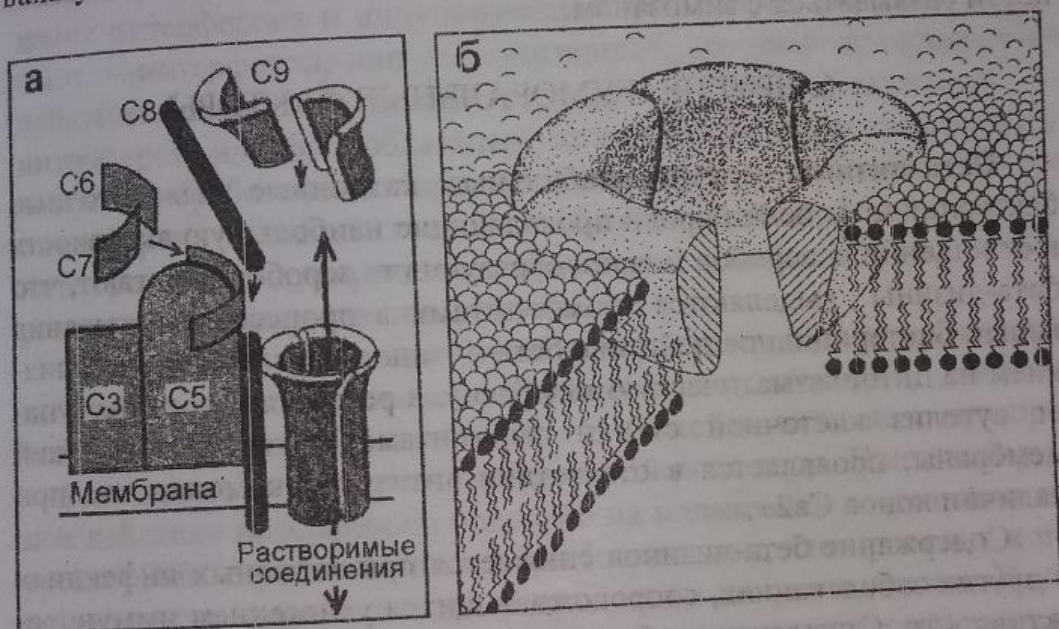


Рис. 28. СХЕМА АКТИВИРОВАННОГО КОМПЛЕМЕНТА
 а - Молекулярная организация мембраноатакующего комплекса
 б - Модель поры в клеточной мембране, образованной в результате активации комплемента.

Как мы говорили ранее, комплемент также участвует в активации фагоцитоза. Именно поэтому мы определяем содержание комплемента в сыворотке крови человека чтобы оценить сопротивляемость организма.

В жидкостях организма также циркулируют другие активные компоненты.

5. СИСТЕМА ПРОПЕРДИНА

Пропердин (лат. pro и perdere - подготовить к разрушению) - высокомолекулярный белок, обнаруживается в бета-, гамма-, и дру-

гих фракциях сыворотки крови. Описан в 1964 г. Пиллемером как фактор неспецифической защиты и цитолиза. Обладает способностью соединяться с полисахаридными структурами микробных клеток, с образованием комплекса пропердин-полисахарид, который необратимо связывает третий компонент комплемента. В совокупности с другими гуморальными факторами и в присутствии ионов магния (система "пропердин + комплемент + Mg^{++}) пропердин обеспечивает бактерицидные, гемолитические, вирусно-нейтрализующие свойства сыворотки крови, является медиатором иммунных реакций. Содержание пропердина уменьшается при многих патологических состояниях (острая кровопотеря, шок, хронические инфекции и др.). Определение пропердина основано на его способности связываться с зимозаном.

6. ДРУГИЕ ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ.

Бета-лизины - термостабильные катионные сывороточные бактерицидные белки крови проявляющие наибольшую активность в отношении анаэробов и спорообразующих аэробов. Считают, что бета-лизины выделяются тромбоцитами в процессе свертывания крови. Бактерицидное действие бета-лизинов обусловлено их влиянием на цитоплазматическую мембрану, в результате чего наступает аутолиз клеточной стенки ферментами цитоплазматической мембраны; проявляется в отсутствии антител и комплемента при наличии ионов Ca^{2+} .

Содержание бета-лизинов снижается при затяжных инфекциях и других заболеваниях, сопровождающихся угнетением иммунореактивности. Определение бета-лизинов основано на высокой чувствительности к ним эталонных штаммов *Bac. subtilis*/

Лейкины - термостабильные фракции, выделяемые при распаде лейкоцитов. Они способны инактивировать стафилококки и другие G^+ микробы, по биологическому действию сходны с бета-лизинами

Лактоферрин - негеминный гликопротеид, обладающий железосвязывающей активностью. Связывает два атома трехвалентного железа, конкурируя с микробами, в результате чего рост микробов подавляется. Синтезируется полиморфноядерными лейкоцитами и гроздьевидными клетками железистого эпителия. Является специфическим компонентом секрета желез - слюнных, слезных, молочных, дыхательного, пищеварительного и мочеполового трактов. Лейкоферрин - фактор местного иммунитета, защищающий от микробов эпителиальные покровы.

Антимикробные гуморальные факторы, присутствующие в сыворотке крови, в совокупности определяют важное ее свойство -

бактерицидность в отношении многих микробов. Бактерицидную активность сыворотки крови определяют по количеству колоний тест-культуры, выросших на чашке Петри с агаром при посеве с микробной взвеси до и после контакта ее с испытуемой сывороткой или нефелометрическим методом.

Интерферон. Выделен в 1957г. английскими вирусологами А.Айзекс и И.Линденман. Первоначально рассматривался как фактор противовирусной защиты. В дальнейшем выяснилось, что эта группа белковых веществ, функция которых заключается в обеспечении генетического гомеостаза клетки. Индукторами образования интерферона помимо вирусов являются бактерии, бактериальные токсины, мутагены и др. В зависимости от клеточного происхождения интерферона и индуцирующих его синтез факторов различают α -интерферон, или лейкоцитарный, который продуцируется лейкоцитами, обработанными вирусами и другими агентами, β -интерферон, или фибробластный, который продуцируется фибробластами, обработанными вирусами или другими агентами. Оба эти интерферона отнесены к типу 1. Иммунный интерферон, или γ -интерферон, продуцируется лимфоцитами и макрофагами, активированными невирусными индукторами.

Интерферон принимает участие в регуляции различных механизмов иммунного ответа: усиливает цитотоксическое действие сенсibilизированных лимфоцитов и К-клеток, оказывает антипролиферативное и противоопухолевое действие и др. Противовирусное действие интерферона основано на подавлении соединения вирусной РНК с рибосомами клетки (полисомы), что приводит к невозможности осуществления репродукции вируса в клетке. У интерферона также установлены радиационно-защитные свойства.

Ингибиторы - неспецифические противовирусные вещества белковой природы, содержащиеся в нормальной нативной сыворотке крови, секретах эпителия слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного тракта, в экстрактах органов и тканей. Обладают способностью подавлять активность вирусов вне чувствительной клетки, при нахождении вируса в крови и жидкостях. Ингибиторы обладают универсальной вируснейтрализующей и антигемагглютинирующей активностью в отношении многих вирусов.

X-лизин активен относительно грамотрицательной флоры, туберкулоостатический фактор - в отношении микобактерий туберкулеза.

Белки острой фазы состоят из плазменных белков, которые резко увеличиваются при инфекционных процессах или повреждении тканей.

Один из лучше всего охарактеризованных белков острой фазы является **C-реактивный протеин** (важный диагностиче-

ский признак воспаления). С-реактивный протеин соединяется с участием ионов кальция с мембраной некоторых бактерий, что приводит к активации комплемента согласно классическому, но не альтернативному пути.

В эту группу молекул также включаются α_1 -антитрипсин, α_2 -макроглобулин, фибронектин, сывороточный амилоидный А протеин, гаптоглобин, все они ограничивают распространение инфекционного агента или стимулируют реакцию хозяина.

Мы рассмотрели только основные гуморальные факторы неспецифической защиты, но их имеется больше

Факторы, влияющие на неспецифическую резистентность. Недостаток или избыток гормонов коры надпочечников непосредственно влияет на уровень неспецифической резистентности, т.к. они изменяют нормальный ход воспаления, как в отношении сосудистого, так и клеточного компонентов.

Нормальное состояние системы неспецифической резистентности организма поддерживают факторы полноценного белкового питания и витаминного обеспечения.

Стимулирующее действие на эту систему оказывают препараты щитовидной железы, общая закалка организма, введение эндотоксинов, пирогенов, туберкулина, зимозана, митогенов.

Угнетающее действие на систему неспецифической резистентности оказывает состояние белкового голода, радиация, анестетические средства, кортикостероиды, подавляющие белковый синтез, антиметаболиты, интеркурентные болезни (диабет, рак, уремия, инфекционные состояния, шок, алкогольная интоксикация), недоношенность, кахексия, старческий маразм.

7. БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ КАК ИНТЕГРАЛЬНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ АКТИВНОСТИ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ЗАЩИТЫ.

Уровень суммарного совокупного действия гуморальных защитных факторов определяют постановкой опыта бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК).

1. Готовят смеси:		Про-	
бирки	Ингредиент	1	2
	Исследуемая сыворотка, мл	0,5	—
	Микробная взвесь (25.000 микробных клеток), мл	0,5	0,5
	Физиологический раствор, мл	—	0,5

Инкубация в термостате 37°C 60 мин.

2. Делают высевы на чашки:
наносят по одной петле, растирают шпателем.
3. Учет проводят через сутки после инкубации в термостате.

$$\text{БАСК \%} = 100 - \frac{\text{число колоний в опытной чашке}}{\text{число колоний в контрольной чашке}} \times 100 \%$$

9. ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ЗАЩИТЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА И ВЫЯВЛЕНИЯ ИММУНОДЕФИЦИТОВ

Гуморальные факторы защиты являются одним из механизмов быстрого реагирования на внедрение и принимают участие в освобождении организма от возбудителей инфекционных процессов. Поэтому снижение активности гуморальных факторов защиты приводит к развитию иммунодефицита – недостаточности иммунитета.

Так, снижение концентрации лизоцима в слюне может обусловить развитие воспалительных процессов в полости рта; закупорка слезного протока приводит к инфекционным поражениям роговицы глаза. Лизоцим стимулирует фагоцитарную активность организма. Снижение уровня лизоцима крови приводит к снижению уровня комплемента, пропердина, бета-лизинов.

Биологические функции системы комплемента заключаются в усилении бактерицидных свойств сыворотки крови, фагоцитоза, внутриклеточного уничтожения чужеродных субстанций, в активации цитолиза, хемотаксиса, выделения клетками анафилатоксина и гистамина, иммуноконглотинации, иммуном прилипанию. Отсутствие хотя бы одного из около 20 компонентов комплемента парализует действие всей системы.

Биологические функции активированных компонентов комплемента:

C1 участвует в регуляции процесса переключения иммунологических реакций с клеточных на гуморальные и наоборот; C4, связанных с клеткой, способствует иммунному прикреплению; C3 и C4 усиливает фагоцитоз; C1\C4, связываясь с поверхностью вируса, блокирует рецепторы, ответственные за внедрение вируса в клетку; C3a C5a идентичны анафилатоксинам, они воздействуют на нейтрофильные гранулоциты, последние выделяют лизосомные ферменты, разрушающие чужеродные антигены, обеспечивают направленную миграцию макрофагов, вызывают сокращение гладких мышц, усиливает воспаление.

Установлено, что макрофаги синтезируют C1, C2, C3, C4, и C5, гепатоциты - C3, C6, C8, клетки паренхимы печени C3, C5 и C9.

В настоящее время установлено ряд генетически обусловленных дефицитов отдельных компонентов комплемента у человека, что приводит к иммунопатологическим проявлениям (дефицит С 2), понижению иммунной реактивности организма и развитию рецидивирующих бактериальных инфекций (дефицит-С 3) и фагоцитирующей способности клеток макрофагальной системы (дефицит С 5). Искусственное добавление компонентов (С 5) может снимать эти явления.

Дефицит компонентов С5-С9, входящих в мембраноатакующий комплекс, ассоциируется с хроническими или рецидивирующими менингококковыми и гококковыми инфекциями.

Наоборот, при наследственном дефекте ингибитора С1 развивается ангионевротический отек, вызванный действием на сосуды компонента С2.

Таким образом, в оценке сопротивляемости организма важная роль принадлежит исследованию состояния гуморальных факторов естественной защиты организма.

ПРОГРАММА САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

Определение содержания лизоцима в биологических жидкостях

Для определения лизоцима в субстрате готовят двойные возрастающие разведения и вносят в них тест-микроб и инкубируют в термостате. Присутствие лизоцима определяется по полному просветлению содержимого пробирки.

ТИТРОВАНИЕ ЛИЗОЦИМА СЛЮНЫ.

№ пробирок	1	2	3	4	5	6	7	8
Исходный материал								
Изотонический р-р NaCl, мл	1,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Слюна, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Тест-культура, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—
Разведение 1:	10	20	40	80	160	320	640	1,0
Учет после инкубации 2 ч при 37°C								К

(+) - просветление суспензии тест-культуры (-) - отсутствие просветления
 Заключение: титр лизоцима в слюне 1:

.....(норма - 1:300) Титр лизоцима - наибольшее разведение слюны, в котором жидкость в пробирке еще прозрачна.

ТИТРОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

№ проби-	1	2	3	4	5	6	7
Исследуемая сыворотка в разведении 1:100, мл	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	—
Изотонич. р-р NaCl, мл	1,4	1,3	1,25	1,2	1,1	1,0	1,5
Гемолитическая система (эритроц. барана + гемолитическая сыв.), сенсibilизированная 30 мин. при 37°C, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Учет после 30 мин. инкубации при 37°C по степени гемолиза							

(+, ++, +++, +++) - степень гемолиза (-) - отсутствие гемолиза

Учет по полному лизису эритроцитов (++++). Заключение: титр комплемента (норма - 0,02 - 0,04 мл). Титр комплемента - наименьшее количество комплемента, которое вызывает полный лизис сенсibilизированной гемолитической системы.

ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ.

Исследуемый фактор	Единица измерения	Взрослые (18-60 лет)	Дети (1-14 лет)
Норм. агглютинины	Титр	1:4 - 1:32	0 - 1:4
Комплемент	Ед/мл	50,0-60,0	40,0-60,0
Лизоцим	Титр	1:40 - 1:160	1: 40 - 1:80
Пропердин	Ед/мл	4-8	2-8
Бета-лизины	Изменение оптической плотности (в%)	35-45	20-30
Индекс бактерицидности кожи	%	90-100	60-80
Индекс бактерицидности сыв. крови	%	90-100	60-80
Содержание интерферона	Титр	1:20	1:2 - 1:8

Занятие № 16. ТИПЫ ИММУННОГО ОТВЕТА. БИОЛОГИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА. ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ. КЛЕТочНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Цель занятия:

Изучить основные положения учения о вариантах иммунного ответа, биологии иммунного ответа, теориях иммуногенеза.

Студент должен:

Знать:

- определение понятия “антиген”, “гаптен”, “антитело”, понятие об антигенной структуре бактерий, антигенах человека;
- структуру и функции антител (иммуноглобулинов);
- классы иммуноглобулинов и их характеристику;
- кооперацию клеток в иммунном ответе;
- иммунологические реакции организма (образование антител, формирование ГНТ и ГЗТ, иммунологическая память, иммунологическая толерантность, идиотип - антиидиотипические взаимодействия);
- теории иммуногенеза.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

2. БИОЛОГИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА. ПЕРВИЧНЫЙ И ВТОРИЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ. ИНДУКТИВНАЯ И ПРО- ДУКТИВНАЯ ФАЗЫ ИММУНОГЕНЕЗА

Выделяют шесть форм иммунного ответа организма на антиген: синтез антител, формирование ГНТ, ГЗТ, иммунологической памяти, иммунологической толерантности, идиотип - антиидиотипические взаимодействия. Все эти 6 форм фактически сводятся к двум: формированию антиген-реактивных молекул (антител - иммуноглобулинов) и антигенреактивных клеток - сенсibilизированных лимфоцитов со специфичными к антигену рецепторами. Наиболее легко демонстрируется иммунный ответ в форме синтеза антител.

Динамика накопления титров антител (после первого введения антигена - первичный иммунный ответ) характеризуется следующими закономерностями. Антитела в определенных количествах появляются с 7 дня, максимума титр антител достигает на 10-15 день, к концу месяца титры антител падают и лишь незначительно превышают фоновые.

При вторичном иммунном ответе титры антител увеличиваются со второго дня, а снижение титров антител происходит значительно медленнее, уровень титров намного выше.

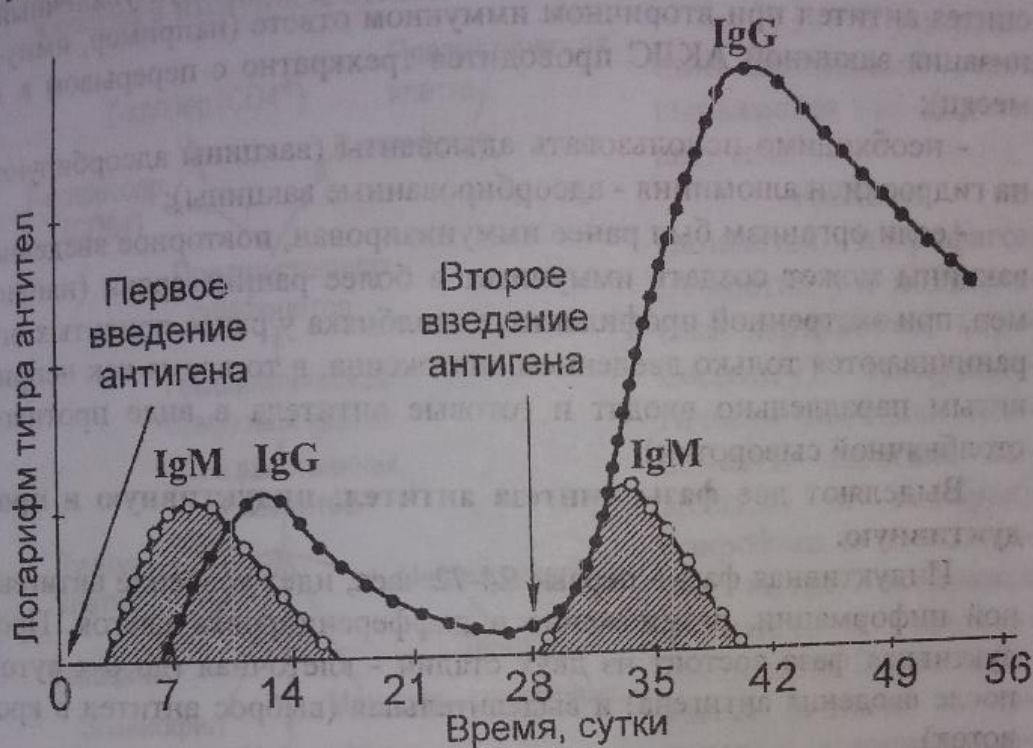


Рис. 29. ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ АНТИТЕЛ ПРИ ПЕРВИЧНОМ И ВТОРИЧНОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ

Это — проявление иммунологической памяти — ускоренного и усиленного синтеза антител на повторный контакт с антигеном. Обусловлена иммунологическая память формированием антиген-реактивных Т и В лимфоцитов — клеток памяти.

Кратковременная иммунологическая память обусловлена обоими типами лимфоцитов, а долговременная память связана преимущественно с Т-лимфоцитами. Долгоживущие клетки памяти могут покоиться более десяти лет без митозов, что подтверждается данными хромосомного анализа лимфоцитов у лиц, получавших радиотерапию.

Имеет значение вид антигена и его агрегатное состояние. Так, корпускулярный антиген обычно вызывает более длительное антигенное воздействие, чем растворимый антиген. Имеет значение и способ введения антигена — подкожно или в ток крови. Повышают иммунный ответ адьюванты, например, стимулятор Фрейнда, адсорбция антигена на геле гидроокиси алюминия и др.

Из описанной картины первичного и вторичного иммунного ответа можно сделать важные практические выводы:

- для создания иммунитета вакцину нужно вводить заблаговременно, чтобы успел выработаться иммунитет до начала эпидемии;

- необходимо повторно вводить антиген, используя усиленный синтез антител при вторичном иммунном ответе (например, иммунизация вакциной АКДС проводится трехкратно с перерывом в 1 месяц);

- необходимо использовать адъюванты (вакцины адсорбируют на гидроокиси алюминия - адсорбированные вакцины);

- если организм был ранее иммунизирован, повторное введение вакцины может создать иммунитет в более ранние сроки (например, при экстренной профилактике столбняка у ранее привитых ограничиваются только введением анатоксина, в то время как непривитым параллельно вводят и готовые антитела в виде противостолбнячной сыворотки).

Выделяют две фазы синтеза антител: индуктивную и продуктивную.

Индуктивная фаза - первые 24-72 часа, идет усвоение антигенной информации, размножение и дифференцировка клеток. Продуктивная фаза состоит из двух стадий - клеточная (до 6-х суток после введения антигена) и выделительная (выброс антител в кровоток).

Иммунологическая толерантность - неспособность иммунной системы отвечать видимой иммунологической реакцией на некоторые антигены. Естественная иммунологическая толерантность к собственным антигенам, искусственная (П. Медавар, 1953) формируется при контакте иммунной системы с антигеном в состоянии иммунологической незрелости организма (в эмбриональном периоде).

По мнению Бернета состояние иммунологической толерантности связано с удалением соответствующих клонов лимфоцитов под влиянием контакта незрелых клеток с большой дозой антигена. Однако, в настоящее время иммунологическая толерантность рассматривается как активное состояние иммунной системы, обусловленное действием антиген-реактивных Т-супрессоров. Срыв толерантности приводит к развитию аутоагрессии иммунной системы против собственного организма.

Формы иммунного ответа в виде гиперчувствительности немедленного (ГНТ) и замедленного (ГЗТ) типов будут рассмотрены подробно при изложении темы "Аллергия".

4. КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУННОГО ОТВЕТА

Сначала необходимо вспомнить клетки, которые принимают участие в иммунном ответе:

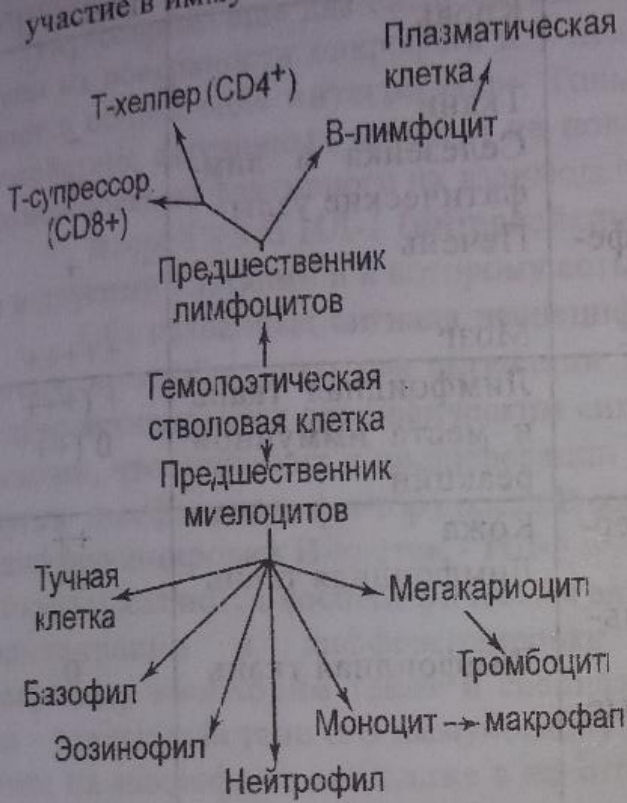


Рис. 30. КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

3.1. Гуморальный иммунный ответ

выражается в синтезе антител.

Антиген поглощается макрофагом (А-клетка) и подвергается переработке (процессингу). Иммунологически значимые компоненты антигена выводятся на мембрану макрофага и располагаются на ней в комплексе с антигеном гистосовместимости D (он называется Ia-белок, иммунитет - ассоциированный). Только в таком комплексе антиген эффективно распознается

лимфоцитами. Макрофаг выполняет не только подготовительную, но и антигенпрезентирующую функцию - представляет антиген другим клеткам. Кроме макрофага значительную роль антигенпрезентации выполняют также дендритные клетки, в петлях которых задерживаются клетки.

В организме имеется большое количество антигенпрезентирующих клеток большинство, на которых представлены молекулы МНС класса II. Другие клетки, подобно Т лимфоцитам и клеткам эндотелия, могут быть индуцированы к синтезу молекул МНС класса II соответствующей стимуляцией лимфокинами (табл. 2).

Относительная роль каждого типа клеток зависит от того, идет ли первичная или вторичная иммунная реакция и от места ее проявления. Наиболее изученные антиген-презентирующие клетки - макрофаги и дендритные клетки. Однако теперь очевидно, что в некоторых ситуациях В клетки могут играть существенную роль в презентации антигена. Роль В клеток становится особенно существенной при вторичных иммунных реакциях, особенно, если концентрация антигена низка.

АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ

Группа	Тип	Местоположение	Молекулы ГКС класса II
Фагоцитирующие клетки	Моноциты	Кровь	+
	Макрофаги	Ткани	+
	Макрофаги краевых зон	Селезенка и лимфатические узлы	+
	Клетки Купфера	Печень	+
Лимфоциты	Микроглия	Мозг	+++++
	В клетки Т клетки	Лимфоидная ткань и места иммунной реакции	+ (+++) 0 (++)
Нефагоцитирующие антигенпрезентирующие клетки	Клетки Лангерганса	Кожа	++
	Интердигитальные клетки	Лимфоидная ткань	++
	Фолликулярные дендритные клетки	Лимфоидная ткань	0
Факультативно-презентирующие клетки	Астроциты	Мозг	0
	Фолликулярные клетки	Щитовидная железа	0
	Эндотелий	Сосудистая и лимфоидная ткань	0
	Фибробласты	Соединительная ткань	++

При первичной реакции специфических В-клеток мало, а их рецепторы имеют низкую аффинность, поэтому наиболее важна роль макрофагов. Ключевая особенность всех антигенпрезентирующих клеток - то, что они могут поглощать антиген, расщеплять и представлять его Т клеткам в комплексе с Ia-антигеном. В дальнейшем клеточные взаимодействия идут так: Т-лимфоцит - хелпер, имеющий специфичный к антигену рецептор, реагирует своим рецептором с антигеном, представленным антиген-презентирующей клеткой в комплексе с Ia-белком. Т-хелпер распознает чужеродный антиген только в таком комплексе, у него имеется двойной рецептор - к чужеродному антигену и к своему Ia-белку. До сих пор не совсем ясно, идет такое двойное распознавание одновременно антигена и I-а белка, рядом расположенных на мембране антигенпрезентирующей клетки, либо необходимо взаи-

действие антигена с Ia-белком с взаимным изменением их структуры. В этом случае распознавание должно идти одним изменением рецептором Т-хелпера. В результате Т-хелпер получает первый специфический активирующий сигнал - от антигена.

Необходимо еще два сигнала. Один из них - адгезивные молекулы на поверхности макрофага и Т-хелпера. Эти молекулы называют в общем виде интегринами. Только комплементарное взаимодействие адгезивных молекул на поверхности этих клеток дает возможность эффективного их взаимодействия.

Второй - это ИЛ-1 (интерлейкин 1), который продуцируется и другими клетками и к которому есть рецептор у Т-хелпера.

Оба названных сигнала неспецифичны по отношению к антигену, но необходимы для активации Т-хелпера. В результате Т-хелпер активируется специфическим сигналом и двумя неспецифическими, что приводит к пролиферации Т-клеток и продукции ими других лимфокинов: фактора роста В-клеток - ИЛ-4, фактора роста и дифференцировки В-клеток - ИЛ-5 и др. Эти лимфокины (интерлейкины) являются неспецифическим активирующим фактором для пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов. Но В-лимфоциту необходим также и специфически активирующий сигнал - взаимодействие его иммуноглобулинового рецептора с антигеном на макрофаге, либо даже в некоторых случаях - с растворенным антигеном. Реагировать будет только тот В-лимфоцит, иммуноглобулиновый рецептор которого специфичен по отношению к антигену. А рецептор В-лимфоцита уже является "заякоренным" антителом. В-лимфоцит, получивший два активирующих сигнала через свои рецепторы (от антигена и от фактора роста В-клеток - ИЛ-4), начинает пролиферировать и дифференцироваться в антителообразующую плазматическую клетку, синтезирующую антитела к тому антигену, который вызвал стимуляцию этой клетки. В результате продуцируются специфические иммуноглобулины, реализуется гуморальный иммунный ответ.

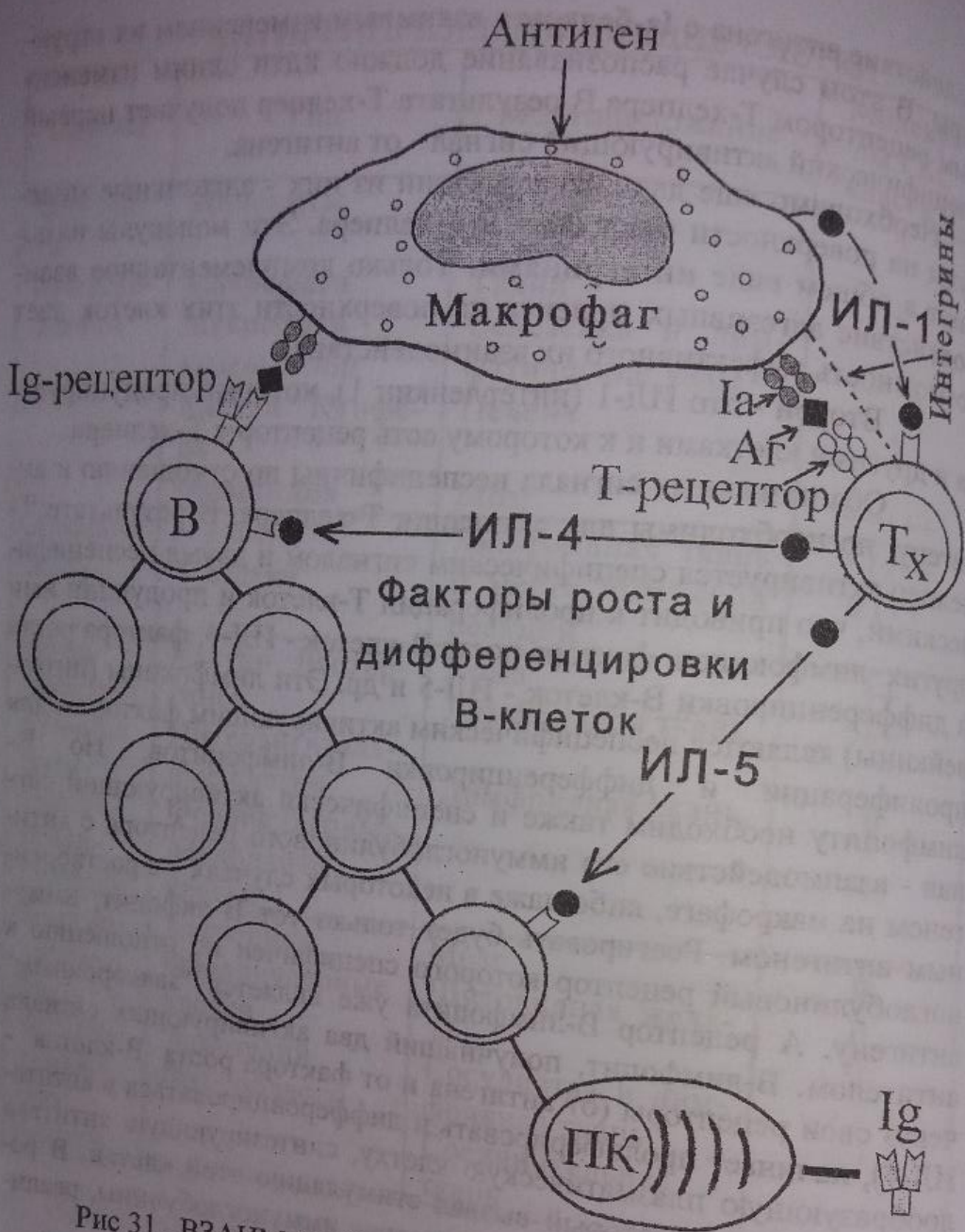
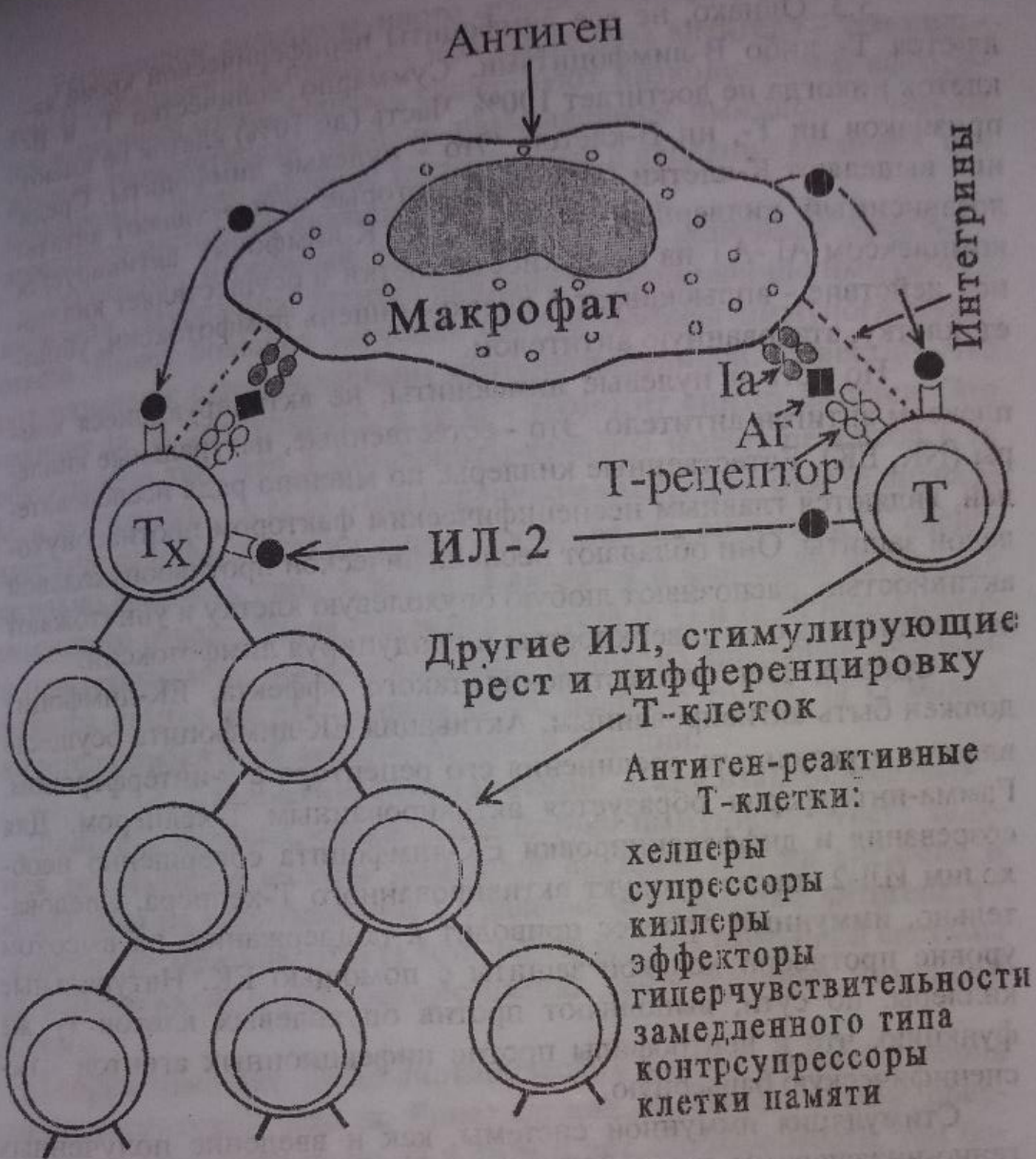


Рис 31. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК ПРИ ГУМОРАЛЬНОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ

3.2. Клеточный иммунный ответ формируется несколько ранее. Точно также идет активация Т-хелпера антигеном и ИЛ-1, в результате активированный Т-хелпер /индуктор продуцирует ИЛ-2, лимфокин Т-Т взаимодействия. ИЛ-2 вызывает пролиферацию Т-хелперов и дифференциацию их в эффекторные Т-клетки (киллеры, супрессоры, клетки памяти, амплифайеры, эффекторы ГЗТ), Т-лимфоциты также активируются по принципу двойного сигнала - специфического, взаимодействия рецептора с антигеном и неспецифического, взаимодействия рецептора с ИЛ-2.



Гиперергическое воспаление
отторжение трансплантата
противоопухолевый иммунитет
противовирусный иммунитет

Рис. 32. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК ПРИ КЛЕТОЧНОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ

Таким образом, иммунный ответ сводится к отбору и стимуляции размножения (пролиферации) и дифференцировки лимфоцитов, способных реагировать с антигеном предетерминированно, до контакта с антигеном. Роль антигена сводится к выбору и поддержанию размножения и дифференцировки соответствующего клона лимфоцитов. Так формируется и клеточный, и гуморальный иммунитет.

3.3. Однако, не все лимфоциты периферической крови являются Т- либо В-лимфоцитами. Суммарно количество Т- и В-клеток никогда не достигает 100%. Часть (до 10%) клеток не имеют признаков ни Т-, ни В-клеток. Это - нулевые лимфоциты. Среди них выделяют К-клетки (киллеры), которые осуществляют антителозависимый киллерный эффект, т.е. К-лимфоцит активируется комплексом АГ-АТ на поверхности клетки и осуществляет киллерное действие - впрыскивает в клетку-мишень лимфотоксин, убивает клетку, атакованную антителом.

Но есть и нулевые лимфоциты, не активирующиеся комплексом антиген-антитело. Это - естественные, натуральные киллеры (НК, ЕК). Естественные киллеры, по мнению ряда исследователей, являются главным неспецифическим фактором противоопухолевой защиты. Они обладают неспецифической противоопухолевой активностью, распознают любую опухолевую клетку и уничтожают ее, соединяясь с ее поверхностью и продуцируя лимфотоксин.

Однако, для осуществления такого эффекта, ЕК-лимфоцит должен быть активированным. Активация ЕК-лимфоцита осуществляется в результате соединения его рецептора с γ -интерфероном. Гамма-интерферон образуется активированным Т-хелпером. Для созревания и дифференцировки ЕК-лимфоцита совершенно необходимо ИЛ-2, также продукт активированного Т-хелпера. Следовательно, иммунный процесс приводит к поддержанию на высоком уровне противоопухолевой защиты с помощью ЕК. Натуральные киллеры, по сути, выполняют против опухолевых клеток ту же функцию, что и нейтрофилы против инфекционных агентов - неспецифическую барьерную.

Стимуляция иммунной системы, как и введение полученных генно-инженерным путем ИЛ-2 и гамма-интерферона, повышают противоопухолевую защиту организма, что и используется при терапии онкозаболеваний (БЦЖ, вакцина из *Corynebacterium parvum* и др.).

4. РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

4.1. Иммунный ответ регулируется организмом с помощью различных механизмов.

Прежде всего, имеется генетический контроль силы иммунного ответа на определенный антиген. Например, сила иммунного ответа на антиген А может быть более высокой, а на антиген В - низкой в этом организме, а в другом организме могут быть обратные отношения. Существуют гены иммунного ответа (I ρ -гены), связанные с генами главного комплекса гистосовместимости в 6-ой хромосоме. Это - генотипический контроль отвечаемости организма на антиген.

Регулятором силы иммунного ответа является также сам антиген. В определенных пределах чем выше доза антигена - тем сильнее иммунный ответ. Однако, существуют низкодозовая и высокодозовая толерантность (раньше называвшаяся иммунологическим параличом). Имеет значение также характер введения антигена, его агрегатное состояние, кратность введения.

Регулирует иммунный ответ также и его конечный продукт - антитела. Накопление антител приводит к торможению иммунного ответа. Имеет большое значение изотип (классы иммуноглобулинов называют еще изотипами) иммуноглобулинов. Известно, что наличие Ig M стимулирует, а Ig G - тормозит синтез антител. Это обусловлено тем, что Т-лимфоциты-хелперы имеют рецептор к Ig M, а супрессоры - к Ig G. При первичном иммунном ответе вначале идет синтез Ig M, затем идет переключение на синтез Ig G, следовательно фаза продукции Ig G является и фактором регуляции иммунного ответа. Такая динамика синтеза Ig G и Ig M используется при серологической диагностике - одним из критериев диагноза является синтез антител класса Ig M, наличие только Ig G может свидетельствовать об анамнестической реакции.

4.2. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия

Если все перечисленные выше формы иммунного ответа являются результатом работы иммунной системы против антигена и направлены на распознавание и удаление чужеродного антигена, то б-я форма иммунного ответа есть форма работы иммунной системы для собственных нужд: осуществления саморегуляции иммунной системы.

Теория идиотип-антиидиотипических взаимодействий (теория иммунологической сети по Ерне) сложна. В полном объеме представить ее затруднительно да в этом и нет необходимости, тем более, что продолжается развитие этой теории. Для изложения теории достаточно дать упрощенное схематичное понятие хотя бы об основных ее аспектах, что позволяет понимать использование этой теории в практике.

В ответ на антиген иммунная система вырабатывает антигенреактивные продукты, которые приводят к удалению антигена из организма.

Когда антиген будет удален, остаются теперь уже ненужные клеточные системы для продукции антител и антигенреактивных лимфоцитов, а также готовые антитела. Если не будет механизма подавления их, то иммунная система будет "засорена" такими молекулами и клетками и не сможет оперативно реагировать на постоянно меняющуюся антигенную ситуацию в организме.

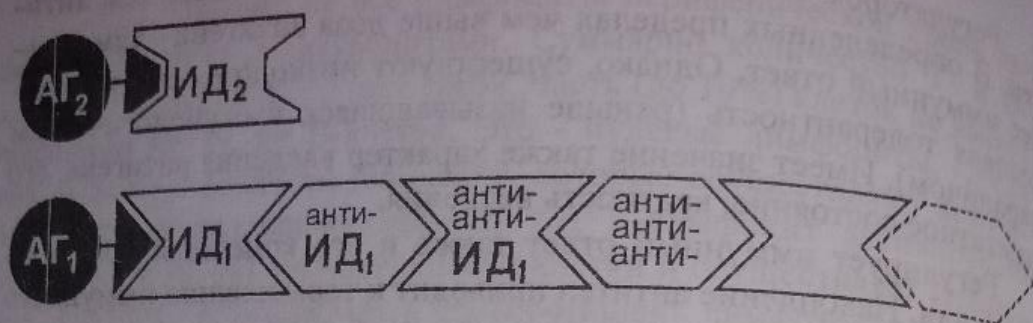


Рис. 33. УПРОЩЕННАЯ СХЕМА ИДИОТИП - АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ СЕТЕВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПО ЕРНЕ

Механизмы регуляции функции иммунной системы нами только что рассмотрены (саморегуляция по принципу обратной связи, регуляция концентрацией антигена), играет роль также нейрогуморальная регуляция физиологических функций организма. Однако наиболее эффективная и тонкая регуляция иммунного ответа осуществляется idiotypic - anti-idiotypic механизмом.

Имуноглобулины, образующиеся в ответ на антиген, различаются по классам и субклассам (изотипам), аллотипам (вариантам строения белков внутри вида), хотя имеют одинаковую специфичность взаимодействия с этим антигеном. Но с другой стороны, иммуноглобулины могут относиться к одному классу, субклассу и аллотипу, однако иметь активный центр к разным антигенным детерминантам. Такие различия получили название "идиотипические" различия. Идиотипические различия обусловлены строением активного центра (паратоп), комплементарного антигенной детерминанте (эпитопу). Поэтому структура активного центра антитела несет отпечаток генетически чужеродной антигенной детерминанты, хотя и является результатом работы собственных генов организма.

Из этого следует, что можно иммунологически различать антитела к разным антигенам. Действительно, в экспериментах на линейных животных доказана возможность получения антител, способных различать иммуноглобулины с разной специфичностью к антигену, синтезированные в одном организме. Следовательно, иммунная система различает иммуноглобулины по их активным центрам и способна образовывать антитела, реагирующие с этими активными центрами. Они получили название "антиидиотипические" антитела, экспериментально это полностью подтверждено.

Когда антиген связан с образовавшимися антителами и выведен из организма, избыток антител к этому антигену (идиотипические антитела, экспериментально это полностью подтверждено) вызывает выработку антиидиотипических антител, нейтрализующих иммуноглобулины к этому антигену.

подавляющих клетки, образующие антитела к этому антигену. В результате выработка антител прекращается, иммунный ответ на антигенный стимул останавливается.

После подавления идиотипположительных молекул и клеток (аналогичные процессы идут и в отношении специфических клеточных рецепторов против антигенреактивных клеток) появляется избыток антиидиотипических антител, которые стимулируют работу иммунной системы против своих специфических активных центров, вырабатываются антиидиотипические антитела. И так происходит несколько раз (6-8 раз), идет смена антиидиотипических продуктов по затухающей, до тех пор, пока иммунный ответ окончательно не прекратится на пороговом уровне. Создается сложная иммунологическая сеть из идиотипических и антиидиотипических молекул и клеток, находящихся в динамическом равновесии.

Повторное введение антигена приводит к сдвигу равновесия между этими продуктами, снова развивается иммунный ответ в виде продукции идиотипположительных антител и последующей антиидиотипической реакции.

Следовательно, имея в своем распоряжении антиидиотипические антитела можно направленно регулировать функцию иммунной системы по отдельным клонам иммунокомпетентных клеток. Можно подавлять аутоагрессивные клоны при аутоиммунных процессах, можно стимулировать противоопухолевый и антимикробный иммунитет. Экспериментально это доказано. Например, создается невосприимчивость к инфекционному заболеванию введением вакцины из микробных антигенов, а антиидиотипических антител, так называемых "антиидиотипических вакцин". Доказано и развитие противоопухолевой резистентности при введении антиидиотипических антител.

С учетом возможности получения моноклональных антител такое управление функцией иммунной системы реально уже в настоящее время.

Однако теория иммунологической сети значительно сложнее, чем мы её изложили выше. Имеет значение доза антиидиотипических антител. Кроме того, активный центр антиидиотипического антитела не всегда повторяет структуру антигенной детерминанты. Идет также и синтез антиидиотипических антител к другим участкам молекулы иммуноглобулина. Параллельно сетевые взаимодействия идут и на уровне рецепторов Т-лимфоцитов. Поэтому радужные перспективы иммунорегуляции требуют осторожной оценки и корректной клинической апробации перед широким внедрением в практику.

5. ТЕОРИИ ИММУНОГЕНЕЗА

5.1. Среди множества теорий иммуногенеза, предложенных за всю историю развития иммунологии, только некоторые сохранили значение до настоящего времени, хотя многие теории были удостоены Нобелевской премии. Конечно, первая из серьезных теорий иммунитета - фагоцитарная теория И.И.Мечникова (1882 г.) не только не потеряла своего значения, но и получает все больше подтверждений и дальнейшее развитие. Но эта теория не объясняет главного вопроса иммунологии - каким образом иммунная система распознает "не свое" и образует строго специфичные к антигену антитела и сенсibilизированные лимфоциты. Теория боковых цепей П.Эрлиха (1901 г.), удостоенная Нобелевской премии вместе с теорией Мечникова, потеряла свое значение в настоящее время, так как оказалась во многом умозрительной и не подтвердилась при углублении наших знаний о структуре и функции клеток. Но один из главных принципов этой теории - отбор предсуществующего, был использован при построении ряда современных теорий иммуногенеза, в том числе и наиболее популярной в наше время теории Бернета. Суть теории Эрлиха в том, что в клетке предсуществуют рецепторы для связывания с различными веществами, антиген взаимодействует со специфическим рецептором к нему, вызывает разрушение рецептора, а клетка начинает гиперпродукцию именно этого рецептора. Рецептор отделяется от клетки и циркулирует в качестве антитела в жидкостях организма. Иммунология длительное время развивалась в русле теории Эрлиха, многие иммунологические термины введены Эрлихом. Но на одной клетке не могут быть рецепторы к любому антигену, не будет места для такого количества рецепторов.

5.2. **Инструктивные и селективные теории** Принято делить все теории иммуногенеза на **инструктивные**, постулирующие участие антигена в качестве матрицы для синтеза антител и **селективные**, постулирующие отбор предсуществующего. Наиболее развитой была инструктивная теория Полинга-Гауровитца, удостоенная Нобелевской премии. По этой теории формирующаяся пептидная цепь иммуноглобулина свертывается вокруг антигена как вокруг матрицы, замыкаются водородные связи и получается молекула антитела, точно соответствующая конфигурации молекулы антигена. Но мы сегодня знаем, что матрицей для синтеза белка служит информационная РНК, а не белок, и конформация молекулы определяется её первичной структурой а не постсинтетическими изменениями. Поэтому даже авторы этой теории официально признали ее несостоятельность. Из селективных теорий наиболее популярной и соответствующей современным фактам является клонально-

селекционная теория австралийского ученого Ф.Бернета (1957 г.). Теория в последующем уточнялась и пересматривалась в свете новых данных как автором, так и другими исследователями. В этой теории использован принцип Эрлиха об отборе предрасполагающего, но не готовых антител, а антителообразующих клеток.

5.3. Клонально-селекционная теория Бернета. Бернет развил модификацию теории Эрлиха, которая получила название клонально-селекционной теории (клон - популяция клеток, происходящих из одной клетки).

Основные постулаты клонально-селекционной теории Бернета.

1. Лимфоидная ткань клонирована, она состоит из множества семейств (клонов) клеток, каждый из которых имеет предтерминированную (заранее причинно обусловленную) способность продуцировать антитела к одному и только к одному какому-либо антигену.

Поскольку лимфоидная ткань имеет множество таких клонов, то в целом иммунная система может реагировать на любой антиген. Бернет полагал, что возможных антигенов на Земле не более 5-10 тыс. Теперь количество возможных антигенов оценивают примерно в 100 тыс.

2. Антиген отбирает и вызывает пролиферацию только того клона клеток, который заранее способен продуцировать антитела к этому антигену, т.е. проводит селекцию клонов.

Это возможно потому, что соответствующий клон лимфоцитов генетически наделен способностью синтезировать антитела к этому антигену. В покое, нестимулированный антигеном, продуцируются только очень малое количество иммуноглобулина. Они находятся на поверхности лимфоцита как IgM и IgD. При контакте с соответствующим антигеном эти иммуноглобулиновые рецепторы лимфоцита вызывают пролиферацию и дифференциацию в клон иммуноглобулин-секретирующих плазматических клеток. Образующийся клон клеток содержится уже в виде достаточно большой популяции, чтобы продуцирующиеся антитела могли быть обнаружены в крови.

Эти два постулата теории Бернета вполне согласуются с современными знаниями по клеточным основам иммунного ответа. В этом легко убедиться, принимая во внимание вышеизложенное. Необходимо лишь сделать некоторые дополнения.

Клонально-селекционная теория вполне подтверждается морфологически. Когда антитело-образующие клетки идентифицируются у высоко иммунизированных животных с помощью флюоресцирующих антител, клетки имеют тенденцию группироваться в кластеры. При световой микроскопии эти клоны выглядят как т-

пичные герминативные центры с отдельными клетками в центре, окруженные по периферии лимфоцитами, иммунобластами и плазматическими клетками.

Клональная теория согласуется с динамикой иммунной реакции при первичном и вторичном иммунном ответе. Скрытый период первичного ответа - время, требуемое для преобразования лимфоцитов в клетки памяти и плазматические клетки. Отдельные клоны клеток соответствуют каждому типу иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM) и должны формироваться для каждой антигенной детерминанты. Эксперименты показали, что одна клетка лимфоидной ткани, культивируемая вне организма, образует антитело только к одному антигену.

Признание того, что В клетки нормального, неиммунизированного животного имеют IgM и IgD молекулы, рассеянные по их поверхности, было принято как физическое присутствие рецепторов, постулированных ранее Эрлихом и включенных в селекционные теории образования антител.

Новым подтверждением клонально-селекционной теории оказалось открытие, что зрелые клетки содержат структурные гены для иммуноглобулинов до воздействия антигена, и что зрелые клетки используют те же самые биохимические процессы для синтеза иммуноглобулинов, что и для синтеза других белков.

3. Контакт с антигеном в периоде иммунологической незрелости (в эмбриогенезе) приводит не к стимуляции, а к подавлению соответствующего клона. На этом основании Бернет объяснял иммунологическую толерантность отсутствием клонов лимфоцитов, способных реагировать на антигены, с которыми организм сталкивается в периоде иммунологической незрелости.

Этот постулат в настоящее время не разделяется большинством исследователей, а механизм развития толерантности объясняется действием специфических лимфоцитов-супрессоров.

4. Многообразие клонов формируется, по теории Бернета, в результате соматических мутаций в эмбриогенезе. Этот издавна критикуемый постулат теории в настоящее время признается лишь частично.

Современная иммунология объясняет разнообразие предсуществующих клонов клеток с учетом нескольких механизмов. В 1986 г. японский исследователь Тенегава был удостоен Нобелевской премии за большой вклад в изучение этого вопроса.

С помощью методов генной инженерии доказано, что число генов, контролирующих синтез иммуноглобулинов и рецепторов Т-лимфоцитов, специфически реагирующих с антигеном, ограничено. Однако, в отличие от генов других белков, они имеют фрагментарную организацию, фрагменты генов разбросаны в хромосоме во

многих экземплярах. В ходе развития плазматической клетки эти фрагменты собираются в функционирующий ген случайным образом. Не вдаваясь в количественные подробности об устройстве сегментов ДНК для разных участков цепей иммуноглобулинов и рецепторов лимфоцитов, скажем, что в результате может образоваться 10 млн. вариантов генов для иммуноглобулина. Да еще число вариантов может возрасти из-за нестандартности соединения сегментов. Этот процесс завершается до встречи клеток с антигеном. К этому времени формируется популяция иммунокомпетентных клеток с широким диапазоном специфичности, но с конкретным антигеном взаимодействуют лишь наиболее адекватные клетки. Затем, во время пролиферации отобранных клонов лимфоцитов под влиянием антигена, включается мутационный механизм. Мутации осуществляют тонкую настройку рецепторов лимфоцитов (в том числе и иммуноглобулиновых рецепторов В-лимфоцитов) таким образом, что создаются гены, продукты которых наиболее подходят для взаимодействия с данным антигеном. Если комбинаторный механизм до контакта с антигеном дает примерно 10 млн типов иммуноглобулинов, то после соматических мутаций их число возрастает в 100 раз. А этого более чем достаточно.

5.4. Теория П.Ф. Здродовского. Вышеописанные теории рассматривают иммуногенез в отрыве от целостного организма. Теория отечественного ученого П.Ф.Здродовского удачно объединила теорию Бернета с теорией нейрогуморальной регуляции физиологических функций организма Г.Селье. По Здродовскому антиген, как стрессор, вызывает раздражение гипофиза неантигенспецифически. Гипофиз продуцирует соматотропный гормон (СТГ) и адренотропный гормон (АКТГ). СТГ вызывает стимуляцию размножения клеток, а АКТГ через усиление продукции надпочечником кортикостероидов - подавляет размножение клеток. Превалирование одного процесса над другим зависит от дозы антигена, состояния организма, условий. Идет нейрогуморальная регуляция иммуногенеза. А специфическое действие антигена заключается в отборе соответствующего клона лимфоцитов по Бернету.

* * *

Занятие № 17. ИММУНОПРОФИЛАКТИКА. ИММУНОТЕРАПИЯ

Цель занятия:

Ознакомиться с принципами специфической профилактики и специфической терапии инфекционных заболеваний; с вакцинными и сывороточными препаратами, их классификацией, назначением, способами получения и единицами измерения активности; с календарем плановой вакцинации.

Студент должен:

Знать:

цели, задачи и способы иммунопрофилактики и иммунотерапии;
вакцинные и сывороточные препараты;
принципы получения вакцин и сывороток, контроля их активности.

Уметь:

определить активность анатоксина и антитоксической сыворотки в реакции флоккуляции (один из видов реакции иммунопреципитации).

Овладеть навыками:

постановки и учета реакции флоккуляции для определения активности дифтерийного анатоксина и титрования противодифтерийной сыворотки.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

1. ИММУНОПРОФИЛАКТИКА. ИММУНОТЕРАПИЯ.

Иммунопрофилактика - способ массовой или индивидуальной профилактики инфекционных болезней путем искусственного создания активного или пассивного иммунитета.

Иммунотерапия - метод лечения инфекционных болезней путем введения специфических иммунных препаратов и вакцин.

2. ВАКЦИНЫ, ИХ НАЗНАЧЕНИЕ, ВИДЫ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ. ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА И ВАКЦИНОТЕРАПИЯ

Вакцины - антигенные препараты, получаемые из микроорганизмов, их антигенов и токсинов, применяются для создания искусственного активного иммунитета.

Классификация вакцин

Традиционные	Новые
1-го поколения (корпускулярные) живые, убитые.	Синтетические: олигопептиды, олигосахариды.
2-го поколения (химические) анатоксины, компоненты микроорганизмов, субъединичные (расщепленные), моновакцины, поливакцины, ассоциированные, адсорбированные.	Живые генно-инженерные продукты рекомбинантных систем субъединичные, антиидиотипические, с применением средств усиления иммуногенности и протективной активности.

а) живые аттенуированные вакцины - готовят из живых микроорганизмов, вирулентных которых ослаблена действием физических, химических, биологических факторов. Например: первая сибирязвенная вакцина была получена Пастером путем культивирования *V. anthracis* при 42° - 43° С; туберкулезная вакцина БЦЖ получена Кальметтом и Гереном при длительном культивировании возбудителя туберкулеза на питательной среде с добавлением желчи; путем селекции маловирулентных вариантов возбудителя получена чумная вакцина Жирара и Робика и штамма EV.

Преимущество живых вакцин - они создают напряженный и стойкий иммунитет, сходный с постинфекционным; вакцинный штамм может размножаться, длительно персистировать в организме и выделяться с фекалиями (например энтеральная полиомиелитная вакцина), обеспечивая естественную иммунизацию населения вакцинным штаммом, что приводит к вытеснению вирулентных штаммов вируса из циркуляции среди населения.

Недостаток живых вакцин - опасность развития тяжелых инфекционных осложнений у лиц с пороком иммунной системы (врожденные и приобретенные иммунодефицитные состояния, СПИД), что является противопоказанием для введения им живых вакцин.

б) убитые вакцины - готовят из микроорганизмов с выраженной иммуногенностью, путем их инактивации высокой температурой, УФ-лучами или химическими веществами (формалином,

фенолом, спиртом, ацетоном и др.), в условиях исключаяющих денатурацию антигенов. К убитым вакцинам относятся вакцины против коклюша, лептоспироза, клещевого энцефалита и др.

в) химические вакцины - это вакцины препараты, полученные только из высокоиммуногенных компонентов бактериальных клеток, очищенных от неактивных балластных веществ.

ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА, ВАКЦИНОТЕРАПИЯ

Различают: плановую вакцинопрофилактику (обязательную вакцинацию детского населения) и по эпидемическим показаниям.

Согласно приказу МЗ Украины от 25.01.96 года за №14, у нас в стране проводится плановая вакцинация против: туберкулеза (вакцина БЦЖ) на 3-5 день жизни ребенка; полиомиелита (живая энтеральная); коклюша, дифтерии и столбняка (АКДС) - в 3 месяца жизни трехкратно с перерывом в 1 месяц; против кори, паротита, краснухи (ассоциированная живая вакцина, либо соответствующие моновакцины) - в 12 месяцев; и обязательная вакцинация против гепатита Б, начиная с первого месяца жизни ребенка.

Вакцинация по эпидпоказаниям проводится в районах эндемичных по определенным инфекциям (например вакцинация против клещевого энцефалита), а также для предупреждения распространения массовых эпидемий (гриппа, холеры и др.).

Вакциноterapia - применяется при хронических вялотекущих заболеваниях с целью стимулирования иммунной системы организма - при гонорее, дизентерии, бруцеллезе, стафилококковых инфекциях и др. Обычно это инактивированные вакцины, получаемые в производственных условиях.

Из анатоксинов для вакцинотерапии применяются только стафилококковый анатоксин. Разновидностью лечебной вакцины является аутовакцина. Готовится индивидуально из возбудителя, выделенного от больного и применяется только для него, с целью стимуляции иммунитета.

3. АНАТОКСИНЫ, ПОЛУЧЕНИЕ, ПРИМЕНЕНИЕ, ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ (ЛФ, ЕС).

Анатоксины (синоним - токсиды) - это экзотоксины, утратившие токсичность, но сохранившие антигенные и иммуногенные свойства, т.е. способность вызывать выработку антитоксических антител.

Получают анатоксины путем обработки экзотоксина 0,4% конечной концентрацией формалина при 40° С в течение 4-х недель.

Выпускают: дифтерийный, столбнячный, ботулинический, гангренозные, стафилококковый, холероген-анатоксин, а также менингококковую, сыпнотифозную химические вакцины. Используют для активной профилактики токсинемических инфекций.

Единицы измерения активности анатоксина (ЛФ и ЕС)

1 ЛФ - количество анатоксина, дающее инициальную флоккуляцию с 1 МЕ соответствующей сыворотки. В ЛФ обычно дозируют дифтерийный анатоксин. Остальные в ЕС.

1 ЕС - доза анатоксина, связывающая 1 МЕ антитоксической сыворотки. Для титрования анатоксина в ЕС к известной антитоксической сыворотке добавляют определенное количество анатоксина и затем титруют в реакции биологической нейтрализации (на животных).

Моновакцины - вакцины, содержащие антигены одного вида возбудителя.

Поливалентные вакцины - содержат антигены разных сероваров одного вида (например полиомиелитная вакцина состоит из возбудителей 3-х сероваров).

Ассоциированные вакцины - состоят из антигенов различных видов бактерий и нередко анатоксинов. Например ассоциированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина АКДС содержит убитые коклюшные бактерии и анатоксины - дифтерийный и столбнячный.

Для повышения активности химических вакцин их адсорбируют на гидроокиси алюминия и др. соединениях, что приводит к созданию депо в организме с медленной резорбцией антигенов и усилением иммунного ответа - такие вакцины называют адсорбированными.

Новые вакцины: синтетические, генно-инженерные и др. разрабатываются преимущественно для профилактики вирусных инфекций (гепатита, СПИДа и др.) и будут рассмотрены в разделе частной вирусологии.

4. ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ КАК ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ.

Иммунные сыворотки относятся к сывороточным препаратам. Они содержат в большом количестве готовые специфические антитела к определенным антигенам и применяются для создания искусственного пассивного иммунитета. Их получают путем гипериммунизации животных по оптимальной схеме соответствующими антигенами. Различают: антимикробные и антитоксические сыворотки. Для получения антимикробных сывороток животных им-

мунизируют вакцинами. Для получения антитоксических сывороток животных иммунизируют анатоксином.

Антимикробные сыворотки имеют ограниченное применение, при введении их дозируют по объему. Антитоксические сыворотки вводят в МЕ. За 1 МЕ антитоксической сыворотки принимают дозу, нейтрализующую определенное количество DLM токсина; например, один МЕ антитоксической противодифтерийной сыворотки - это наименьшее количество сыворотки, нейтрализующее 100 DLM дифтерийного токсина, при введении морским свинкам весом 200-250 грамм.

Для лечения вводят тысячи МЕ сыворотки. Например при дифтерии 10000-100000 МЕ. Существуют международные эталоны антитоксинов, по которым титрую производственные серии сывороток.

5. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ (ГАММАГЛОБУЛИНЫ), ПРИМЕНЕНИЕ, ВИДЫ.

Иммуноглобулины - гамма-глобулиновая фракция сывороток, очищенная от белков, не обладающих антительной активностью. Получают иммуноглобулины из сывороток крови доноров (гомологичные), а также из сывороток крови многократно иммунизированных животных (лошадей (гетерологичные)).

Для освобождения сывороток животных от балластных белков и концентрации антител применяют метод "Диаферм", включающий диализ и ферментативный гидролиз балластных белков.

Из донорской или плацентарной крови получают нормальный иммуноглобулин человека. Использование нормального иммуноглобулина человека для экстренной профилактики и лечения кори, коклюша, менингококковой инфекции, полиомиелита, скарлатины, обусловлено присутствием антител против соответствующих возбудителей в крови взрослого населения.

От специально иммунизированных доноров получают сыворотку крови для приготовления иммуноглобулинов целенаправленного действия для экстренной профилактики и лечения клещевого энцефалита, столбняка, гриппа, стафилококковой инфекции.

Противостолбнячный иммуноглобулин используют для экстренной профилактики столбняка у лиц, у которых обнаружена повышенная чувствительность к лошадиному белку.

Противоэнцефалитный иммуноглобулин получают также из сывороток крови людей, проживающих в местах распространения данного заболевания, содержащих достаточно высокий уровень специфических антител.

Серотерапия, серопротифилактика.

Сывороточные препараты создают искусственный специфический пассивный иммунитет, что используется для лечения и профилактики ряда инфекционных заболеваний. С лечебной целью применяются: противодифтерийная, противостолбнячная, противоботулинические, противогриппозные гетерозиготны сыворотки, гомологичная противостафилококковая плазма и др.

Иммуноглобулины применяют преимущественно гомологичные: противостафилококковый, противогриппозный и др.

Серопротифилактику проводят чаще человеческим нормальным иммуноглобулином (протифилактика гелатита А, кори, коклюша, менингококковой инфекции, полиомиелита; а также используют иммуноглобулины целенаправленного действия для экстренной протифилактики: столбняка, гриппа, стафилококковой и других инфекций).

Возможные осложнения при применении:

Гомологичные сыворотки и иммуноглобулины обладают меньшим сенсибилизирующим действием и дольше сохраняются в организме после введения - до месяца.

Гетерологичные сывороточные препараты, полученные из крови животных (лошадей) содержат для человека чужеродные белки, которые при повторном введении могут вызывать: аллергические реакции, сывороточную болезнь, анафилактический шок.

Для предупреждения осложнений необходимо обязательное проведение контроля на чувствительность организма к чужеродному (лошадиному) белку, путем постановки внутрикожной пробы с лошадиной сывороткой в разведении 1:100, в объеме 0,1 мл.

Введение например, антитоксической лошадиной сыворотки допустимо при отсутствии выраженной кожной реакции в течение 20-30 минут. Сыворотку вводят дробно (по Безредка).

* * *

Занятие № 18. РЕАКЦИИ «АНТИГЕН-АНТИТЕЛО» (СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ): РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА), РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ (РП)

Цель занятия : Изучить механизм, принципы постановки и применения реакций преципитации и агглютинации.:

Студент должен:

Знать:

а) серологические реакции как реакции взаимодействия активных центров антител с антигенными детерминантами (паратопов с эпитопами), применяемыми для идентификации выделенных чистых культур и серологической диагностики заболеваний;

б) принципы постановки реакций преципитации и агглютинации в различных вариантах;

в) применение реакций преципитации, реакции агглютинации и их вариантов в диагностике инфекционных заболеваний..

Уметь:

Поставить и оценить результаты РП, РА при индикации выделенных из организма больного культур микроорганизмов и определить титр антител в сыворотке больного, появившихся в крови в процессе заболевания.

Овладеть навыками:

Постановки учета реакций кальцепреципитации, реакции преципитации на стекле, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КАК РЕАКЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ АНТИТЕЛ С АНТИГЕННЫМИ ДЕТЕРМИНАНТАМИ (ПАРАТОПОВ С ЭПИТОПАМИ)

Механизм реакции АГ-АТ заключается в образовании связи паратопа антитела с эпитопом антигена, активного центра антитела с антигенной детерминантой. Эта связь строго специфична, что определяется комплементарностью паратопа и эпитопа.

В реакции антиген-антитело выделяют две фазы. 1-я фаза - невидимая, специфическая, в которую происходит установление связи между паратопом и эпитопом. Эта фаза не требует присутствия электролитов, что можно доказать, если в безэлектролитной среде соединить взвесь бактерий с соответствующей иммунной сывороткой. При этом не происходит видимой реакции антиген-

антитело, но антитела связываются с антигенами на поверхности микроорганизмов

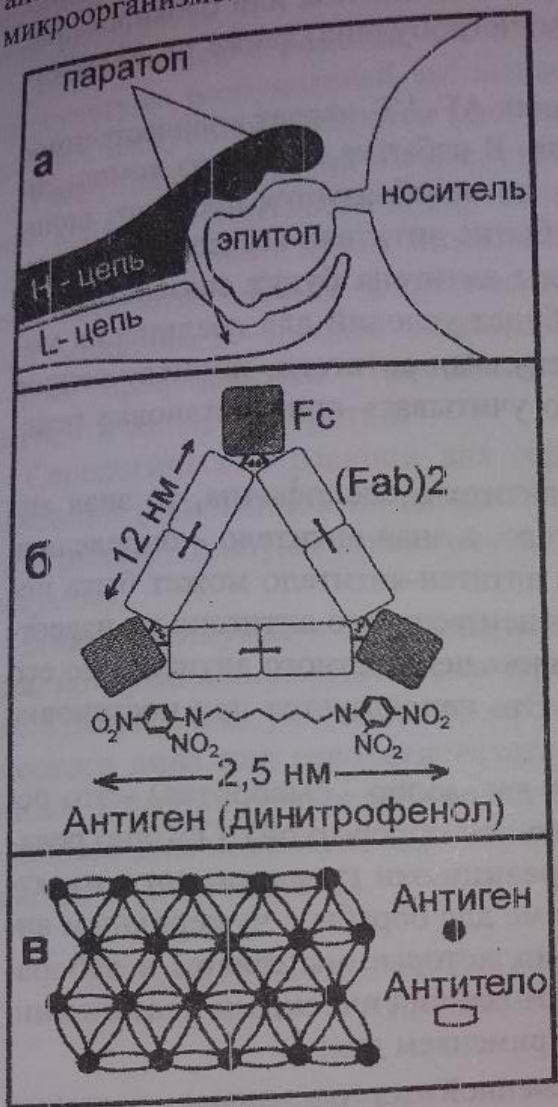


Рис. 34. СХЕМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИГЕНА С АНТИТЕЛОМ

могут иметь 2, 4 либо 6 активных центров). Антигены чаще всего многовалентны, могут иметь от 1-2 до нескольких десятков одинаковых антигенных детерминант. Многовалентность реагирующих компонентов обеспечивает возможность образование «решётки» из антигена и антитела. При этом антитело реагирует своими активными центрами с антигенными детерминантами, расположенными на разных молекулах антигена, т.е. молекулы антигена соединяются друг с другом через молекулу антитела. С учетом многовалентности антигена образуется разветвленная сеть АГ-АТ, формирующая прочный комплекс.

Если антиген одновалентен, то он может соединяться с антителом, но не образует видимого результата реакции, так как не формирует

Если затем отцентрифугировать взвесь, то в надосадочной жидкости не будут присутствовать антитела, так как они связались и были удалены вместе с микроорганизмами.

2-я фаза - видимая, неспецифическая. В эту фазу происходят внешнее проявление реакции - образование осадка, хлопьев из склеенных частиц и др. Для этой реакции необходимо участие электролитов. Электролиты необходимы для взаимодействия комплексов антиген-антитело друг с другом с образованием конгломератов, выпадающих в осадок.

При взаимодействии антигена и антитела важную роль играет валентность реагентов. Антитело-иммуноглобулин, как правило, имеет не меньше 2-х активных центров (иммуноглобулины G, E, D - только два, иммуноглобулины M - 10, а иммуноглобулины A

мируется достаточных размеров агрегат АГ-АТ. Если антитело одновалентно (это бывает при нарушении синтеза или блокировании одного из активных центров иммуноглобулина) также не образуется видимого комплекса АГ-АТ.

Существенную роль в реакциях АГ-АТ играет количественное соотношение антигена и антитела. В избытке одного из компонентов реакция АГ-АТ происходит, но не образуется прочного видимого комплекса. Например, в избытке антитела все доступные антигенные детерминанты молекулы антигена будут связаны с разными молекулами антитела, не будет условий для соединения молекулы антитела с разными молекулами антигена. Количественное соотношение АТ-АГ необходимо учитывать при постановке реакций.

Поскольку реакция антиген-антитело специфична, то зная антиген - можно определить антитело, а зная антитело - определить антиген. Поэтому любая реакция антиген-антитело может быть использована либо для определения неизвестного антигена по известному антителу, либо для определения неизвестного антитела по его реакции с известным антигеном. Это используется при постановке серологических реакций.

Серологические реакции (от лат. *serum* - сыворотка) - это реакции антигена с антителом (иммунной сывороткой). Обычно реакции антиген-антитело называют **реакциями гуморального иммунитета**, они происходят в организме для борьбы с чужеродным антигеном. Реакции антиген-антитело, которые мы ставим в лабораторных условиях, обычно называют **серологическими реакциями**. В лабораторных условиях мы их применяем для:

- 1) идентификации выделенной из организма больного чистой культуры возбудителя заболевания (серологической идентификации);
 - 2) серологической диагностики заболевания (постановки диагноза на основании определения антител, появившихся в сыворотке крови больного в процессе заболевания).
- Название реакций обычно отражает то, что происходит с антигеном:

Реакция преципитации - осаждение растворенного антигена под действием антител. Антитела в этой реакции называются преципитинами, антиген - преципитиногеном, а видимый результат реакции, осадок, преципитатом..

Реакция агглютинации - склеивание корпускулярного антигена под действием антител. Антитела - агглютинины, антиген - агглютиноген, хлопья из склеенных частиц антигена - агглютинат.

Реально в реакции может участвовать одно и то же антитело, но внешний результат реакции различен из-за различий в условиях постановки и учета.

Серологические реакции для идентификации выделенной чистой культуры возбудителей заболевания требуют применения известных иммунных сывороток (диагностических сывороток).

Иммунная сыворотка - сыворотка крови, содержащая в большом количестве антитела к определенному антигену. Иммунные сыворотки получают путем гипериммунизации животных соответствующим антигеном (3-4 кратное введение антигена: через 7-10 дней - микробы, 30-45 дней - анатоксины) и применяют для лечения и реже профилактики - лечебные сыворотки и диагностики - диагностические сыворотки.

Серологические реакции для серологической диагностики заболеваний (основанной на выявлении в крови больного антител к возбудителю) требуют применения, известных антигенов (диагностикумов).

Диагностикумы - антигены микроорганизмов определенного вида, которые используются для серологической диагностики. Это взвесь живых или убитых микроорганизмов определенного биологического вида или серологического варианта, либо раствор антигенных компонентов определенного микроорганизма. Агрегатное состояние диагностикума зависит от того, в какой серологической реакции он используется.

2. РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ (РП). КОМПОНЕНТЫ, ПРИМЕНЕНИЕ

Реакция преципитации - осаждение растворенного антигена под действием антител.

В реакции преципитации происходит укрупнение и последующее осаждение антигена под действием антител. РП очень чувствительна - достаточно следов антигена для того, чтобы реакция была положительной. Размеры антител и антигена соизмеримы, в отличие от РА, где антиген во много раз крупнее, чем антитело.

Компоненты РП.

Антиген (преципитиноген) - обязательно должен быть растворенным. Он может быть раствором животного или растительно-го происхождения, бактериальным токсином, экстрактом из различных органов, тканей, микроорганизмов и т.п.

Антитело (преципитин) - иммунная сыворотка, содержащая антитела к антигену. Иммунные сыворотки получают путем иммунизации животных соответствующим антигеном. Необходимое условие для компонентов РП - их полная прозрачность реагентов.

Учет реакции проводится по появлению осадка (преципитата) в виде помутнения прозрачного раствора.

Для РП необходимо также соблюдение следующих условий:

1. Антитела и антигены должны быть поливалентны, чтобы образовалась решетка из молекул АТ и АГ. Одновалентный АТ и АГ соединятся, но преципитации не будет;

2. Преципитирующая сыворотка должна быть концентрированная, титр сыворотки определяется не ее разведением, а разведением антигена с которым она еще дает РП;

3. Для РП необходимо присутствие электролитов, иначе преципитат не образуется;

4. РП очень чувствительна к соотношению антигена и антитела, при избытке антигена преципитат не только не образуется, но может быть растворение образовавшегося осадка, что обусловлено конкуренцией между молекулами антигена за небольшое число молекул антител, которых не хватает для установления связи между молекулами антигена.

Реакция преципитации ставится в вариантах:

а) **Реакция термокольцепреципитации** по Асколи - для обнаружения антигена сибиреязвенных бацилл в исследуемом материале (органах погибших животных, шерсти, коже, и изделиях из нее - полушубках, дубленках).

Приготовление антигена: исследуемый материал в небольшом количестве нарезают кусочками, заливают физиологическим раствором, кипятят, и фильтруют. Просветленный антиген осторожно наслаивают на преципитирующую сибиреязвенную сыворотку в пробирке или капилляре. На границе соприкосновения антигена с сывороткой в течение 1-2 минут образуется кольцо преципитации.

Эта реакция применяется для диагностики туляремии и чумы, для выявления антигенов менингококка в ликворе больных менингококковым менингитом. Реакция кольцепреципитации проста в постановке и учете, чувствительна и специфична. Она используется также в судебной медицине для определения видовой принадлежности белка (кровяных пятен, спермы и др.). С помощью РП проводится контроль пищевых продуктов, она позволяет выявить фальсификацию мясных, рыбных и др. белковых продуктов.

Реакция преципитации может быть поставлена также в пробирках путем смешивания, а не наслаивания реагентов. В результате

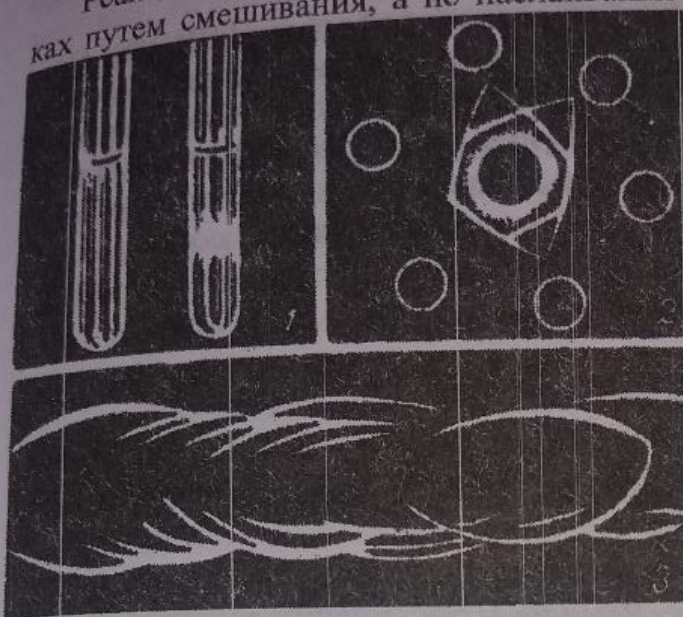


Рис. 35. РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ:
1 – в пробирке; 2 – в геле; 3 – иммуноэлектрофорез

реакции происходит помутнение прозрачных растворов. Обычно такую реакцию называют реакцией флоккуляции, если она ставится с токсином либо анатоксином и соответствующим антитоксином.

б) Реакция преципитации в геле (РПГ). Эта реакция более надежна, так как эквивалентные отношения антигена и антитела устанавливаются автоматически при диффузии в агаровом геле.

Реакция широко используется в диагностике для выявления токсинообразования дифтерийной палочки, стафилококка. Техника постановки проста: на поверхность питательного агара кладут полоску фильтровальной бумаги, смоченную противодифтерийной сывороткой и рядом засевают в виде бляшек испытуемые культуры коринебактерий. После суточного культивирования в термостате появляются линии преципитации в случае образования дифтерийного токсина. РПГ используется также для обнаружения вируса гепатита В сыворотке человека.

РПГ используется для анализа антигенной структуры сложных смесей из антигенов: при наличии в растворе нескольких антигенов, диффундирующих независимо друг от друга, количество полос преципитации соответствует количеству антигенов. Для этого в агаровом геле делаются луночки - в одни вносят сыворотку, в другие антиген, ставят во влажную камеру на несколько дней, учитывают результаты реакции, сравнивают локализацию и характер линий преципитации с контрольной тест системой.

в) Реакция иммуноэлектрофореза (РИЭФ) - позволяет произвести анализ и идентификацию отдельных антигенов в многокомпонентной системе. Для этого используются пластины из стекла, на которые нанесен агаровый гель, антигены нанесенные в центр пластины разделяются в электрическом поле, затем в канавку агара, параллельную линии разделения антигенов, добавляют иммунную

сыворотку. Диффундируя навстречу друг другу, антигены и антитела в месте встречи образуют линии преципитации.

г) **Реакция встречного иммуноэлектрофореза (РВИЭФ)**. Основаны на встречной диффузии в электрическом поле антигенов и антител и появление в месте встречи внутри геля видимого преципитата. В агаровом геле делают лунки диаметром 2-3 мм, попарно на расстоянии 5-6 мм. Лунки для сыворотки располагают ближе к аноду, а для антигена - к катоду. Результаты учитывают через 90 мин. электрофореза, отмечая количество и локализацию линий преципитации, сравнивая их с контрольной тест-системой.

РП применяется в основном для индикации антигена.

3. РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (Р.А). КОМПОНЕНТЫ, УЧЕТ, ПРИМЕНЕНИЕ

Реакция агглютинации - склеивание корпускулярного антигена под действием антител. Реакция агглютинации является одной из реакций специфического взаимодействия антител с антигенами,

которая происходит в организме человека и может быть воспроизведена *in vitro*.

Компоненты реакции агглютинации.

Антиген (агглютиноген) - взвесь частиц. Это могут быть живые или убитые микроорганизмы, эритроциты, лейкоциты, тромбоциты, частицы латекса, связанные с антигеном. Необходимое условие - достаточное количество антигена, чтобы образовались хлопья из скле-

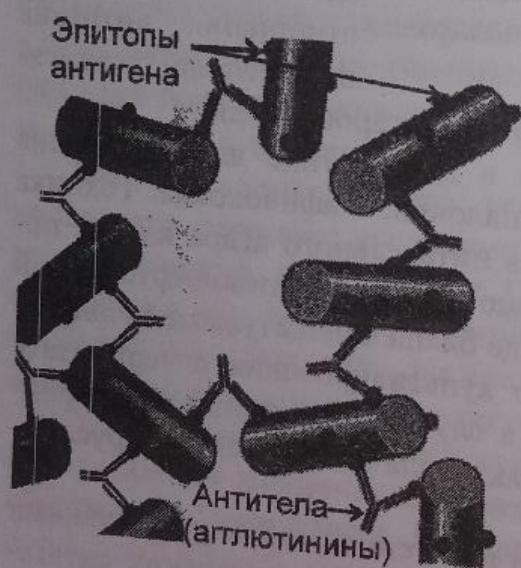


Рис. 36. МЕХАНИЗМ АГГЛЮТИНАЦИИ

енных частиц можно было визуально учесть. Реакция ставится на стекле - учитывается только факт образования хлопьев. Если же реакция проводится в пробирках, то можно проводить полуколичественный учет реакции. Реакция оценивается на (++++), если все частицы склеены в хлопья и при легком встряхивании оказываются плавающими в

прозрачной жидкости. Если же произошло частичное склеивание антигена, то реакцию оценивают соответственно на (+++), (++) или (+), в зависимости от того, какая часть антигена находится в виде хлопьев, а какая - в виде свободной суспензии. Реакция считается отрицательной (-), если не произошло образования хлопьев, и антиген находится в виде гомогенной суспензии.

Учет РА на стекле обычно проводится в ближайшие несколько минут после постановки, при пробирочной реакции первоначальный учет проводят после инкубирования в течение 2-х часов при 37 °С, окончательный - через 18 часов выдерживания при комнатной температуре.

РА в классической ее постановке может быть использована:

- а) для серологической идентификации культуры микроорганизмов на основании выявления в них видовых и вариантных антигенов;
- б) для серологической диагностики заболевания на основании выявления антител к антигенам возбудителя этого заболевания.

4. ВАРИАНТЫ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

Классическая реакция агглютинации - это агглютинация микробных клеток или эритроцитов соответствующими антителами, реагирующими с антигенами на поверхности этих клеток.

4.1. При постановке реакции агглютинации на стекле на предметное стекло нужно нанести каплю иммунной сыворотки, добавить к ней каплю взвеси антигена, осторожно перемешать и учесть реакцию спустя несколько минут после постановки по образованию хлопьев агглютината. Так ставят РА для определения групп крови, как это известно студентам из курса нормальной физиологии.

В микробиологии применяют РА на стекле, главным образом, для серологической идентификации выделенной чистой культуры бактерий. Например, выделена культура возбудителя дизентерии. Возбудитель дизентерии может быть различных серологических вариантов. Для определения серовара выделенного микроорганизма ставят РА на стекле в соответствии со схемой, приведенной в таблице 1.

Студенты должны поставить и учесть эту реакцию самостоятельно, сделав заключение о принадлежности культуры к определенному серовару. В данном случае используют приготовленную суспензию микроорганизмов 1 млрд/мл. Иногда возможно взять

микросорганизмы из колонии или скошенного МПА петлей и сус-пендировать их в капле иммунной сыворотки.

4.2. Пробирочная реакция агглютинации.

РА на стекле требует высокой концентрации антител, что не всегда возможно. Кроме того, РА на стекле не позволяет оценить результат количественно. Поэтому используют также постановку пробирочной реакции агглютинации, которая лишена указанных недостатков.

При постановке пробирочной РА вносят в пробирки обычно по 1 мл разведенной сыворотки и добавляют по 2 капли взвеси микроорганизмов (1-2 млрд микробных тел в 1 мл). Разведения сыворотки могут быть различными. При постановке пробирочной РА для серологической идентификации выделенной культуры бактерий обычно диагностические сыворотки разводят двукратно от 1 : 1000 до разведения, указанного на этикетке сыворотки в качестве ее титра.

Титр агглютинирующей сыворотки - это максимальное разведение (минимальное количество) сыворотки, еще дающее положительную реакцию агглютинации с соответствующим ей типичным микроорганизмом. Титр является полуколичественной мерой активности сыворотки, но вполне достаточен для практических целей оценки активности сыворотки либо содержания антител в сыворотках больных. При постановке РА для серологической диагностики заболевания сыворотки больных разводят от 1 : 25 до 1 : 1600, так как количество антител в сыворотках больных значительно меньше, чем в гипериммунных диагностических сыворотках.

Пробирочная РА позволяет определить титр антител к возбудителю в сыворотках больных, т.е. используется для постановки серологического диагноза заболевания.

При постановке пробирочной РА для серологической идентификации микроорганизма создается возможность более точного определения вида возбудителя. Мы знаем, что многие микроорганизмы, наряду с видоспецифическими, содержат групповые антигены. При иммунизации микроорганизмами для получения диагностических сывороток в них будут содержаться антитела ко всем антигенам микроба. Поэтому диагностические сыворотки будут реагировать не только с микробами соответствующего им вида, но и с родственными микроорганизмами. Но титр реакции агглютинации будет различным: при соответствии сыворотки и микроорганизмов по всем антигенам (групповым, видовым и вариантным) титр РА будет выше, чем при соответствии только по групповым антигенам и антителам к ним.

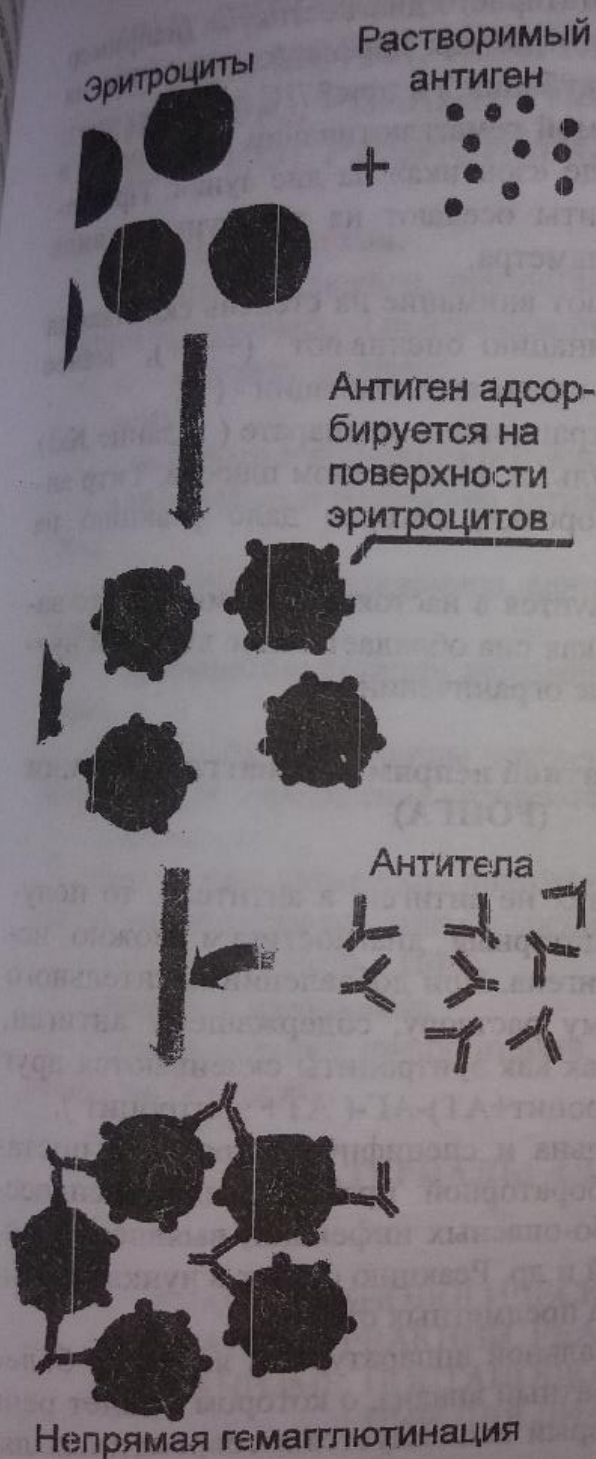


Рис. 37. СХЕМА РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ

больных с целью серологической диагностики.

Реакцию ставят в лунках планшета из плексигласа. Разведения исследуемой сыворотки вносят в лунки планшета в объеме 0,25 мл

Считают, что если РА идет в титре диагностической сыворотки (или, хотя бы в полутитре), то она свидетельствует о соответствии микроорганизма диагностической сыворотке.

Пробирочная РА применяется для серологической диагностики брюшного тифа, бруцеллеза, туляремии, сыпного тифа и некоторых других заболеваний.

4.3. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

РА является очень чувствительной и удобной для применения в лабораторной практике реакцией. Но она имеет существенное ограничение - антиген для этой реакции может быть только в виде корпускул, частиц. Растворенные антигены не могут участвовать в вариантах классической постановки РА. Это возможно при использовании реакции непрямой (пассивной) реакции агглютинации (РНГА).

Антигеном в РНГА служат эритроциты барана, на которых искусственно связаны растворенные либо вирусные антигены. Такие антигены (эритроцитарные диагностикумы) могут быть использованы для определения антител в сыворотках

и добавляют по 0,25 мл эритроцитарного диагностикума (например - гриппозного, содержащего эритроциты барана со связанным на них вирусом гриппа). После инкубации 2 ч при 37°C проводят учет. Положительная реакция непрямого гемагглютинации выражается в образовании агглютината в виде «зонтика» на дне лунки. При отрицательной реакции эритроциты оседают на дне лунки в виде плотного осадка небольшого диаметра.

При учете реакции обращают внимание на степень склеивания эритроцитов. Полную агглютинацию оценивают (+++), менее полную (++) , частичную (+), следы агглютинации - (+).

При учете РНГА в демонстрационном препарате (задание №3) нужно отметить в таблице результат количеством плюсов. Титр антител равен разведению сыворотки, которое дало реакцию на (+++), (++) или (+).

РНГА широко используется в настоящее время и часто заменяют классическую РА, так как она обладает более высокой чувствительностью и имеет меньше ограничений.

4.3. Реакция обратной непрямо́й гемагглютинации (РОНГА)

Если связать на эритроцитах не антиген, а антитело, то полученный эритроцитарный диагностикум можно использовать для выявления антигена. При добавлении антительного диагностикума к исследуемому раствору, содержащему антиген, наступает гемагглютинация, так как эритроциты склеиваются друг с другом через антиген: (эритроцит+АТ)-АГ-(АТ+ эритроцит).

РОНГА высокочувствительна и специфична, проста в постановке и используется в лабораторной практике для экспресс-индикации возбудителей особо-опасных инфекций, выявления вируса гепатита В в крови людей и др. Реакцию ставят в лунках полистиролового планшета либо на предметных стеклах.

РОНГА не требует специальной аппаратуры и является более доступной, чем иммуноферментный анализ, о котором пойдет речь на следующем занятии и который используется в современных лабораториях при диагностике многих болезней.

Занятие № 19. РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ (РН), СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТКИ: ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА), РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ), РАДИОИММУННЫЙ АНАЛИЗ (РИА)

Цель занятия:
изучить механизмы, принципы постановки и применения реакций биологической нейтрализации, РИФ, ИФА, РИА.

Студент должен:

знать:

- механизм и принципы постановки реакции нейтрализации;
- получение и измерение активности антитоксических сывороток;
- получение анатоксинов, единицы измерения активности анатоксинов;
- применение реакции нейтрализации в диагностической практике;
- механизм и принципы постановки РИФ, ИФА, РИА и их применение для определения антигенов и антител.

уметь:

- определять активность анатоксина и антитоксической сыворотки по результатам реакции флоккуляции;
- учитывать РИФ и ИФА.

овладеть навыками:

- учета реакции преципитации в геле для определения токсигенности бактерий..

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. РЕАКЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ (РН) МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ В ОРГАНИЗМЕ. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ.

Реакция биологической нейтрализации - реакция обезвреживания токсина или микроорганизма (антителами-антитоксинами, антимикробными, вируснейтрализующими).

РН может происходить только в биологических объектах - лабораторных животных, культурах клеток, курином эмбрионе.

Общий принцип постановки реакции: к токсину или микробу добавляют соответствующую сыворотку и вводят смесь лабора-

торным животным или используют другую живую систему (культуру клеток, куриные эмбрионы). В положительном случае не проявляется действие токсина, вируса. Происходит нейтрализация инфекционных свойств вируса, нейтрализация токсического действия токсина.

2. РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ (РН) ТОКСИНА АНТИТОКСИНОМ

В основе этой реакции лежит способность специфической антитоксической сыворотки нейтрализовать экзотоксин. Антитоксическая сыворотка может нейтрализовать летальное, гемолитическое, дермонекротическое, лейкотоксическое и другие эффекты действия экзотоксина.

РН применяется для титрования антитоксических сывороток, определения типа токсина с диагностической целью, определения токсигенности выделенных чистых культур и идентификации токсигенных микроорганизмов.

Для проведения реакции исследуемый материал, в котором предполагается наличие экзотоксина, смешивают с антитоксической сывороткой, выдерживают в термостате и вводят животным (морским свинкам, мышам). Контрольным животным вводят фильтрат исследуемого материала, необработанной сывороткой. В том случае, если произойдет нейтрализация экзотоксина антитоксической сывороткой, животные опытной группы останутся живыми. Контрольные животные погибнут в результате действия токсина.

Возможны другие варианты постановки и учета. Но в каждом случае постановки реакции материал, в котором предполагается наличие экзотоксина, смешивают с антитоксической сывороткой и выдерживают в термостате для взаимодействия между антигеном (экзотоксином) и антителами антитоксической сыворотки. Всегда необходимо использовать биологический объект, в котором проявляется эффект действия токсина.

РН возможна при предварительном введении в организм животного антитоксической сыворотки, потом вводится токсин. Нейтрализация токсина происходит и в организме. Вводимая антитоксическая сыворотка нейтрализует экзотоксин, который продуцируют возбудители заболеваний. Поэтому РН лежит в основе серотерапии и серопрфилактики инфекционных заболеваний, вызванных токсигенными бактериями - дифтерии, столбняка, ботулизма, газовой анаэробной инфекции, стафилококковых инфекций.

3. РЕАКЦИЯ ФЛОККУЛЯЦИИ

Реакция флоккуляции (РФ) - вариант реакции преципитации, позволяющий оценивать взаимодействие токсина и антитоксина в пробирочных условиях.

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

РФ применяется для определения активности анатоксина или антитоксической сыворотки.

РФ для определения активности антитоксической сыворотки ставят в два этапа.

Первый этап. По стандартной сыворотке устанавливают количество Lf (Limes flocculationes) в 1 мл. токсина. Lf токсина определяется его количеством, которое дает инициальную флоккуляцию с 1 международной единицей (МЕ) сыворотки. Установив силу токсина, приступают к определению активности сыворотки.

Второй этап. Известной силы токсин и испытуемую антитоксическую сыворотку разливают в пробирки в определенном объеме, как показано в табл. 1. Пробирки выдерживают на водяной бане при 45 °С в течение 30 минут до выпадения хлопьев в одной из них. Инициальная флоккуляция проявляется в той пробирке, где количество токсина соответствует количеству международных единиц сыворотки.

Например (см. табл.), если флоккуляция произошла в 3-й пробирке, значит в 0.4 мл. сыворотки находится 40 МЕ. Следовательно, в 1 мл. сыворотки содержится $40 : 0.4 / 100$ МЕ.

4. РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТОКСИНОВ. АНТИСТРЕПТОЛИЗИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

Реакция основана на феномене нейтрализации гемолитического действия микробного токсина (0-стрептолизина) антитоксическими антителами иммунной сыворотки.

Для постановки реакции предварительно определяют минимальную гемолитическую дозу токсина (0-стрептолизина), т. е. то наименьшее количество, которое вызывает гемолиз 0.2 мл. 5% взвеси эритроцитов кролика. Затем определяют рабочую дозу 0-стрептолизина, т. е. наименьшее количество токсина, которое в смеси с 1/2 АЕ (антитоксической единицы) стандартной антитоксической сыворотки полностью нейтрализуется и не вызывает гемо-

лиза эритроцитов. Для постановки основного опыта готовят разведения исследуемой сыворотки. К каждому разведению добавляют рабочую дозу токсина, инкубируют 45 минут при 37 °С и добавляют равный объем взвеси эритроцитов, затем инкубируют еще 1 час при 37 °С и 18 часов при комнатной температуре.

В качестве положительной учитывается реакция, где отсутствует гемолиз, происходит оседание эритроцитов на дно. С учетом максимального разведения сыворотки, при котором наблюдается полная задержка гемолиза, рассчитывают содержание АЕ в 1 мл испытуемой сыворотки (таблица 2. Учет антистрептолизиновой реакции).

5. АНАТОКСИНЫ. ПОЛУЧЕНИЕ. ТИТРОВАНИЕ. ЕДИНИЦЫ АКТИВНОСТИ (ЛФ, ЕС)

Анатоксин - это обезвреженный экзотоксин, лишенный токсических свойств и сохранивший антигенные (иммуногенные) свойства. Синоним - **токсоид**. Анатоксин получают обычно путем прибавления к экзотоксину формалина в количестве 0,3 %-0,4 % к объему экзотоксина и выдерживают в термостате при температуре 38-40 °С в течение 30 дней. Токсин утрачивает свои токсические свойства и сохраняет иммуногенные.

Анатоксин применяется для иммунизации людей (создания активного искусственного иммунитета), а также для иммунизации животных с целью получения антитоксических сывороток.

Активность анатоксина определяют в ЛФ и ЕС.

ЛФ - доза анатоксина, которая дает инициальную фоккуляцию с 1 МЕ (одной международной единицей) антитоксической сыворотки.

ЕС (единица связывания) - доза анатоксина, которая связывает 1 МЕ сыворотки. ЕС определяется так: к известной дозе сыворотки добавляют определенное количество анатоксина. Анатоксин связывает определенное количество сыворотки, а оставшееся количество МЕ сыворотки титруют в РФ или РН. Затем рассчитывают, сколько МЕ сыворотки связалось с взятой дозой анатоксина и количество ЕС в этой дозе.

Используются в практике следующие анатоксины: дифтерийный, столбнячный, ботулинический, гангренозный, стафилококковый и холероген-анатоксин. Разрабатываются и другие.

Активность дифтерийного анатоксина определяется в ЛФ, активность других анатоксинов - в ЕС.

6. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТОКСИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК. ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ (МЕ)

Антитоксические сыворотки получают путем гипериммунизации животных анатоксином. Титрование антитоксических сывороток проводят в РН или РФ с соответствующим токсином. Измеряют активность антитоксической сыворотки в международных единицах (МЕ). 1 МЕ сыворотки нейтрализует определенное количество соответствующего токсина. 1 МЕ противодифтерийной сыворотки нейтрализует 100 Dlm дифтерийного токсина. 1 МЕ других антитоксических сывороток нейтрализует 1000 Dlm соответствующего токсина.

Антитоксические сыворотки используют для лечения, профилактики и диагностики инфекционных заболеваний.

7. ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ТОКСИНА АНТИТОКСИНОМ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ. БИО- ПРОА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИНА И ИДЕНТИФИКАЦИИ КУЛЬТУРЫ ПО ТОКСИГЕННЫМ СВОЙСТВАМ. РЕАКЦИЯ ШИКА

Реакция нейтрализации применяется в диагностике инфекционных заболеваний. При этом определяют не только наличие в исследуемом материале соответствующего токсина, но его серотипа. Это позволяет применить для лечения типоспецифическую антитоксическую сыворотку.

РН основана на способности антитоксической сыворотки нейтрализовать летальное действие токсина. Подготовленный материал смешивают с диагностической антитоксической сывороткой, выдерживают при температуре 37 °С в термостате, в течение времени, необходимого для того, чтобы произошла реакция нейтрализации и вводят белым мышам. При соответствии типа токсина и антитоксической сыворотки мыши не погибают. Такая реакция называется биологической пробой.

Биологическая проба используется для диагностики ботулизма, определения типовой принадлежности *C. perfringens*, идентификации культуры по токсигенным свойствам.

Для определения напряженности антитоксического иммунитета против дифтерии у детей используют кожную реакцию Шика. Для этого в области предплечья внутрикожно вводят определенное количество (кожная доза 1/40 Dlm) токсина. Отсутствие покраснения и припухлости на месте инъекции свидетельствует о полной нейтрализации введенного токсина циркулирующими в организме антитоксинами.

8. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТКИ - РИФ, РИА, ИФА. ИХ НАЗНАЧЕНИЕ, ПРЕИМУЩЕСТВА, ОГРАНИЧЕНИЯ

В настоящее время широко применяются серологические реакции, в которых используются меченные тем или иным способом антитела или антигены. Метка может быть различной, но основное требование к ней едино: она должна выявляться с помощью определенных реакций или под микроскопом. Серологические реакции с использованием метки используются для обнаружения антигена и антител, позволяют быстро получить результаты. Однако, они имеют неодинаковую чувствительность и диагностическую ценность. Их применение требует специальной аппаратуры - люминесцентного микроскопа, высокочувствительных счетчиков радиоактивности, специальных фотометров.

Наиболее распространенными являются следующие виды меток:

- 1) флюорохромы, способные флюоресцировать в ультрафиолетовых лучах или синевфиолетовой области спектра видимого света, например, флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ). Используется для проведения иммунофлюоресцентных реакций;
- 2) ферменты, которые при взаимодействии с субстратом обуславливают его распад с образованием окрашенных продуктов, используется для проведения иммуно ферментных реакций;
- 3) радиоактивные метки, применяющиеся в высокочувствительных радиоиммунологических реакциях.

9. РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ). ПРЯМАЯ И НЕПРЯМАЯ РИФ. ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

РИФ основана на использовании ФИТЦ или других флюорохромов, химически конъюгированных с антителами. Меченые антитела вступают во взаимодействие с соответствующими антигенами. Образовавшиеся комплексы дают желто-зеленое свечение при изучении препарата в люминесцентном микроскопе.

РИФ (или реакция Кунса) может быть осуществлена в нескольких вариантах:

- 1) Прямая РИФ. Используется иммунная сыворотка, содержащая антитела к определяемому антигену. Антитела мечены флюорохромом (ФИТЦ).

На фиксированный препарат наносят специфическую иммунофлюоресцирующую сыворотку. Выдерживают во влажной камере 30 минут при температуре 25 °С, после чего промывают буферным раствором. В положительном случае образуются комплексы, дающие зеленое свечение в люминесцентном микроскопе.

Непрямая РИФ. Используется две иммунные сыворотки. Сыворотку, содержащую специфические антитела к изучаемому антигену (эти антитела немечены). Препарат промывают буферным раствором. Антиглобулиновую сыворотку, содержащую меченые антитела (против иммуноглобулинов того животного, из сыворотки которого получена антимикробная сыворотка).

Вначале препарат обрабатывают немеченой специфической сывороткой во влажной камере, после чего промывают буферным раствором. Далее препарат обрабатывают антивидовой антиглобулиновой меченой сывороткой и промывают буферным раствором.

РИФ может быть использована при изучении различных антигенов: культур бактерий, грибов, простейших, препаратов из материала от больных, инфицированных культур клеток, срезов тканей и др. Исследуемый материал помещают на стекло, фиксируют. Дальнейшая обработка препаратов зависит от применяемого варианта РИФ. В положительном случае в препарате видны светящиеся объекты.

РИФ может быть использована также для определения количества антител в иммунной сыворотке. Готовят разведения изучаемого антигена, которые наносят на стекла с фиксированным антигеном. Выдерживают во влажной камере, промывают буферным раствором. Затем препарат обрабатывают антивидовой меченой



Рис. 38. ПРЯМАЯ РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

сывороткой, промывают буферным раствором, т. е. применяется
непрямая РИФ.

10. РАДИОИММУННЫЙ АНАЛИЗ /РИА/. ПРИНЦИП ПОСТАНОВКИ И УЧЕТА

РИА основан на использовании радиоактивной метки. Антиген или антитела метят радиоактивным изотопом, чаще всего I^{125} . РИА очень чувствителен, позволяют обнаружить 1-2 нг и менее исследуемого вещества. Для их проведения необходима специальная радиометрическая аппаратура.

РИА используется для определения неизвестного антигена и для определения неизвестного антитела.

Известные антигены или антитела для РИА метят радиоактивным изотопом.

Применяются различные модификации РИА. Чаще всего - твердофазная. Это значит, что известный антиген или антитело должно быть фиксировано на твердофазном носителе: поверхности планшетов с лунками или бус. Адсорбированные антигены и антитела длительное время сохраняют способность вступать в серологические реакции.

Применяются разные методы постановки РИА - конкурентный, обратный, непрямой.

Наиболее удобным является проведение РИА непрямым методом с использованием антивидовых меченых антител /метод двойных антител/. Непрямой метод РИА может быть использован как для выявления антител (серологическая диагностика), так и неизвестных антигенов. В обоих случаях применяют антивидовую меченую сыворотку, содержащую антитела против иммуноглобулинов.

Для проведения серологической диагностики (определения антител) с помощью непрямого метода РИА на поверхности лунок сорбируют антиген. В лунки вносят разведенную сыворотку больного. При наличии в ней соответствующих антител на поверхности лунок формируется комплекс "антиген-антитело". Лунки промывают буферным раствором. Несвязавшиеся антитела удаляют. При последующем внесении в лунки меченой изотопом антивидовой сыворотки, антитела, содержащиеся в ней, адсорбируются на образовавшемся комплексе антиген-антитело. В данном случае антитела сыворотки крови человека - иммуноглобулины выполняют роль антигена. Чем больше в сыворотке больного антител, тем больше будет связанной с поверхностью лунок радиоактивной метки. Определение радиоактивности позволяет судить о количестве антител в сыворотке больного.

11. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА). ПРИНЦИП ПОСТАНОВКИ ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕИЗВЕСТНОГО АНТИГЕНА И НЕИЗВЕСТНОГО АНТИТЕЛА. АППАРАТУРА ДЛЯ ИФА

В реакции используются антитела, меченые ферментом. Фермент способен разлагать субстрат с образованием окрашенных продуктов. В качестве ферментов чаще всего используют пероксидазу, щелочную фосфатазу, а в качестве субстрата для пероксидазы - ортофенилендиамин и другие вещества.

Если антитела соединяются с антигеном, то в образовавшемся комплексе АГ-АТ будет находиться меченое антитело, обладающее ферментативной активностью за счет конъюгированного с ним фермента. Для выявления этой активности необходимо добавить субстрат. Происходит изменение цвета. Интенсивность окрашивания зависит от количества фермента, т. е. чем больше образовалось комплексов антиген-антитело, тем более интенсивным будет окрашивание.

ИФА используется для определения неизвестного антигена и для определения неизвестного антитела.

Как мы уже знаем, для определения неизвестного антигена необходимо иметь известные антитела. Для определения неизвестного антитела необходимо иметь известный антиген. Суть ИФА заключается в том, что известные антигены (или антитела) должны быть сорбированы на каком-либо твердом материале. Обычно используют пластиковые планшеты, шарики или пробирки, изготовленные из различных синтетических инертных материалов - полистирола, метакрила и др. Адсорбированные на поверхности таких материалов антигены и антитела длительное время сохраняют свою иммунологическую специфичность.

Существует много методических вариантов ИФА. Разберем отдельные варианты.

Для выявления антигенов в большинстве случаев используют антитела, присоединенные к твердой фазе.

В нашем примере используются планшеты. На поверхности лунки находятся известные антитела. В лунки вносят исследуемый антиген. Инкубируют в термостате определенное время для того, чтобы произошло взаимодействие между антигенами и антителами. Затем промывают буферным раствором. Несвязавшийся антиген удаляется из лунки. После промывания в лунку вносят антитела к искомому антигену, но эти антитела имеют метку.

Они конъюгированы с ферментом. Происходит взаимодействие между антигенами, которые находятся на поверхности лунки (они

присоединились к фиксированным антителам) и мечеными антителами.

После инкубации в термостате промывают буферным раствором. Все, что не связалось удаляется из лунки. Таким образом, в положительном случае на поверхности лунки окажется: фиксированное антитело + определяемый антиген + меченое антитело. Комплекс обладает ферментативной активностью за счет наличия в нем меченых ферментом антител. Чем больше образовалось комплексов, тем больше фермента находится на поверхности лунки. Для выявления его вносят субстрат, изменяющий цвет при действии на него фермента. Чем больше фермента, тем больше интенсивность изменения окраски.

Для определения антител используют **непрямой вариант ИФА**. В нашем примере используются планшеты. На поверхности лунок находится известный антиген. В лунки вносят исследуемую сыворотку в разведениях (для определения титра антител). Инкубируют в термостате. Промывают буферным раствором. Затем вносят меченые ферментом моноклональные антитела против иммуноглобулинов человека. Промывают после инкубации. В положительном случае на поверхности лунки окажется: фиксированный антиген + определяемое антитело + меченное ферментом моноклональное антитело против иммуноглобулинов человека. Далее добавляют субстрат для фермента и через определенное время учитывают результат изменения цвета.

Учет реакции.

Учет может быть визуальным, но для получения точных результатов используются фотометры. Автоматически производится измерение интенсивности окраски в каждой лунке и расчет концентрации антител с помощью компьютера.

Если в качестве метки использовалась пероксидаза, то хромоген - ортофенилендиамин окрашивается в желтый цвет.

ИФА - высокочувствительный, точный и надежный метод серологического анализа, который находит все более широкое применение в современной диагностической практике.

* * *

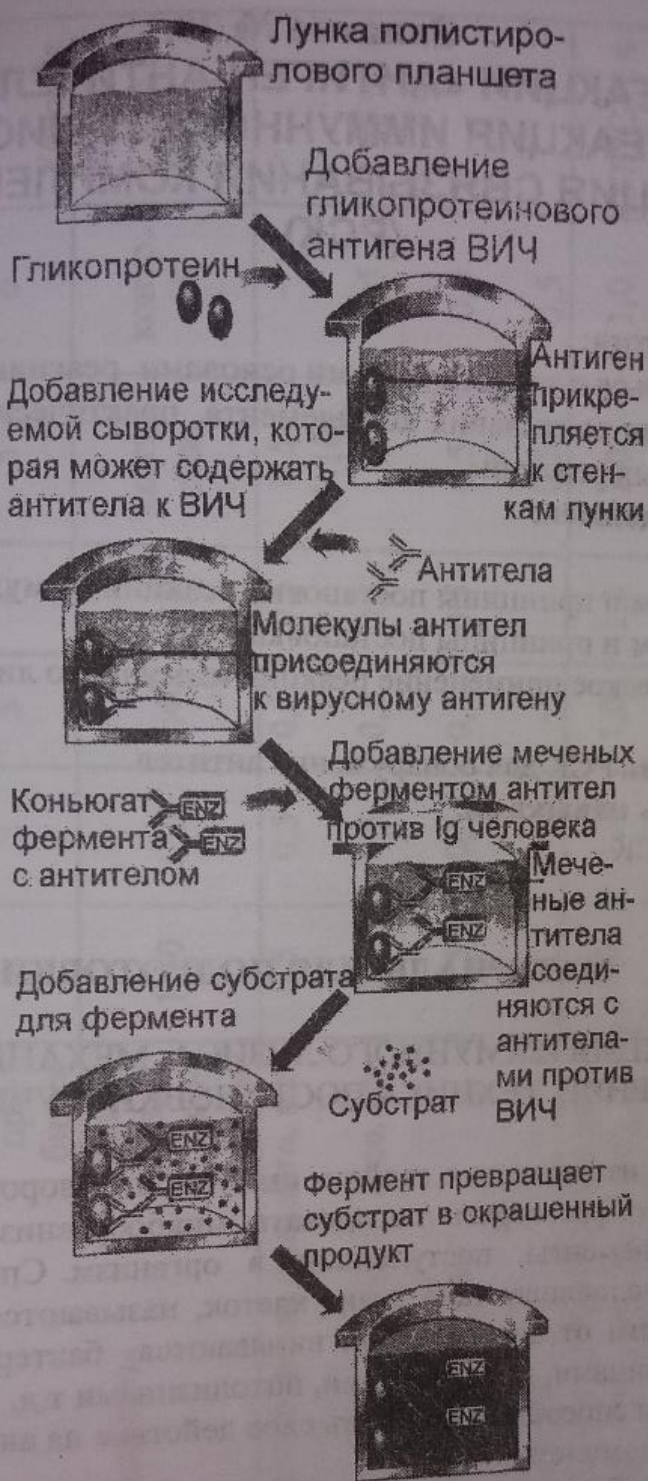


Рис. 39. НЕПРЯМОЙ ИММУНОСОРБОЦИОННЫЙ МЕТОД ИФА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ
 Здесь иллюстрируется обнаружение антител против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в сыворотке человека.
 (Обратите внимание, что необходимые этапы промывания после каждого шага не показаны)

Занятие № 20.
РЕАКЦИИ «АНТИГЕН-АНТИТЕЛО»:
РЕАКЦИЯ ИММУННОГО ЛИЗИСА,
РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА
(РСК)

Цель занятия:

Ознакомиться с теоретическими основами реакции иммунного лизиса, реакции связывания комплемента, практическим применением указанных реакций.

Студент должен:

Знать:

- механизм и принципы постановки реакции иммунного лизиса
- механизм и принципы постановки РСК
- практическое применение реакций иммунного лизиса и РСК.

Уметь:

- поставить РСК для обнаружения антител.

Овладеть навыками:

- учета РСК

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

1. РЕАКЦИЯ ИММУННОГО ЛИЗИСА. МЕХАНИЗМ. ПРИМЕНЕНИЕ. ТЕХНИКА ПОСТАНОВКИ И УЧЕТА.

Одним из защитных свойств иммунной сыворотки является ее способность растворять /лизировать/ микроорганизмы и другие клеточные элементы, поступившие в организм. Специфические антитела, обуславливающие лизис клеток, называются лизинами. В зависимости от антигена они называются бактериолизинами, спирохетолизинами, гемолизинами, цитолизинами т.д.

Лизины способны проявлять свое действие на антиген только при участии комплемента.

В микробиологической практике применяются реакции бактериолиза и гемолиза.

Как иммунобиологический процесс, бактериолиз ярко выражен при холере и тифо-паратифозных инфекциях. Литические свойства сыворотки указаны также при заболеваниях, вызванными спирохетами и трипаносомами. При искусственной иммунизации происходит накопление строго специфических бактериолизинов.

СХЕМА ПОСТАНОВКИ РСК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ БОЛЬНОГО

№ системы	Ингредиенты	№ пробирки	1	2	3	4	5	6	Условия инкубации
			разведение сыворотки	1:10	1:20	1:40	1:80	контр. сыв.	
1	Инактивированная сыворотка больного, мл Антиген (диагностikum) в рабочей дозе, мл Комплемент в рабочей дозе, мл Изотонич. р-р NaCl, мл		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5 (1:10)	-	37 °C 1 ч
			0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5	
			0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
2	Гемолитическая система (сенсibilизи- рованная в течении 30 мин при 37 °C), мл Учет РСК по задержке гемолиза		-	-	-	-	0,5	0,5	37 °C 1 ч
			1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	

(++++), (+++), (++) - РСК положительна (задержка гемолиза); (-) - отрицательная РСК (наличие гемолиза).
Заключение: в исследуемой сыворотке обнаружены антитела в титре

В практике реакции бактериолиза могут быть использованы для:

- 1/ определения вида неизвестного микроба
- 2/ определения в исследуемой сыворотке наличия бактериолизинов к заранее известному микробу.

Реакция бактериолиза воспроизводится в пробирке /in vitro/ и в организме животного /in vivo/.

Большинство микроорганизмов устойчиво к литическому действию антител. Поэтому реакция лизиса не нашла широкого применения в лабораторной практике.

При проведении реакции лизиса in vitro иммунную сыворотку прогревают в течении 30 мин при температуре 56 для инактивации в ней комплемента. Взвесь микроорганизмов готовят из суточной культуры / 1 млрд. микроорганизмов в 1 мл /. В пробирках готовят ряд последовательных / серийных / разведений исследуемой сыворотки / 1:10, 1:20, 1:40 и т.д. /.

В каждую пробирку добавляют 0,1 мл приготовленной взвеси микроорганизмов и 0,1 мл неразведенного комплемента. Реакция сопровождается контролями: контроль инактивации комплемента в исследуемой сыворотке / в эту пробирку комплемент не добавляют /, контроль комплемента на отсутствие в нем лизинов / вместо исследуемой сыворотки в пробирку вносят изотонический раствор натрия хлорида /.

Пробирки помещают на 2 ч в термостат при 37 °C, затем делают посев петлей из каждой пробирки на чашки Петри с плотной питательной средой. Посевы инкубируют в термостате в течении суток при 37 °C и подсчитывают колонии.

Если в исследуемой сыворотке содержатся лизины, количество колоний на питательной среде, засеянной материалом из опытной пробирки, будет во много раз меньше, чем в чашках, содержащих материал из контрольных пробирок.

2. РЕАКЦИЯ ИММУННОГО ГЕМОЛИЗА

Специфические антиэритроцитарные антитела называются гемолизинами. Они обуславливают лизис эритроцитов при обязательном участии комплемента. Без комплемента лизис не происходит.

Реакция гемолиза в иммунобактериологической практике применяется главным образом для:

- определения титра комплемента
- определения титра гемолизинов
- в качестве индикаторной системы в реакции связывания комплемента.

Обычно используется 3% взвесь эритроцитов барана. Для получения сыворотки, содержащей гемолизина против эритроцитов барана, кроликов иммунизирует эритроцитами барана. Гемо

литическую сыворотку выпускают в ампулах. На этикетке каждой ампулы указан титр сыворотки и обозначен срок ее годности.

Титром гемолитической сыворотки называется максимальное ее разведение в объеме 0,5 мл, при котором наблюдается полный гемолиз 0,5 мл комплемента после 3% взвеси эритроцитов барана в присутствии 0,5% мл комплемента после инкубации пробирок в течение часа в термостате при 37 °С.

2. РСК. Механизм. Применение. Техника постановки и учета.

РСК была впервые описана Борде и Жангу / 1901 /. Эта реакция основана на свойстве комплекса антиген-антитело связывать свободный комплемент. Для ее проведения необходимы 5 ингредиентов, которые составляют две системы:

Первая система - специфическая, состоящая из антигена, антитела и комплемента.

Вторая система - индикаторная, гемолитическая, состоящая из 3% взвеси эритроцитов барана и гемолитической сыворотке.

Образования комплексов антиген-антитело связывание комплемента не сопровождается видимыми изменениями. Поэтому для индикации потребления комплемента в реакции дополнительно используют систему антиген-антитело, которая в присутствии комплемента дает появление визуально наблюдаемого феномена - гемолиз эритроцитов.

Следовательно, РСК - это метод, включающий две независимо и последовательно протекающие реакции с участием двух систем антиген-антитело. Образующиеся комплексы обеих систем способны связывать комплемент.

Принцип метода состоит в том, что комплемент, связавшийся комплексом антиген-антитело в специфической системе, уже не может вызвать лизис сенсibilизированных эритроцитов.

РСК, как и другие серологические реакции, можно использовать для выявления специфических антител по известному антигену, т.е. для серодиагностики, а также для определения антигена по известному антителу. Достаточно высокая чувствительность и специфичность РСК позволяют использовать ее для серодиагностики многих инфекционных заболеваний бактериальной, микоплазменной и

вирусной природы, обнаруживая в сыворотке больного специфические комплементсвязывающие антитела при помощи известных антигенов, или выявляя в исследуемом материале специфический антиген, используя соответствующую иммунную сыворотку.

Если в специфической системе присутствует искомым реагент-антиген или антитело, то он образует с другим специфическим реагентом комплексы, которые фиксируют комплемент, и гемолиз не происходит. Реакция в данном случае положительная. Если же в специфической системе искомым реагент отсутствует, то комплексы антиген-антитело не формируются, комплемент остается свободным и взаимодействует с сенсibilизированными эритроцитами, способствуя их лизису. В данном случае РСК будет отрицательной.

Количество израсходованного комплемента /К/ находится в прямой зависимости, а степень гемолиза в обратной зависимости от количества образовавшихся комплексов антиген-антитело /Аг-Ат/, что наглядно иллюстрирует следующая схема:

1. $Аг + Ат + К \rightarrow$ комплекс $АгАтК$ /комплемент связался без остатка/

Эритроциты + антиэритроцитарные Ат. Гемолиз отсутствует

2. $Аг + Ат + К$ комплекс $АгАтК +$ остаток К

Эритроциты + антиэритроцитарные Ат + остаток К
частичный гемолиз

Проведение РСК требует особой подготовки. Все ингредиенты реакции подготавливают и титруют до проведения основного опыта.

1. Сыворотку крови, полученную для исследования, накануне постановки реакции прогревают на водяной бане при $56^{\circ}C$ в течение 30 мин для инактивации ее собственного комплемента. Инактивированная сыворотка может храниться при температуре $3 - 4^{\circ}C$ в течение 5 - 6 дней. В день постановки опыта сыворотку разводят изотоническим раствором хлорида натрия в соотношении 1 : 5.

2. Антигеном для РСК могут быть культуры различных убитых микроорганизмов, их лизаты, компоненты бактерий, вирусы, вирус-содержащие материалы, тканевые антигены. Многие микробные антигены получают производственным путем.

3. В качестве комплемента используют сыворотку морской свинки, взятую непосредственно перед опытом или сухой комплемент, который разводят изотоническим раствором натрия хлорида.

4. Эритроциты барана используют в виде 3% взвеси на изотоническом растворе натрия хлорида.

5. Гемолитическую сыворотку применяют в тройном титре. Например если титр гемолитической сыворотки 1:1800, в реакции применяют разведение 1:600.

Перед постановкой опыта обязательно определяют титр комплемента, гемолитической сыворотки и антигена.

Титрование комплемента.

Титрование комплемента является важнейшим этапом РСК, поскольку достоверность результатов в наибольшей степени от данного реагента. В начале необходимо приготовить гемолитическую систему. Смешивают разные объемы 3% суспензии эритроцитов и гемолитической сыворотки. Выдерживают в термостате при температуре 37 в течении 30 мин для сенсibilизации эритроцитов / происходит взаимодействие между Ag эритроцитов и Ат гемолитической сыворотки /.

Основной раствор комплемента /1:10/ разливают в ряд пробирок от 0,05 до 0,5 мл и добавляют в каждую изотонический раствор натрия хлорида, доводя объем жидкости до 1,5 мл. Затем в каждую пробирку вносят гемолитическую систему. Инкубируют в термостате при 37 в течении 1 часа. Результат реакции учитывают по феномену гемолиза.

Титр комплемента - наименьшее его количество, при котором наблюдается полный гемолиз. Рабочая доза комплемента представляет собой титр, увеличенный на 25 - 30%.

Схема основного опыта РСК для определения антител в сыворотке больного представлена в таблице 1. Вначале смешивают в опытных пробирках реагенты первой системы: разведения исследуемой сыворотки, антиген и комплемент, взятые в рабочих дозах. Смесь инкубируют при 37 в течении 1 часа. Затем во все пробирки прибавляют вторую систему - сенсibilизированные эритроциты и вновь инкубируют при температуре 37 1 час.

Реакцию сопровождают контролями: контроль сыворотки на антикомплементарность - смесь исследуемой сыворотки в разведении 1:10, комплемент в рабочей дозе, сенсibilизированные эритроциты, раствор хлорида натрия вместо антигена; контроль антигена на антикомплементарность смесь антигена, раствор хлорида натрия / вместо сыворотки /, комплемента, сенсibilизированных эритроцитов.

Результаты реакции предварительно учитывают сразу после извлечения пробирок из термостата, окончательно - после выдерживания в холодильнике /4 С/ через 15 - 18 часов при условии обязательного наличия полного гемолиза в контролях сыворотки и антигена.

В зависимости от степени гемолиза в опытных пробирках, РСК оценивают по четырехплюсовой системе следующим образом: резко положительная реакция - полная /почти полная/ задержка гемолиза, жидкость бесцветная или бледно-розового цвета, все /почти все/ эритроциты в осадке /++++, +++/ ; положительная реакция - частичная задержка гемолиза, жидкость слегка окрашена, компактный осадок эритроцитов /++/ ; сомнительная реакция - слабая задержка гемолиза, жидкость интенсивно окрашена в розовый цвет, незначительный осадок эритроцитов /+/ ; отрицательная реакция - полный гемолиз, отсутствие осадка эритроцитов / - /.

Исходя из полученных результатов определяют титр антител в исследуемой сыворотке, подразумевая под этим наибольшие разведение сыворотки, при котором происходит частичная задержка гемолиза.

* * *

Занятие № 21. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КУЛЬТУР. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. ДИАГНОСТИКУМЫ. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СЫВОРОТКИ

Цель занятия:

Изучить практическое значение применения серологических методов исследования для диагностики инфекционных заболеваний и серологической идентификации чистых культур микроорганизмов.

Студент должен: Знать:

- серологический метод исследования, его значение в прикладной иммунологии
- Уметь:
- выбрать материал для исследования с целью выявления антигена бактерий и серодиагностики заболевания;

- выбрать метод исследования.
- Овладеть навыками:
- учета и оценки РА, РНГА, РП, РИФ, ИФА, РСК.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Серологические методы исследования проводятся с применением комплекса серологических реакций, основанных на взаимодействии антигенов с антителами. Термин "серологический" происходит от латинского слова *serum* - сыворотка.

Сыворотки могут быть получены путем иммунизации животных соответствующим антигеном, т. е. содержат специфические антитела к этому антигену. Это – иммунодиагностические сыворотки и используются для определения антигена.

Могут исследоваться сыворотки крови пациентов для выявления в них антител к предполагаемому возбудителю. Это – исследуемая сыворотка.

2. ЦЕЛЬ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Серологические реакции применяют в серологических методах исследования, которые используются в микробиологии с целью:

- серологической идентификации выделенной чистой культуры микроорганизма;
- серологической диагностики инфекционных и неинфекционных (аутоиммунных) заболеваний;
- определения активности лечебных и диагностических иммунных сывороток и анатоксинов при их производственном изготовлении;
- изучения антигенной структуры микроорганизма и сложных антигенных комплексов в исследовательских целях;
- экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и экспресс-индикации путем определения антигенов возбудителя;
- определения классов иммуноглобулинов для прогнозирования течения инфекционного процесса;
- определения концентрации иммуноглобулинов разных классов при оценке иммунного статуса организма.

3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА С ЦЕЛЬЮ:

а) ИДЕНТИФИКАЦИИ ВЫДЕЛЕННОЙ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ;

Серологическая идентификация - определение вида (серовара) микроорганизма по результатам реакций с известными групповыми, варо-специфическими диагностическими иммунными сыворотками. Серологическая идентификация является одним из методов комплексной идентификации чистой культуры, самостоятельного диагностического значения не имеет и применяется при проведении бактериологического метода диагностики инфекционных заболеваний.

Серологическая идентификация выделенной чистой культуры основана на выявлении видо- и вариантоспецифических (варо-специфических) антигенов в составе микробных клеток. Для этого чаще других применяется реакция агглютинации на стекле ввиду простоты ее постановки и быстроты получения результата. Остальные серологические реакции (РП, РСК, РОНГА, ИФА и др.) применяются реже.

Реакцию агглютинации проводят на предметных стеклах (ее называют еще ориентировочной реакцией агглютинации). На обезжиренное предметное стекло наносят несколько капель иммунных диагностических сывороток и каплю изотонического раствора натрия хлорида (контроль). В каждую каплю (сыворотки и контроля) вносят культуру выделенных микробов, взятой бактериологической петлей с поверхности плотной питательной среды, либо каплю взвеси выделенной чистой культуры. Внесенную культуру тщательно перемешивают для получения равномерной мутной взвеси. Реакция происходит при комнатной температуре, ее учитывают невооруженным глазом через 5-10 минут.

Положительная реакция проявляется в образовании хлопьев, которые хорошо видны при покачивании предметного стекла. Реакция считается отрицательной, если жидкость остается равномерно мутной.

Идентификация выделенной чистой культуры микробов проводится также с помощью реакции агглютинации в пробирках с разведениями до титра видоспецифической диагностической агглютинирующей сыворотки. Такую реакцию называют еще реакцией агглютинации (детали постановки реакции описаны в Методических указаниях для подготовки к практическому занятию № 16).

б) ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ.

Методы экспресс-диагностики применяют для выявления возбудителя в исследуемом материале от больного или в объектах внешней среды путем определения антигенов микроорганизма. Экспрессный характер такого исследования определяется сравнительно быстрым выявлением возбудителя (за несколько часов). Одновременно эти методы являются методами ранней диагностики, так как выявление антигенов возбудителя возможно в ранние сроки заболевания. Выявление антигенов возбудителя для обнаружения и ориентировочной идентификации его без выделения чистой культуры проводится с помощью различных серологических реакций. Наиболее употребляемыми в диагностике бактериальных инфекций является реакция иммунофлюоресценции (РИФ), реакция преципитации (РП) и ее варианты (в геле и встречный иммуноэлектрофорез), РСК, РОНГА, РТНГА, ИФА; к ним можно отнести РН для определения токсинов (биологическая проба на белых мышах и метод обнаружения ботулинического токсина с помощью фагоцитарного показателя по С.М.Минервину). Детали применения указанных реакций изложены в соответствующих методических указаниях для подготовки к практическим занятиям.

Следует иметь в виду, что для постановки реакций с целью экспресс-диагностики используют диагностические высокоспецифические и высокоактивные иммунные сыворотки, а также моноклональные антитела.

4. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СЫВОРОТКИ, ИХ ПОЛУЧЕНИЕ, ТИТРОВАНИЕ. МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА. МЕЧЕННЫЕ АНТИТЕЛА.

Иммунные сыворотки различают по назначению, использованию и по характеру антигенов, которую используют для иммунизации, а следовательно по характеру антител.

Различают лечебно-профилактические (антитоксические, антибактериальные и противовирусные) и диагностические сыворотки - против различных антигенов бактериального и вирусного происхождения, сыворотка против С-реактивного белка, сыворотки против различных тканевых антигенов.

Для получения диагностических сывороток используют мелких лабораторных животных, преимущественно кроликов, реже морских свинок; если необходимо большое количество сыворотки - коз, баранов, лошадей. Животных иммунизируют убитыми микроор-

организмами, анатоксинами, различными антигенами. Затем получают сыворотку, очищают от перекрестно реагирующих антител по Каселлани, и для установления активности - титруют. За титр сыворотки принимают то наибольшее разведение сыворотки, при котором еще проявляется реакция.

Диагностические сыворотки применяют для постановки различных иммунологических реакций с целью установления (определения) видоспецифических и вариантоспецифических (вароспецифических) антигенов возбудителя инфекционного заболевания, определения различных антигенов в биологических жидкостях. В сыворотках содержатся антитела, которые, в зависимости от иммунологической реакции (РА, РП, РСК, и др.), называются агглютининами, преципитинами, комплементсвязывающими и др. Поэтому различают агглютинирующие, преципитирующие, флюоресцирующие, гемолитические, меченые изотопами, ферментами и др. диагностические сыворотки.

В клинике используют (применяют) диагностические сыворотки для определения группы крови, иммунологического статуса организма, резус-принадлежности крови, тканевого биопсирования (антигены гистогсовместимости).

Антибактериальные диагностические сыворотки обычно используют как агглютинирующие. По степени специфичности их разделяют на неадсорбированные (нативные) и адсорбированные, содержащие антитела к нескольким антигенам или нескольким детерминантным группам антигенов (поливалентные) и монорецепторные, которые содержат антитела к одному антигену. В настоящее время все шире стремятся использовать более специфичные и активные моноклональные антитела.

Иммунные сыворотки, полученные путем иммунизации животных, как правило содержат гетерогенные антитела, которые способны агглютинировать родственные бактерии, имеющие общие (сходные) антигены, что влияет на объективность результатов иммунологических реакций и их специфичность.

Моноклональные антитела. До середины 1970 г. Единственным способом получения больших количеств специфических антител была иммунизация животных как можно более очищенным антигеном. Но такой антиген все еще содержал много эпиготов. Следовательно, антитела в таких сыворотках были поликлональными антителами, с различными антителами, выработанными на каждый эпитоп. Высоко специфичные сыворотки могли бы быть получены из поликлональных антител дотошным удалением нежелательных антител. Это достигалось путем мно

гократного смешивания цельной иммунной сыворотки с антигенами, содержащими нежелательные эпитопы. Однако, этот процесс (реакция истощения по Каstellани) не мог гарантировать полного удаления всех нежелательных (перекрестно реагирующих) антител.

В настоящее время моноклональные антитела продуцируются изолированным клоном генетически идентичных клеток, происходящих из единственной стимулированной антителообразующей клетки. Они могут быть получены в большом количестве, используя специальные клетки, называемые гибридомой. Г.Кёлер и Ц.Мильштейн разработали этот метод в 1975 году в Кембридже, (Англия). В 1984 они были удостоены за это исследование Нобелевской премии.

В-лимфоциты, продуцирующие антитела, подобно любым другим клеткам могут стать злокачественными. Миеломная болезнь - рак, или беспрепятственная пролиферация антителообразующих клеток. Поскольку миелома начинается из единственной клетки, все ее потомство представляет собой клон идентичных лимфоцитов. Антитела, продуцируемые этими лимфоцитами - гомогенные, потому что выработаны отдельным гомогенным клоном клеток. Такие антитела - моноклональные антитела. К сожалению, моноклональное антитело, продуцируемое миеломными клетками специфичны в отношении обычно неизвестного антигена, потому что развитие миеломы случайно.

Было невозможным индуцировать миелому, специфичную для определенного антигена, пока Кёлер и Мильштейн не нашли решение этой проблемы. Они разработали способ объединения миеломной клетки с нормальной иммунной клеткой селезенки, предетерминированной к синтезу определенного антитела. При этом, они получали «гибридную» клетку, которая обладала свойствами обоих типов клетки. Они достигли этого, гибридуя миеломную клетку с антителообразующими клетками селезенки иммунизированной мыши. В результате получали искусственно созданную клетку, названную гибридомой, которая является по существу антителообразующей фабрикой. В таких клетках вклад миеломной клетки обеспечивает «бессмертие» (неограниченная быстрая пролиферация) и таким образом производство большого количества моноклональных антител; вклад иммунного лимфоцита обеспечивает информацию для специфичности антитела.

Техника создания гибридомных клеток и моноклональных антител показана на рис.

По этой методике мыши иммунизируются обычным способом вакциной, которая содержит специфический антиген, против которого требуется получить специфический антитела. Для этого не требуется использовать специально очищенный антиген, содержащий только нужный эпитоп. Каждый из эпитопов антигена стимулирует специфический клон В-лимфоцитов. Таким образом, один антиген может стимулировать множество специфических клонов В-клеток.

Селезенку удаляют, и суспензию клеток селезенки смешивают с суспензией миеломных клеток мыши.

К смеси добавляют полиэтиленгликоль, который обеспечивает соединение лимфоцитов с миеломными клетками, чтобы



Рис. 40. СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДОМ И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

стать гибридомой. Каждая гибридомная клетка пролиферирует и дает массивный клон клеток, каждая из которых продуцирует специфическое антитело

Затем гибридомные клетки переносят по отдельности в индивидуальные лунки пластиковых планшетов и инкубируют для размножения и накопления клонов. Каждый гибридомный клон может производить моноклональное антитело; антитела в каждой лунке тестируются для определения, какая именно гибридома продуцирует нужное антитело (первоначальный антиген не должен быть высоко очищенным). Как только специфическая гибридома идентифицирована, она может быть реклонирована в

культуре клеток либо путем введения в перитонеальную полость животных. Клеточная культура образует приблизительно 100 мкг моноклональных антител в 1 миллилитре культуральной жидкости; в культуре *in vivo* продуцируется примерно 100 мкг и больше моноклональных антител в 1 мл перитонеальной жидкости.

Моноклональные антитела имеют значение потому, что они гомогенны, высоко специфичны и могут получаться в больших количествах. Они связываются с одним и только одним антигеном, поэтому моносpezifичны.

Моноклональные антитела стали очень важным инструментом биомедицинских исследований; в 1981, например, они позволили исследователям определить клеток иммунной системы, которые поражаются вирусом СПИДа.

Моноклональные антитела становятся также все более и более важными в диагностической и терапевтической медицине. Предлагается использование моноклональных антител для лечения рака человека, моноклональные антитела экспериментально используются для уничтожения клеток опухоли. Моноклональные антитела могут быть помечены радиоактивными изотопами, чтобы определять локализацию опухоли и доставлять смертельные дозы радиации к недоступным опухолям, в то время как нормальные клетки остаются нетронутыми.

Моноклональные антитела могут также использоваться, чтобы таким же образом доставлять противораковые средства к опухолевым клеткам.

Налажено коммерческое производство диагностических наборов с использованием специфических моноклональных антител для диагностики аллергических болезней. Также моноклональные антитела стали чрезвычайно полезными в дифференциации бесчисленных видов и вариантов микроорганизмов.

Кёлер и Мильштейн никогда не патентовали свое открытие! А стоимость коммерчески произведенных моноклональных антител составляет теперь ежегодно миллионы долларов.

В настоящее время моноклональные антитела все чаще используются в диагностической практике в иммуноферментном и иммунофлюоресцентном анализе. Применение моноклональных антител существенно повышает точность диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний, поэтому будущее - за самым широким использованием моноклональных антител.

Меченые антитела - антитела, меченые различными метками; которые выявляются под микроскопом либо с помощью определен-

ных серологических реакций.

Наиболее часто применяются следующие метки:

(1) флюорохромы (люминофоры) - родамин, аурамин, ферритин (белок, содержащий до 23% железа), ДИТЦ, которые под влиянием ультрафиолетовых лучей способны флюоресцировать (светиться). Например: антитела, обработанные флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) применяются в РИФ, комплекс антиген-антитело определяют по интенсивному желто-зеленому свечению при микроскопии препарата под люминесцентным микроскопом;

(2) ферменты, которые при взаимодействии с субстратом обуславливают его распад с образованием окрашенных продуктов; используются для проведения ИФА;

(3) радиоактивные метки (изотопы). Чаще всего метят I^{125} - радиоактивный (изотоп) йод; применяются в РИА.

Серологические реакции с применением меченых антител, как правило, являются высокочувствительными, позволяют сравнительно быстро получать результат и нашли применение для экспресс-диагностики бактериальных и вирусных заболеваний.

5. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ С ЦЕЛЬЮ СЕРОДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ (СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА)

Серологическая диагностика - диагностика заболевания путем выявления в сыворотке больного антител к возбудителю с помощью известных антигенов (диагностикумов).

Серологическая диагностика является косвенным методом диагностики, так как диагноз основывается не на непосредственном выявлении самого возбудителя, а на обнаружении антител (иммуноглобулинов), которые являются следствием специфических изменений в организме, вызванных воздействием возбудителя заболевания.

Следует учесть, что антитела к антигенам многих микроорганизмов могут быть обнаружены практически у любого человека и к любым возбудителям, однако титр антител очень низок (1:2 - 1:10). Это так называемые нормальные антитела, а также антитела к общим, перекрестно реагирующим антигенам различных микроорганизмов. Обнаружение антител в низких титрах не имеет диагностического значения.

Основанием для установления серологического диагноза является не только выявление антител, а наличие в сыворотке антител в высоких титрах. На основании многочисленных наблюдений эмпирически установлены диагностические титры антител к возбудите-

лю. **Диагностический титр** - это титр антител к определенному возбудителю, встречающийся у больных и не встречающийся у здоровых.

Диагностические титры антител при различных инфекционных заболеваниях и при использовании различных серологических реакций не одинаковы (различны) не только во время инфекционного заболевания, но и после перенесенного заболевания, либо в результате скрытой инфекции. В ряде случаев после таких инфекционных процессов высокие титры антител могут сохраняться длительное время. Кроме того, во время заболеваний, вызванных другими возбудителями, происходит выраженный подъем титров антител к возбудителям, с которыми организм контактировал раньше. Повышение антител до диагностических титров и выше в результате перенесенного заболевания, либо скрытой инфекции называется анамнестической реакцией.

В связи с проведением вакцинопрофилактики многих инфекционных заболеваний высокие титры антител могут наблюдаться и у привитых (вакцинированных), что называют прививочной реакцией. Анамнестические и прививочные реакции осложняют интерпретацию (оценку) результатов серологической диагностики и могут приводить к ошибочному диагнозу (выводу). Общие правила: чем выше титр обнаруженных антител - тем больше оснований для установления серологического диагноза. Однако при этом необходимо учитывать клинические симптомы заболевания (выраженность) и сведения о прививках. При выраженных симптомах заболевания обнаружение антител в реакции агглютинации в титрах 1:100 и выше является основанием для установления диагноза.

Однако при постановке серологических реакций в динамике заболевания титры антител к возбудителю могут и не достигать диагностических. Это может быть связано с тем, что в начале заболевания антитела накапливаются в небольших количествах и высокие титры можно обнаружить не ранее чем через 8-10 дней от начала клинических проявлений заболевания. Кроме того, низкие титры антител могут быть результатом применения антибиотиков для лечения некоторых больных вследствие иммунодефицитных состояний (первичные, либо чаще, вторичные иммунодефицит).

При серологической диагностике нельзя ориентироваться только на высокие титры антител: наличие антител в диагностических титрах не всегда свидетельствует о наличии заболевания, а отсутствие антител в диагностическом титре не всегда говорит об отсутствии заболевания.

Достоверным признаком протекающего заболевания является установление нарастания титров антител в момент серологического исследования, что служит свидетельством синтеза антител во время течения заболевания. Анамнестические и прививочные реакции характеризуются постоянством титров антител либо даже их снижением. Поэтому для дифференциации текущего заболевания от прививочных и анамнестических реакций проводят определение динамики нарастания титров антител, используя при этом парные сыворотки. Определяют титр антител в сыворотках, взятых в начале заболевания и через 7-14 дней. Первая сыворотка хранится в холодильнике и исследуется на наличие антител одновременно со второй. Если титр антител во второй сыворотке превышает титр антител в первой сыворотке в 4 раза и больше, то такое нарастание титра антител служит основанием для подтверждения диагноза. Определение диагностического нарастания титров антител в парных сыворотках является основным методом подтверждения серологического диагноза при всех инфекционных заболеваниях. Более того, диагностическое нарастание титра антител к микроорганизму, выделенному от больного, является доказательством этиологической причастности этого микроорганизма к возникновению и развитию заболевания.

Установление факта синтеза антител возможно и при исследовании одной сыворотки, взятой в середине заболевания, если учитывать динамику синтеза антител, относящихся к разным классам иммуноглобулинов. Известно, что в ответ на антиген вначале синтезируются антитела, относящиеся к IgM, а затем происходит переключение на синтез антител, относящихся к IgG. После заболевания IgM быстро выводятся из организма, так как их период полувыведения очень короткий - 2-3 дня; IgG, наоборот, позднее появляются (на 8-10 день), но длительно сохраняются, так как их период полувыведения составляет 23 дня. При анамнестических реакциях сохраняются только IgG. Следовательно, обнаружение в сыворотке больного антител класса IgM свидетельствует о протекающем заболевании, а наличие антител класса IgG - об анамнестической или прививочной реакции.

Для определения динамики синтеза антител, принадлежащих к разным классам, с целью дифференциации текущего заболевания от анамнестических и прививочных реакций поступают следующим образом. Взятую от больного сыворотку делят на две порции, одну из них обрабатывают 2-меркаптоэтанолом, который разрушает активность антител класса IgM и не действует на антитела класса IgG, определяют титр антител к предполагаемому возбудителю одновременно в обеих порциях сыворотки. Если после обработки титр анти-

тел резко снижен, следовательно произошло это вследствие разрушения активности антител класса IgM, что является подтверждением текущего заболевания. Если же титры антител в обработанной и необработанной порциях существенно не различаются (IgG сохраняют свою активность), то это свидетельствует об анамнестической либо прививочной реакции.

При заболеваниях, вызванных сальмонелами брюшного тифа, паратифа А и паратифа В, дифференциация текущего заболевания от анамнестических и прививочных реакций проводится путем отдельного выявления (определения) антител к О-антигену (смазочному) и Н-антигену (жгутиковому). Эмпирически установлено, что антитела к О-антигену появляются при заболевании рано, но быстро исчезают после заболевания, а к Н-антигену - появляются позже, но длительно сохраняются. Такая динамика к О- и Н-антигенам в настоящее время объясняется тем, что на глицидолипидный О-антиген сальмонелл вырабатываются только антитела, относящиеся к IgM, а на белковый Н-антиген - IgG. Учитывая это, при серологической диагностике брюшного тифа и паратифов для дифференциации текущего заболевания от анамнестической и прививочной реакции применяют реакцию агглютинации (реакция Видаля) с использованием О- и Н-диагностикумов.

КРИТЕРИИ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ДИАГНОЗА:

- ✓ выявление в сыворотке больного антител к возбудителю в диагностическом титре;
- ✓ выявление диагностического нарастания титра антител к возбудителю в парных сыворотках;
- ✓ выявление в сыворотке больного антител к возбудителю класса IgM.

6. ДИАГНОСТИКУМЫ

Диагностикумы (греч. *diagnostikos* - способный распознавать) - препараты, состоящие из микроорганизмов известного вида (серовара), инактивированных или живых, или же из антигенов возбудителя. Диагностикумы применяются для серологической диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний.

В зависимости от серологической реакции в качестве диагностикумов используют убитые микроорганизмы (РА, РСК), токсины (стандартные) бактерий (РН), химические антигены из возбудителей (РСК, ИФА). В реакциях ИФА, для постановки которых требуются небольшие количества антигена, нередко используют синтетические и генно-инженерные антигены.

Иногда в качестве диагностикума могут использоваться и живые возбудители, например, при постановке реакции нейтрализации на культурах клеток во время серологической диагностики полиомиелита.

Различают диагностикумы нативные и эритроцитарные. Эритроцитарные диагностикумы содержат антигены, фиксированные на эритроцитах и применяют в РНГА. Антительные эритроцитарные диагностикумы - препараты из эритроцитов, на которых фиксированы антитела, используют для выявления антигенов в реакции обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА).

На практике используют обычно готовые диагностикумы, которые производятся в соответствующих лабораториях НИИ вакцин и сывороток и на предприятиях по производству бактериальных препаратов.

* * *

Занятие № 22. АЛЛЕРГИЯ

Цель занятия:

Изучить:

Общую характеристику аллергии и ее значение в патологии человека.

Студент должен:

Знать:

- определение понятий «аллергия», «аллерген», классификацию аллергических реакций, понятие об аутоиммунных реакциях;
- механизм и динамику развития аллергических реакций;
- методы диагностики, лечения и профилактики аллергических заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. АЛЛЕРГИЯ. АЛЛЕРГЕН

Реакции иммунной системы на антиген могут быть выражены не только в синтезе антител, иммунологической памяти, иммунологической толерантности, идиотип-антиидиотипических, а также и в в аллергических реакциях. Аллергия является одной из форм иммунных реакций организма.

Иммунная система организма выполняет преимущественно защитную функцию, осуществляя генетический гомеостаз, включая и защиту от инфекционных агентов. Однако, не всегда работа иммунной системы оказывается только полезной для организма. Иммунные реакции на чужеродные для организма, как инфекционные, так и неинфекционные антигены могут сопровождаться повреждением тканей, а иногда иммунная система развивает аутоагрессию против собственных тканей. Такие реакции относят к иммунопатологическим. Среди них выделяют реакции, обусловленные повторным контактом организма с чужеродным антигеном, называемые аллергическими реакциями. Если аллергические реакции играют заметную роль в патогенезе заболевания, то говорят об аллергических болезнях.

Аллергические болезни в настоящее время широко распространены. Важность проблемы аллергических заболеваний обусловила необходимость выделения самостоятельной науки - аллергологии, существует врачебная специальность - аллерголог, созданы и функционируют аллергологические кабинеты в системе практического здравоохранения. В той или иной форме аллергические процессы отмечаются при многих заболеваниях, применение ряда лекарственных и профилактических средств может сопровождаться нежелательными аллергическими осложнениями, поэтому врач должен иметь достаточно полное представление о механизмах аллергии и способах предупреждения и борьбы с аллергическими процессами.

А л л е р г и я - повышенная чувствительность организма к повторному контакту с антигеном. Термин был предложен венским педиатром К.Пирке в 1906 г. и в переводе означает "измененная реактивность" (allos - иной, ergo - реагирую). Пирке полагал, что измененная чувствительность может быть как повышенной, так и пониженной, причем к последней относил состояние невосприимчивости организма, иммунитет. В настоящее время под аллергией понимают только повышенную чувствительность. Поэтому нередко в качестве синонима термина аллергия употребляют термины "гиперчувстви-

тельность", "гиперсенсibilизация".

Аллерген - антиген, вызывающий развитие повышенной чувствительности и дающий аллергические реакции при контакте с сенсibilизированным организмом, т.е. обладающим повышенной чувствительностью. Аллергенные свойства - способность антигена вызывать и выявлять состояние гиперчувствительности.

В настоящее время учение об аллергии - развитая отрасль медицины и иммунологии, при изучении различных клинических дисциплин студенты будут знакомиться с аллергическими процессами на разных кафедрах. Механизмы аллергических реакций подробно будут изучаться на кафедре патологической физиологии. В курсе иммунологии на нашей кафедре мы касаемся лишь некоторых, в основном - иммунологических, аспектов учения об аллергии, необходимых для дальнейшего изучения нашего предмета и смежных дисциплин. При этом в первую очередь нас будут интересовать аллергические реакции при инфекционных процессах, а также при введении вакцинно-сывороточных препаратов. Кроме того, мы должны познакомиться с аллергическим методом диагностики инфекционных заболеваний..

2. АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ I ТИПА (АНАФИЛАКТИЧЕСКИЕ И АТОПИЧЕСКИЕ). АНАФИЛАКТИЧЕСКИЙ ШОК. АТОПИЧЕСКИЕ БОЛЕЗНИ

Существует много различных классификаций аллергии. Мы будем пользоваться классификацией Кумбса и Джелла, наиболее отвечающей запросам клиники. Ниже приводим таблицу типов аллергических реакций, которая демонстрирует характеристику 4-х основных типов аллергических реакций. Иногда в эту классификацию включают еще и дополнительные типы аллергических реакций, но мы считаем достаточным на данном этапе изучения вопроса рассмотреть лишь основные четыре типа гиперчувствительности.

Приведенная классификация аллергических реакций используется клиницистами и патологами, однако сохраняется также и ранее широко применявшееся деление аллергических реакций на реакции гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) и реакции замедленного типа (ГЗТ). Такое деление основывалось на времени наступления аллергических реакций после контакта антигена с сенсibilизированным организмом.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГНТ И ГЗТ

Характеристика	Гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ)	Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ)
Время реакции	Через 15-30 мин после контакта с аллергеном	Через 24 - 48 ч, иногда - через 72 ч (проба Манту)
Основное проявление реакции	Гиперемия, отек на месте реакции	Припухлость с инфильтрацией моноцитарными элементами
Место реакции	В органах, богатых кровеносными сосудами, в крови, сосудах и гладкой мускулатуре	Реакции чаще протекают при длительном контакте аллергена с кожей, а также в органах
Пассивный перенос сенсибилизации	Сывороткой крови сенсибилизированного организма	Лейкоцитами крови и клетками лимфоидных органов
Терапия	Часто помогают антигистаминные препараты	Антигистаминные препараты неэффективны
Механизм реакции	Взаимодействие аллергена с циркулирующими или фиксированными антителами	Взаимодействие аллергена с рецепторами сенсибилизированных Т-лимфоцитов

Аллергия немедленного типа проявляется через 15 - 30 минут, а аллергия замедленного типа через 24 - 48 - 72 часа после контакта с аллергеном.

Основные проявления реакции ГНТ - гиперемия, отек на месте реакции, ГЗТ - припухлость вследствие инфильтрации моноцитарными клеточными элементами. Реакции ГНТ развиваются в органах, которые богаты кровеносными сосудами и гладкой мускулатурой.

Реакции ГЗТ часто развиваются при длительном контакте аллергена с кожей и органами. Пассивная передача ГНТ может быть при введении сыворотки крови сенсибилизированного организма, ГЗТ - при введении лейкоцитов крови и лимфоидных органов. Антигистаминные препараты часто помогают при лечении ГНТ, но не ГЗТ.

Основное отличие ГНТ от ГЗТ - механизм реакции. Реакции немедленной гиперчувствительности развиваются в результате взаимодействия антигена - аллергена с антителами, а реакции замедлен-

ного типа - клеточные, развивающиеся вследствие специфического взаимодействия аллергена с рецепторами сенсibilизированных лимфоцитов, приводящего к выделению лимфокинов и формированию гиперергического воспаления.

ХАРАКТЕРИСТИКА ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ I ТИПА

Реакции I типа называются анафилактическими и атопическими. Как правило, они вызываются парентеральным введением чужеродных сывороток, антибиотиков или других лекарственных средств (анафилактические), либо контактом с экзогенными аллергенами - пылью растений, компонентами домашней пыли (в частности - экскрементами домового клеща *Dermatophagoides pteronyssinus*) и др.

Анафилаксия (греч. *ana* - наоборот, *phylaxis* - защита) - повышенная чувствительность организма к повторному парентеральному контакту с антигеном.

Первую дозу антигена (белка), вызывающего повышенную чувствительность, называют **сенсibilизирующей** (лат. *sensibilitas* - чувствительность), вторую дозу, от введения которой развивается анафилаксия, - **разрешающей**. Сенсibilизирующую дозу вводят животным подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно, внутрисердечно, разрешающую - внутривенно или внутрисердечно и в большей дозе, чем сенсibilизирующую.

Состояние повышенной чувствительности у животных развивается не сразу, а спустя определенный - инкубационный - период (8—21 день). Клиническая картина анафилаксии у животных разных видов неодинакова. Наиболее демонстративно она воспроизводится у морских свинок. Если предварительно сенсibilизировать морскую свинку подкожным введением 0,01 мл лошадиной сыворотки, а затем через 8—21 день внутрисердечно ввести ей 0,1—0,5 мл той же сыворотки, то у нее развивается картина **анафилактического шока**.

Через 1—2 мин после повторного введения у морской свинки появляется беспокойство, шерсть становится взъерошенной; морская свинка чешет лапки и нос, отмечаются непроизвольное выделение мочи и кала, чиханье, резкая одышка, тонические и клонические судороги, дыхание замедленное и затрудненное. Через 5—10 мин животное погибает от асфиксии при явлениях падения температуры, уменьшения количества комплемента и понижения свертываемости крови.

КЛАССИФИКАЦИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПО COOMBS И GELL

Тип	Наименование типа реакции	Основные механизмы иммунопатологических реакций	Примеры клинических проявлений
	Анафилактические и атопические	Реакция антигена с цитотропными IgE- антителами, фиксированными на тучных клетках и базофилах, с высвобождением медиаторов типа гистамина и повреждением тканей организма	Атопическая бронхиальная астма, другие атопические болезни, анафилактический шок
III	Цитотоксические	Взаимодействие IgG - антител с антигенами, фиксированными на клеточных мембранах, цитолиз вследствие активации комплемента комплексом антиген-антитело	Лекарственная аллергия, аутоиммунные болезни, гемотрансфузионные осложнения
III	Иммунокомплексные	Циркулирующие комплексы преципитирующих антител с избытком антигена осаждаются на стенках мелких сосудов, повреждая эндотелий вследствие активации комплемента и лейкоцитов	Сывороточная болезнь, коллагенозы осложнения инфекционных заболеваний
IV	Клеточный (реакции замедленного типа)	Реакция антигена с рецепторами сенсibilизированных Т-лимфоцитов, выделение лимфокинов, развитие гиперергического воспаления с участием цитотоксических реакций макрофагов	Инфекционная аллергия, контактная аллергия, трансплантационный иммунитет, иммунитет к опухолям

На вскрытии обнаруживают эмфизему легких вследствие спазма мышц бронхов, несвертываемость крови, гиперемию и кровоизлияния в слизистой оболочке желудка, кишечника и других органах. У собак анафилаксия сопровождается спазмом печеночных вен,

вызывающим застойные явления в печени и недостаточное поступление крови в сердце; животное погибает при явлениях коллапса.

У кроликов анафилаксия характеризуется спазмом концевых артерий малого круга кровообращения и блокадой легочного кровообращения, падением кровяного давления в большом круге кровообращения, замедлением деятельности сердца и резким расширением правого желудочка. Смерть наступает от остановки дыхания и падения кровяного давления.

У человека наблюдаются все три типа анафилаксии. Однако, доминирует тип, характерный для морских свинок. Спазм гладкой мускулатуры является существенным в механизме развития анафилаксии.

Анафилактический шок у людей возникает вследствие повторных введений гетерогенных иммунных сывороток при лечении больных различными инфекционными заболеваниями (дифтерия, столбняк, сибирская язва, анаэробная инфекция), а также антибиотиков (пенициллин и др.). Он характеризуется рядом симптомов: одышка, частый пульс, падение артериального давления, снижение температуры тела, судороги, спазм бронхов, отеки, боли в суставах, сыпь на теле и др. В некоторых случаях шок заканчивается смертью.

В механизме анафилаксии существенную роль играет реакция антигена и антитела в тканях, сопровождающаяся продукцией гистамина, серотонина, гепарина, брадикинина и др. Комплекс антигена с антителом (IgE), фиксированным на клетках, стимулирует клетки, и патологический процесс развивается в тканях, в результате чего наступает спазм гладкой мускулатуры.

Наличие в крови IgM и IgG снижает повышенную чувствительность, так как цитофильные IgE лишены возможности соединяться с антигеном. Аллергические реакции вообще и анафилаксия в особенности представляют собой весьма сложные процессы, присущие сравнительно высоко организованным организмам, обладающим свойством реактивности; им предшествовали простые формы паразитизма, септические и токсические инфекции.

Пассивная анафилаксия. Повышенную чувствительность можно воспроизвести у нормальных морских свинок пассивным путем, т. е. инъекцией иммунной сыворотки сенсibilизированных животных. Состояние сенсibilизации у них появляется не сразу, а через 24 ч после подкожного, через 12 ч после внутрибрюшинного и через 4 ч после внутривенного введения; повышенная чувствительность сохраняется у свинок от 3—4 нед до 2 мес.

Десенсibilизация (антианафилаксия). Если разрешающая до-

за не вызвала анафилаксию, то животное утрачивает повышенную чувствительность к этому антигену, десенсибилизируется на 2—3 нед, затем снова становится чувствительным, иногда в еще большей степени. Десенсибилизация наступает и после перенесенной анафилаксии.

К реакциям I типа относятся также атопии (греч. atopos—

необычный, странный), которые представляют собой естественную сверхчувствительность, возникающую спонтанно у предрасположенных к аллергии людей. Они в отличие от анафилаксии встречаются преимущественно у человека. В эту группу заболеваний входят поллинозы (аллергический насморк или сенная лихорадка), атопическая бронхиальная астма, ангионевротический отек Квинке, крапивница, экзема новорожденных, пищевая аллергия к яичному белку, мясу, ракам, землянике и др., лекарственная аллергия к йоду, хлороформу, антибиотикам и др. Атопии обуславливаются появлением у отдельных людей особых антител — реактинов (IgE), обладающих кожно-сенсibiliзирующей активностью и способностью фиксироваться на клетках различных органов и тканей. В патогенезе атопических реакций важное значение имеет наследственная предрасположенность, реализуемая с помощью аллельных генов

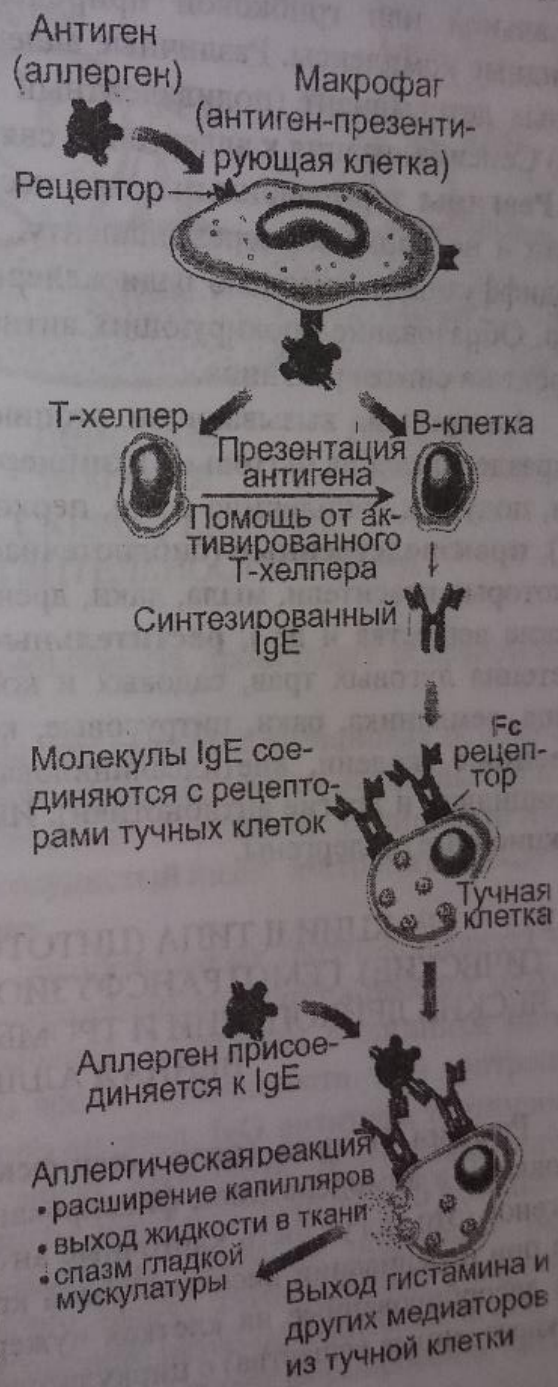


Рис. 41. СХЕМА РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ I ТИПА.

H и **h** (генотип **HH**-здоровый, **hh**-аллергический). У половины больных в анамнезе отмечается аналогичное заболевание родителей. Свыше 10% населения мира страдают атопией. Атопические реакции поддаются десенсибилизации.

Активность аллергенов определяется их структурой и расположением детерминантных групп в молекуле. Аллергены бывают бактериальной или грибковой природы, протеиново-полисахаридно-липидные комплексы. Различные аллергены имеют комплексы антигенных детерминант (поливалентный характер аллергических реакций) Сенсibilизация к аллергенам связана с образованием антител.

Реагины термолабильны, они неспособны к фиксации компонента и не проходят через плаценту. Реагины выявляются в иммунодиффузии, с помощью радиоаллергосорбентного метода, в ИФА и др. Образование блокирующих антител оказывает ингибирующий эффект на синтез реагинов.

Аллергены, вызывающие атопию, называются **атопенами** и подразделяются на **бытовые** и **эпидермальные** (пыль пуховых перин, подушек, эпидермис кожи, перхоть собак, кошек, лошадей и др.), **производственные** (библиотечная пыль, пыль шерсти, хлопка, некоторые красители, мыла, лаки, древесина, взрывчатые и синтетические вещества и др.), **растительные** (пыльца растений во время цветения луговых трав, садовых и комнатных растений), **пищевые** (яйца, земляника, раки, цитрусовые, кофе, шоколад и др.), **лекарственные** (кодеин, ацетилсалициловая кислота, сульфаниламиды, пенициллин и другие антибиотики). Имеются также микробные (инфекционные) аллергены.

3. РЕАКЦИИ II ТИПА (ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И ЦИТОЛИТИЧЕСКИЕ). ГЕМОТРАНСФУЗИОННЫЙ ШОК. ГЕМОЛИТИЧЕСКИЕ ЛЕЙКОПЕНИИ И ТРОМБОЦИТОПЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННАЯ АЛЛЕРГИЯ.

Реакции II типа (цитотоксические и цитолитические) обусловлены взаимодействием фиксированных на мембранах клеток антигенов (это могут быть клеточные антигены, например - изоантигены при переливании несовместимой крови или аутоантигены, а также адсорбированные на клетках чужеродные антигены, например - лекарственные вещества) с циркулирующими антителами.


▲ - антиген (клеточный или адсорбированный клеткой); С5-С9 - активированные компоненты комплемента; МФ - макрофаг;  - антитело к антигену; К - лимфоцит-киллер, который осуществляет антителозависимую цитотоксичность; Fc - рецептор к Fc - фрагменту иммуноглобулина, расположенный на макрофаге или К-клетке.



Рис. 42. СХЕМА РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ II ТИПА.

Вследствие активации комплемента происходит повреждение и лизис клеток.

Реакции II типа выражены при гемотрансфузионных осложнениях, когда вводится иногруппная кровь. Антигены введенных эритроцитов реагируют с циркулирующими в организме реципиента isoантителами, наступает внутрисосудистый лизис эритроцитов, ведущий к гемотрансфузионному шоку.

Гемолитическая болезнь новорожденных (резус-конфликт) - реакция II типа. Когда у резус-отрицательной матери ребенок резус-положителен, то эритроциты ребенка поступают в организм матери, например, через плаценту во время беременности. Эти эритроциты вызывают у матери продукцию антител. IgG антитела, в отличие от других иммуноглобулинов, могут проходить через плацентарный барьер и повреждать эритроциты резус-положительного ребенка при любой последующей беременности. Недавно родившим резус-отрицательным матерям обычно вводят анти-резусный иммуноглобулин. Это приводит к уничтожению резус-положительных клеток в кровотоке матери и таким образом подавляет формирование антирезусных антител.

Лекарственные реакции II типа. Лекарственное средство может иногда функционировать как гаптен, связываясь с поверхностью

клетки и стимулируя продукцию антител, которые являются цитотоксическими для комплекса клетка-лекарство (при активации компонента). Некоторые случаи лекарственной гемолитической анемии, агранулоцитоза и тромбоцитопенической пурпуры вызваны таким образом.

Аутоиммунные болезни. Многие болезней человека связаны с продукцией аутоантител.

Антитело иногда реагирует с антигеном на поверхности клетки и вызывает стимуляцию скорее, чем повреждение. Например, «длительно действующий стимулятор щитовидной железы» является аутоантителом, которое воздействует на клетках щитовидной железы и вызывает увеличенную секрецию гормона щитовидной железы.

Реакции II типа не поддаются эффективной терапии антигистаминными препаратами, некоторый эффект дают ингибиторы протеаз (контрикал, гордокс и др.).

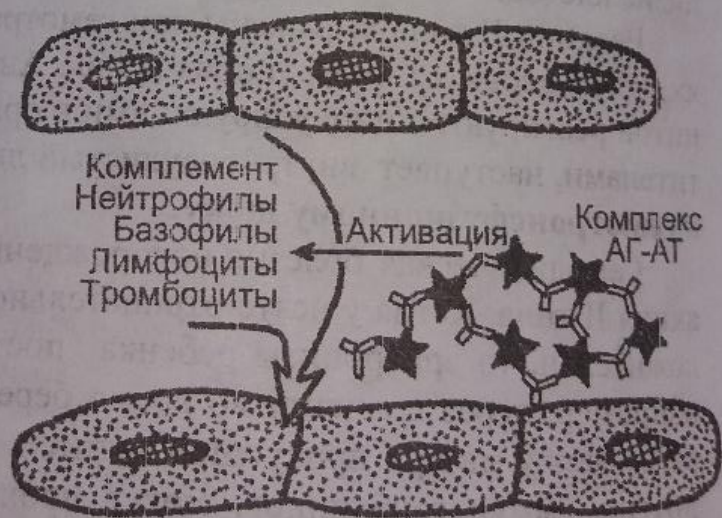
4. РЕАКЦИИ III ТИПА (ИММУНОКОМПЛЕКСНЫЕ). СЫВОРОТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ. ФЕНОМЕН АРТЮСА.

Реакции III типа - иммунокомплексные, развиваются в результате повреждения тканей комплексом антиген-антитело. Циркулирующие антитела образуют с циркулирующими антигенами комплексы, которые вместе с активированным компонентом осаждаются на стенках мелких сосудов, повреждая эндотелий, что приводит к развитию тромбозов и нарушению кровообращения.

Сывороточная болезнь развивается через 8—12 дней после однократного первичного введения обычно больших доз сыворотки (от 10 мл и выше).

Введение сыворотки по методу Безредки не предупреждает

сывороточной болезни. В ряде случаев у сенсibilизированных лю-



Воспалительные эффекты
Нарушение проницаемости сосудов, тромбоз, цитолиз, поражение тканей

Рис. 43. СХЕМА РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ III ТИПА.

дей сывороточная болезнь развивается довольно быстро после введения сыворотки, и тогда она напоминает анафилактическую реакцию. Сывороточная болезнь характеризуется появлением сыпи, напоминающей крапивницу и сопровождающейся сильным зудом, повышением температуры тела, отечностью, болями в суставах, опуханием лимфатических узлов, нарушением сердечно-сосудистой деятельности, изменением крови (вначале лейкоцитоз, затем лейкопения и относительный лимфоцитоз). Болезнь через несколько дней заканчивается выздоровлением. В основе механизма как сывороточной болезни, так и анафилаксии лежит взаимодействие антигена и циркулирующих антител.

Сывороточная болезнь предупреждается введением выдержанных лечебных или предварительно прогретых при температуре 56°C в течение 0,5 - 1 ч сывороток, а также применением сывороток, очищенных от балластных белковых фракций, а также иммуноглобулинов. Указанные методы обработки сывороток снижают их побочное действие. Лечение сывороточной болезни проводится димедролом, дипразином и другими антигистаминными препаратами.

Реакции типа сывороточной болезни. Длительное лечение менингитными препаратами типа пенициллина и сульфаниламидов приводит к тем же симптомам, что и сывороточная болезнь. Базальная мембрана почечных гломерул высоко восприимчива к повреждению иммунными комплексами. Многие типы нефрита вызваны повреждением этого вида, например нефрит, ассоциированный со *Streptococcus pyogenes*, инфекционным эндокардитом, системной кожной волчанкой и др. Иммунные комплексы характерны для микробных инфекций и могут вызвать повреждение ткани типа петехий при инфекционном эндокардите, кожном васкулите, polyarteritis nodosa, которые возникают при различных инфекционных заболеваниях.

Феномен Артюса. Многократные, с шестидневными интервалами подкожные инъекции лошадиной сыворотки кроликам вызывают после 5—7-го введения инфильтрат и некроз кожи (феномен Артюса). Местная анафилаксия развивается от введения и других антигенов (бактерии, токсины, антибиотики и др.).

Реакция требует высокого уровня преципитирующих антител. Реакция антиген-антитело происходит в месте введения. Повреждение локализовано, потому что иммунные комплексы быстро преципитируются и оказывают токсическое действие на клетки в этом месте. Стенки кровеносных сосудов повреждаются в наибольшей степени. Феномен Артюса иногда (но - редко) отмечается при введении людям антирабической вакцины.

Несмотря на то, что время наступления реакции после контакта сенсibilизированного организма с аллергеном при описанных типах гиперчувствительности может значительно различаться, реакции I - III типов следует относить к реакциям гиперчувствительности немедленного типа, так как механизм этих реакций связан с действием антител. За реализацию реакций ГНТ отвечает В-система лимфоидной ткани. В чистом виде каждый из этих типов встречается редко, обычно речь может идти лишь о преимущественной выраженной форме какого-либо типа реакции. Может быть, только при атопической форме бронхиальной астмы наблюдается в чистом виде реакция I типа.

4. РЕАКЦИИ IV ТИПА (ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА - ГЗТ). ИНФЕКЦИОННАЯ АЛЛЕРГИЯ. КОНТАКТНАЯ АЛЛЕРГИЯ. ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЙ И ПРОТИВОПУХОЛЕВЫЙ ИММУНИТЕТ.

К этому типу реакций относятся реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Они также называются реакциями туберкулинового типа, так как они были впервые описаны Р.Кохом, который выявил инфекционную аллергию на препараты из *Mycobacterium tuberculosis* при изучении туберкулезной инфекции у морских свинок. Реакции ГЗТ осуществляются в результате взаимодействия аллергена с рецепторами сенсibilизированных к нему Т-лимфоцитов - эффекторов ГЗТ. Выделяются медиаторы, вызывающие бласттрансформацию лимфоцитов, привлекающие и активирующие макрофаги, пролиферацию клеток с развитием гиперергического воспаления. Этот тип реакции, по сути, является проявлением клеточного иммунитета, так как антитела не принимают участия в ГЗТ.

ИНФЕКЦИОННАЯ АЛЛЕРГИЯ - повышенная чувствительность организма к возбудителю, продуктам его жизнедеятельности и распада, развивающаяся в результате инфекционного процесса. Инфекционная аллергия развивается при многих заболеваниях, но при некоторых она играет существенную роль в патогенезе. Обычно речь идет о длительно протекающих, часто рецидивирующих заболеваниях.

Наиболее выражена инфекционная аллергия при туберкулезе, бруцеллезе, туляремии, токсоплазмозе, стафилококковой, стрептококковой инфекциях и др.

Большинство исследователей считает, что развитие инфекционной аллергии может приводить к отягощению течения инфекционно-

го процесса, усилению повреждения тканей за счет гиперергических воспалительных реакций.

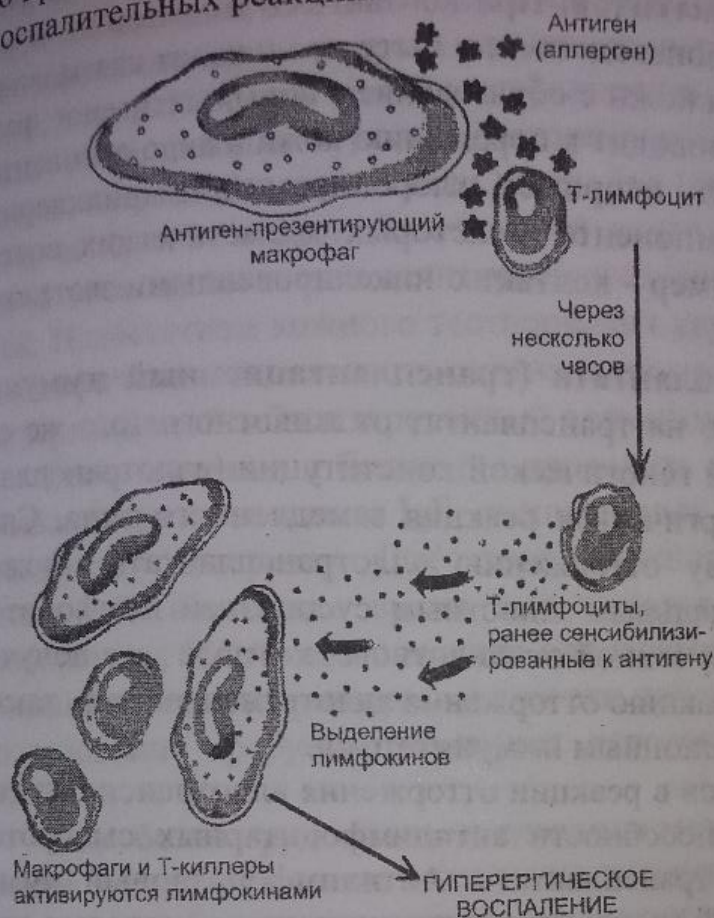


Рис. 44. СХЕМА РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ IV ТИПА

этом методе диагностики имеет при туберкулезе (реакция Манту), бруцеллезе, токсоплазмозе и др.

Для аллергодиагностики используют диагностические аллергены - туберкулин, бруцеллин, токсоплазмин, стафилококковый, стрептококковый аллергены и др. Обычно бактериальные аллергены - это термостабильные бактериопротеины. На кафедре биохимии нашего университета профессором Д.А.Цуверкаловым были разработаны аллерген дизентерин, который длительное время применялся при диагностике хронической дизентерии, а также растворимый бруцеллезный аллерген - бруцеллолизат. На нашей кафедре проводились работы по совершенствованию стрептококкового и стафилококкового аллергенов под руководством профессора С.М.Минервина.

Аллергодиагностика при инфекционных заболеваниях может проводиться внутрикожным тестированием, применяются также пробирочные реакции - бласттрансформации, подавления миграции, иммунолейколиза.

Но с другой стороны, иногда такое воспаление приводит к быстрому ограничению возбудителя, препятствуя генерализации процесса.

Поскольку инфекционная аллергия специфична по отношению к микроорганизму, то выявление состояния сенсибилизации к возбудителю используют для диагностики.

Аллергическая диагностика - диагностика заболевания путем выявления инфекционной аллергии к возбудителю. Наибольшее значение

Помимо инфекционной аллергии, ГЗТ принимает участие в развитии контактных дерматитов. При контакте со многими химическими веществами на производстве и в быту происходит связывание этих веществ с клетками кожи с образованием новых антигенов, развитие ГЗТ к ним, что приводит к поражению кожи в виде дерматита. Аллергенами могут быть, например, хлоропирамин, пикрилхлорид, динитрофторбензол, компоненты некоторых косметических составов, соли никеля (например - контакт с никелированными застежками ювелирных изделий).

Отторжение трансплантата (трансплантационный иммунитет). Реакция животного на трансплантат от животного того же самого вида, но различной генетической конституции (аллотрансплантат) - в основном аллергическая реакция замедленного типа. Способность к ускоренному отторжению аллотрансплантата может быть перенесена нормальным животным суспензией лимфоцитов (но не сывороткой), полученной от животного, которое уже получило аллотрансплантат. Реакцию отторжения аллотрансплантата также называют «трансплантационным иммунитетом».

Значение лимфоцитов в реакции отторжения аллотрансплантата также проявляется в способности антилимфоцитарных сывороток задержать отторжение трансплантата. Антилимфоцитарный иммуноглобулин, полученный путем иммунизации лошадей взвесью клеток селезенки человека, применяется при пересадках органов у человека. Также используются моноклональные антитела против специфических субпопуляций Т-лимфоцитов.

Противоопухолевый иммунитет, если он наблюдается, реализуется через реакцию ГЗТ к неантигенам. Нужно заметить, что антитела при трансплантационном и противоопухолевом иммунитете не только не увеличивают реакцию организма, но даже обеспечивают защиту трансплантата и опухоли, блокируя антигены, делая их недоступными для рецепторов сенсibilизированных Т-лимфоцитов.

6. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Аллергические болезни - распространенные заболевания. Они требуют точной диагностики для эффективной борьбы с ними.

Диагностика аллергических заболеваний основывается, главным образом, на выявлении специфической сенсibilизации человека к определенному аллергену. С этой целью применяют два основных метода - кожное тестирование и серологическую диагностику.

Для кожного тестирования применяют диагностические аллерге-

ны, которые готовятся на производствах. Выпускается несколько десятков видов диагностических аллергенов. Среди них есть аллергены неинфекционные (из шерсти животных, перьев птиц, пыльцы растений, домашней пыли и др.) и инфекционные - из бактерий (в основном - непатогенных и условнопатогенных - стафилококка, стрептококка, кишечной палочки и др.) и грибов (пеницилл, стрептомицетов, аспергилл и др.). Диагностика аллергии с помощью кожных проб проводится в специализированных аллергологических кабинетах. Недостатком кожного тестирования является его недостаточная специфичность и опасность осложнений от внутрикожного введения аллергена в сенсibilизированный организм.

Более надежно и безвредно проводить определение в сыворотке больного антител класса IgE, специфичных по отношению к предполагаемому аллергену. Для этого используют иммуноферментный анализ. В настоящее время выпускаются соответствующие тест-наборы для ИФА, позволяющие одновременно определять сенсibilизацию к многим аллергенам, но эти наборы стоят дорого, а их использование требует применения дорогостоящей аппаратуры для ИФА.

Еще более трудоемким и сложным методом является использование клеточных тестов выявления аллергии - реакции бласттрансформации, реакции подавления миграции, реакции иммунолейколиза. Эти методы применяются в определенных случаях при комплексном обследовании больных.

7. ПРИНЦИПЫ ТЕРАПИИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Высокий процент аллергических заболеваний среди людей вызывает необходимость разработать на современном научном уровне такие важные вопросы, как районирование аллергической заболеваемости (установление географической карты аллергенов), диагностика, терапия и профилактика аллергических заболеваний.

Для лечения и профилактики больных аллергией важное значение имеют следующие мероприятия: выявление аллергенов и прекращение контакта с ними (пищевые продукты, лекарственные препараты, бытовые, производственные и другие аллергены); иногда целесообразно изменение места жительства больного. Довольно хорошие результаты дает применение гормональных препаратов (АКТГ и др.), угнетающих процесс антителообразования.

С целью снижения чувствительности организма и уменьшения восприимчивости к аллергену больным проводят десенсibilизацию

тем аллергеном, к которому имеется повышенная чувствительность. При этом появляются неполные (одновалентные) антитела, которые фиксируют аллергены и тем самым предупреждают взаимодействие их с двухвалентными антителами. При заболеваниях, сопровождающихся выработкой клетками большого количества гистамина и других веществ, целесообразно назначать противогистаминные препараты: димедрол, пипольфен, супрастин, тавегил и др. Эти лекарственные средства, однако, не всегда предотвращают развитие серьезных аллергических состояний), иногда вызывая их нарастание из-за нарушения защитных барьеров. Более подробно вопросы лечения аллергических заболеваний будут изучаться на клинических кафедрах.

7. ПРОФИЛАКТИКА АНАФИЛАКТИЧЕСКОГО ШОКА

А. М. Безредка предложил специфический, простой и весьма эффективный метод десенсибилизации путем дробного введения антигена (сыворотки). Дробно введенные небольшие дозы антигена связывают циркулирующие в крови антитела и тем самым предотвращают образование высоких концентраций гистамина и других токсических веществ, вызывающих анафилактический шок. Для профилактики анафилаксии предварительно ставят внутрикожную пробу путем введения в сгибательную поверхность предплечья 0,1 мл сыворотки, разведенной 1:100. При отрицательной реакции (папула не более 0,9 см в диаметре и краснота вокруг нее ограниченная) через 20-30 мин вводят 0,1—0,5 мл неразведенной сыворотки, а через 30-60 мин - всю дозу. Если внутрикожная проба положительная (диаметр папулы более 1 см и большая зона красноты), разведенную 1:100 сыворотку впрыскивают подкожно в дозах 0,5, 1, 2 и 5 мл с интервалами в 20 мин, затем 0,1 - 0,2 мл неразведенной сыворотки с интервалами в 30 мин. Анафилаксию можно предупредить неспецифическими средствами: введением разрешающей дозы сыворотки под эфирным наркозом, а также действием хлоралгидрата, алкоголя; десенсибилизирующими свойствами обладают димедрол, супрастин, пипольфен, атропин, эфир, хлороформ, уретан, новокаин, желчнокислые соли, сапонин, гирудин, гипосульфат натрия, хлорид кальция и др. В качестве лечебных средств при анафилактическом шоке применяют адреналин, кордиамин, супрастин и другие антигистаминные препараты; при пенициллиновом шоке - ту же антишоковую терапию и пенициллиназу, которая расщепляет пенициллин в организме пациента.

Занятие № 23. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА. ИММУНОДЕФИЦИТЫ

Цель занятия:

Изучить методы оценки иммунного статуса организма человека и ознакомиться с механизмом развития основных форм иммунодефицитных состояний.

Студент должен знать:

- принципы и основные методы оценки иммунного статуса организма

- нормальные показатели тестов первого уровня

- принципы классификации иммунодефицитов

Уметь:

- определить розеткообразующие клетки в микропрепаратах

- определить концентрацию иммуноглобулинов по Манчини в демонстрационных препаратах

- определить фагоцитарное число и фагоцитарный индекс

- оценивать изменения иммунного статуса организма на основании

тестов первого уровня.

Овладеть навыками:

- оценки иммунограммы человека по тестам первого уровня.

1. ИММУННЫЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ РЕАКТИВНОСТИ ОРГАНИЗМА.

Функциональное состояние иммунной системы оценивают по иммунологическим тестам, которые выражаются показателями иммунограммы. Эти показатели характеризуют состояние иммунного статуса организма.

Клиническими проявлениями снижения естественной резистентности и иммунологической защиты являются частые респираторные заболевания, гнойно-воспалительные процессы и другие заболевания инфекционной этиологии.

2. ОЦЕНКА ИММУННОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Иммунный статус организма оценивают по состоянию Т- и В-систем, а также факторов неспецифической защиты.

Для оценки состояния Т- и В- систем используют иммунологические тесты 1 и 2 уровней.

Тесты 1 уровня позволяют выявить грубые нарушения со стороны иммунной системы. К ним относятся:

- а) относительное и абсолютное содержание лимфоцитов в крови;
- б) относительное и абсолютное содержание Т- и В-лимфоцитов в крови;
- в) концентрация в сыворотке иммуноглобулинов (Ig M, Ig G, Ig A);
- г) фагоцитарная функция лейкоцитов крови.

Тесты 2 уровня позволяют провести более тщательный анализ иммунного статуса организма человека, поэтому эти тесты называют аналитическими.

3. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ

Для большинства тестов оценки иммунного статуса необходимо выделение из периферической крови лейкоцитов или только лимфоцитов.

Для выделения лейкоцитов может быть использован седиментационный метод. У обследуемого берут иглой из локтевой вены 5 мл крови в стерильную пробирку, содержащую гепарин. Оставляют на определенное время. Клетки крови оседают. На поверхности осевших клеток будет слой лейкоцитов.

Выделение лимфоцитов из периферической крови осуществляется градиентным центрифугированием. Используют фиккол-верографин. Плотность раствора составляет 1,077. На фиккол-верографин наслаивают кровь и центрифугируют. Происходит разделение клеток. Формируется слой, в котором сосредоточены лимфоциты. Его отбирают, переносят в другую пробирку, и отмывают путем центрифугирования.

4. ТЕСТЫ ПЕРВОГО УРОВНЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА

- а) относительное и абсолютное содержание лимфоцитов в крови

Для определения этих показателей необходимо знать количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу. Число лимфоцитов в лейко-

цитарной формуле, т.е. процент и есть относительное число Абсолютное число лимфоцитов рассчитывают, зная общее число лейкоцитов.

Пример: количество лейкоцитов равно 5000 в 1 мкл (микролитре), процент лимфоцитов - 25, абсолютное содержание лимфоцитов равно $5000 \times 25 : 100 = 1250$ в 1 мкл.

б) относительное и абсолютное содержание Т- и В- лимфоцитов

Содержание Т-лимфоцитов определяют в реакции спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана. Принцип метода основан на учете количества клеток, имеющих на поверхности рецепторы к эритроцитам барана (поверхностные маркеры Т - лимфоцитов). Существуют разные варианты постановки и учета розеткообразования, но в каждом варианте к взвеси лимфоцитов добавляют взвесь эритроцитов барана и выдерживают в термостате при 37°C . Эритроциты барана присоединяются к поверхности Т-лимфоцитов. Образуются фигуры, похожие на розетки. Лимфоцит, к которому присоединилось 3 и более эритроцитов учитывается как розеткообразующая клетка (РОК). Количество Т-лимфоцитов соответствует числу Е-РОК (Е-лифоцит).

Подсчитывают процент розеткообразующих клеток на 200 лимфоцитов. Затем определяют абсолютное количество Т-лимфоцитов, которое вычисляют, исходя из абсолютного содержания лимфоцитов в 1 мкл крови.

Пример: абсолютное количество лимфоцитов равно 1000 в мкл; процент розеткообразующих клеток - 50, абсолютное содержание Т-лимфоцитов равно: $1250 \times 50 : 100 = 750$ в мкл. Этот подсчет обязателен из-за частого несовпадения относительного и абсолютного содержания Т-лимфоцитов при разных иммунологических состояниях.

У здоровых доноров в крови содержится 40-80% Т-лимфоцитов. Число лейкоцитов выражают в Г (гига). Поэтому число Т-лимфоцитов, выраженное в Г/л, составляет 0,6 - 2,5 (в нашем примере $0,75 \times 10^9$ Г/л).

Для определения содержания В-лимфоцитов также используется тест розеткообразования. На поверхности В-лимфоцитов имеются рецепторы к СЗ-компоненту комплемента (поверхностные маркеры В-лимфоцитов). Эритроциты обрабатывают специфическими антителами и комплектом, образуется комплекс эритроцит-антитело-комплемент- (ЕАС), затем обработанные эритроциты добавляют к лимфоцитам. Образуются ЕАС-розетки. Считают 200 клеток и определяют процент В-лимфоцитов. Затем пересчитывают их количество на абсолютное число, так же как в примере с Т-лимфоцитами.

в) концентрация в сыворотке иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA)

Для определения концентрации иммуноглобулинов используется реакция преципитации в геле (по Манчини), она основана на том, что классы иммуноглобулинов различаются по антигенной структуре тяжелых цепей. К каждому классу иммуноглобулинов есть иммуноглобулиновая сыворотка. Для определения концентрации иммуноглобулинов определенного класса, например IgG, применяется соответствующая сыворотка, в данном примере, содержащая антитела к IgG, которую добавляют к агаровому гелю ($t = 45 \text{ }^\circ\text{C}$). Затем на стекле формируют слой геля высотой 2 мм. В геле делают лунки. В лунку вносят исследуемую сыворотку крови и помещают во влажную камеру. Иммуноглобулины сыворотки диффундируют в гель. Происходит их взаимодействие с соответствующими антителами. Тяжелые цепи иммуноглобулинов выступают в качестве антигенов. Происходит реакция преципитации. Вокруг лунки образуется кольцо преципитации, поэтому метод называют также методом радиальной иммунодиффузии. Затем измеряют его диаметр и по таблице рассчитывают концентрацию в г/л или в моль/л. Диаметр кольца прямо пропорционален концентрации исследуемого иммуноглобулина.

г) фагоцитарная функция лейкоцитов

Проводится определение фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса по отношению к тест микробам (стафилококк, *Candida albicans*) - смотри методические указания к практическому занятию № 18.

5. ТЕСТЫ 2 УРОВНЯ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА- АНАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ. СРОК ОТВЕТА 3 - 7 СУТОК.

Тесты 2 уровня позволяют произвести более тщательный анализ иммунного статуса организма человека. К ним относятся определение численности субпопуляций лимфоцитов, определение функциональной активности регуляторных и эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов, активность натуральных киллеров, содержание компонента и его компонентов, кожные тесты повышенной чувствительности замедленного типа и повышенной чувствительности немедленного типа и др.

Тесты по определению численности субпопуляций лимфоцитов основаны на выявлении клеточных маркеров. Наиболее точными являются методы иммунофлюоресценции с моноклональными антителами соответствующей специфичности, метод проточной цитофлюо-

рометрии, однако их проведение требует наличия дорогостоящих реагентов и оборудования (моноклональных антител, антииммуноглобулиновых антител, меченных флюорохромом, люминесцентного микроскопа, проточного цитофлуориметра). Поэтому для определения численности основных субпопуляций применяют разные варианты метода розеткообразования. Специально проведенные параллельные исследования показали их достаточно высокую точность.

Оценка функциональной активности Т-лимфоцитов проводится по реакции бласттрансформации лимфоцитов, по уровню продукции лимфоцитами гуморальных медиаторов клеточного иммунитета (лимфокинов) в тестах подавления миграции лейкоцитов и др. В реакции бласттрансформации определяют способность лимфоцитов превращаться в молодые, незрелые клетки - лимфобласты под влиянием неспецифических стимуляторов (например - фитогемагглютина) либо специфических антигенов. Оценка реакции может проводиться путем изучения окрашенных мазков или с помощью радиоизотопных методов.

6. ИММУНОДЕФИЦИТЫ. ПЕРВИЧНЫЕ И ВТОРИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ. ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ. ДИАГНОСТИКА. ПРИНЦИПЫ ТЕРАПИИ

Иммунодефициты - врожденные и приобретенные дефекты иммунной системы организма, которые проявляются в неспособности организма осуществлять клеточные и гуморальные защитные реакции.

Врожденные (первичные) иммунодефициты обусловлены генетическими нарушениями на разных этапах формирования иммунной системы организма. При нарушениях на уровне продукции стволовых кроветворных клеток наблюдается полная аплазия кроветворения или ограничение их способности дифференцироваться до Т- и В- лимфоцитов.

Единичные генетические блоки приводят к частичному выключению Т- или В- систем: на уровне образования или дифференцировки Т- лимфоцитов, в системе В- лимфоцитов - на разных этапах их дифференцировки в плазматические клетки, продуцирующие Ig M, Ig G, и Ig A.

Приобретенные, или вторичные иммунодефициты не связаны с генетическими дефектами иммунной системы. Они возникают при тяжелых воспалительных процессах, некоторых инфекциях, токсокозах, онкологических заболеваниях, в результате обильных и длительных кровотечений, при нарушениях питания, диабете, после

обширных хирургических вмешательств.

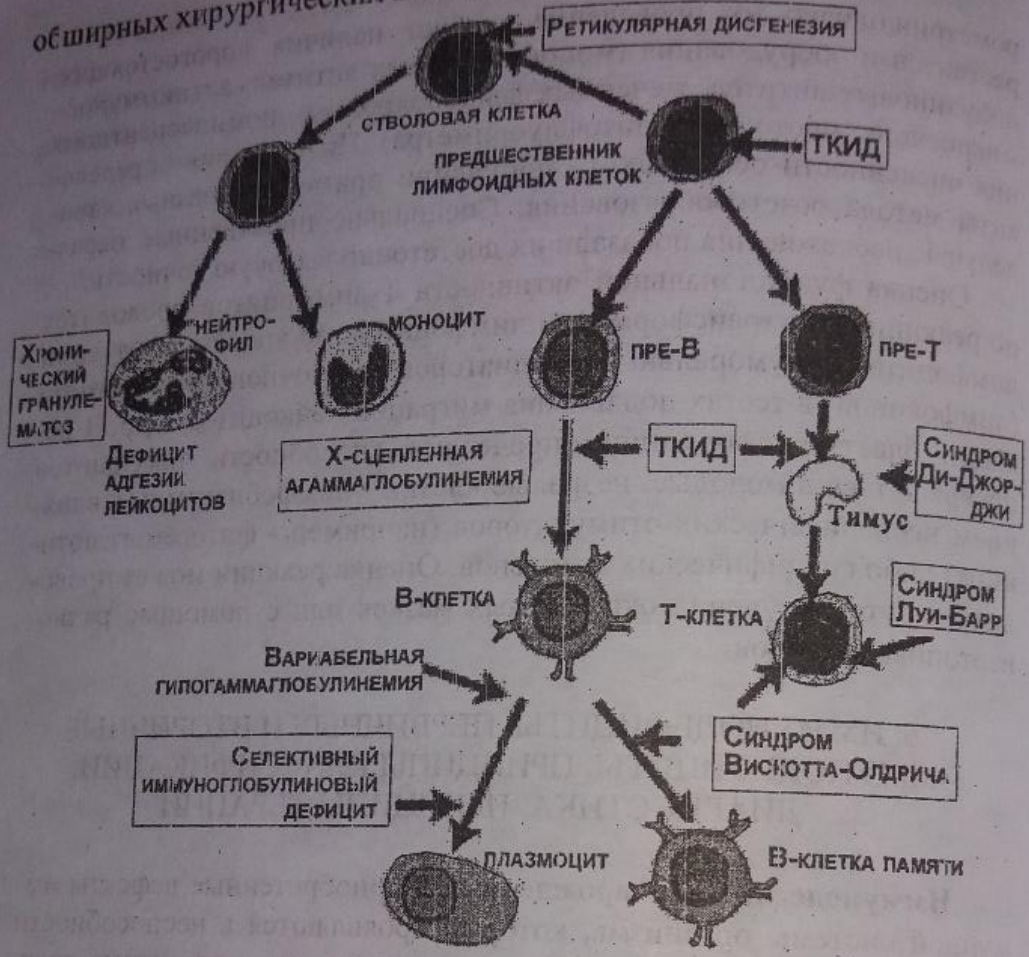


Рис. Обобщенная схема развития иммунодефицитных состояний

Отдельные изолированные дефекты иммунной системы в отличие от тяжелых комбинированных иммунодефицитов нередко выявляются только при детальном иммунологическом обследовании человека. Они проявляются, как правило, рецидивирующими нагноительными и кандидозными поражениями кожных покровов и дыхательных путей с склонностью к генерализации инфекций, персистенцией возбудителя в организме и вирусоносительством, повышенной восприимчивостью к инфекциям, вызванным условно-патогенными бактериями.

Механизмы подавления иммунитета при вторичных иммунодефицитных состояниях различны, и, как правило, имеется сочетание нескольких механизмов, нарушения иммунной системы выражены в меньшей степени, чем при первичных.

Дефектность иммунной системы организма рассматривается в

настоящее время как одна из причин развит злокачественных опухолей.

Нередко дефектность иммунной системы лежит в основе различных проявлений иммунопатологии: аутоиммунных заболеваний и аллергических реакций.

Диагностика иммунодефицитов основывается на оценке показателей иммунограммы, характеризующей иммунный статус организма.

Лечение первичных иммунодефицитов проводится путем:

- трансплантации вилочковой железы, лимфоидных органов и тканей;
- введения препаратов, полученных из вилочковой железы, лимфоцитов;

Действие такой терапии направлено на восстановление реакций, опосредованных Т- клетками.

При нарушениях В- звена проводится терапия иммуноглобулином.

Вторичные иммунодефициты. Как правило, вторичные иммунодефициты носят проходящий характер. В связи с этим лечение вторичных иммунодефицитов гораздо проще и эффективнее по сравнению с лечением первичных нарушений функции иммунной системы. Обычно лечение вторичного иммунодефицита начинают с определения и устранения причины его возникновения. Например, лечение иммунодефицита на фоне хронических инфекций начинают с санации очагов хронического воспаления. Иммунодефицит на фоне витаминно-минеральной недостаточности начинают лечить при помощи комплексов витаминов и минералов. Восстановительные способности иммунной системы велики, поэтому устранение причины иммунодефицита, как правило, приводит к восстановлению иммунной системы. Для ускорения выздоровления и специфической стимуляции иммунитета проводят курс лечения иммуностимулирующими препаратами **природного** происхождения (продигиозан, пирогенал, препараты эхинацеи и др.), **медиаторами** иммунной системы (тимоген, тималин, Т-активин, иммуноглобулин, интетрфероны, интерлейкины и др.), **синтетическими** препаратами (метиурацил, иммунофан, циклоферон, полиоксидоний, арбидол и др.). В настоящее время постоянно расширяется арсенал иммуностимулирующих препаратов, с различными механизмами действия.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Занятие № 1. Оборудование и оснащение микробиологической лаборатории. Микроскопический метод исследования микроорганизмов. Техника микроскопии.	5
Занятие № 2. Методы микроскопического изучения микроорганизмов. Основные формы бактерий. Простые и сложные методы окраски. Окраска по Граму	12
Занятие № 3. Структура бактериальной клетки	20
Занятие № 4. Морфология и структура актиномицетов, грибов и простейших	27
Занятие № 6. Бактериологический метод исследования. Методы выделения чистых культур аэробов и анаэробов	37
Занятие № 7. Культуральные свойства бактерий	41
Занятие № 8. Биохимические свойства микроорганизмов. Идентификация чистых культур бактерий	45
Занятие № 9. Фаги. Генетика микроорганизмов	50
Занятие № 10. Молекулярно-биологические методы исследования	66
Занятие № 11. Микробиологические основы антимикробной химиотерапии и антисептики	66
Занятие № 12. Учение об инфекции. Биологический метод исследования	74
Занятие № 13. Учение об инфекции. Бактериологическое исследование трупов лабораторных животных	85
Занятие № 14. Учение об иммунитете. Виды иммунитета. Неспецифические факторы защиты. Иммунная система организма. Антигены. Антитела.	95
Занятие № 15. Фагоцитоз. Определение фагоцитарной активности. Определение гуморальных факторов неспецифической защиты (лизозима, комплемента)	109

Занятие № 16. Типы иммунного ответа. Биология иммунного ответа. Гуморальный иммунный ответ. Клеточный иммунный ответ	128
Занятие № 17. Иммунопрофилактика. Иммунотерапия . . .	142
Занятие № 18. Реакции «антиген-антитело» (серологические реакции): реакция агглютинации (РА), реакция преципитации (РП)	148
Занятие № 19. Реакция нейтрализации (РН), серологические реакции с применением метки: иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлюоресценции (РИФ), радиоиммунный анализ (РИА)	159
Занятие № 20. Реакции «антиген-антитело»: реакция иммунного лизиса, реакция связывания комплемента (РСК):	170
Занятие № 21. Серологический метод исследования. Серологическая идентификация культур. Серологические методы экспресс-диагностики. Серологическая диагностика инфекционных заболеваний. Диагностикумы. Диагностические сыворотки.	176
Занятие № 22. Аллергия	188
Занятие № 23. Методы оценки иммунного статуса организма. Иммунодефициты.	205