

Тема: Прикладная иммунология

ПЛАН ЛЕКЦИИ

А

Гуморальные иммунологические реакции

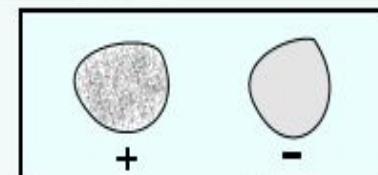
В

**Клеточные методы диагностики
инфекционных болезней**

Реакция агглютинации (от лат. agglutinatio - склеивание) - склеивание корпускул (бактерий, эритроцитов и др.) антителами в присутствии электролитов - натрия хлорида.

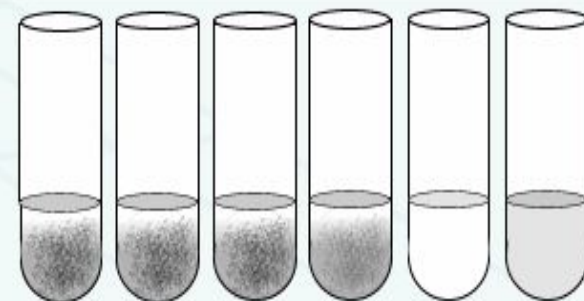
Определение возбудителя

Ориентировочная реакция агглютинации на стекле. К капле агглютинирующей сыворотки (разведение 1 : 20) добавляют взвесь бактерии, выделенных от больного животного. Образуется хлопьевидный осадок.



Агглютинация положительная Контроль (нет агглютинации)

Развернутая реакция агглютинации с возбудителем, выделенным от больного животного. К разведениям агглютинирующей сыворотки добавляют взвесь бактерий, выделенных от больного.

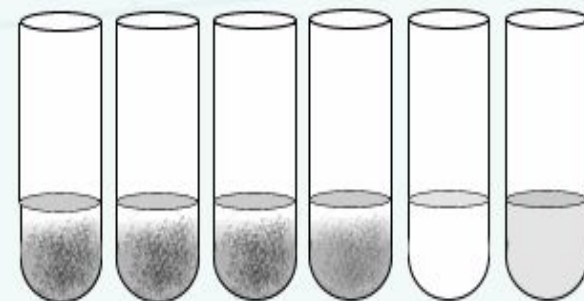


Агглютинация Контроль сыворотки Контроль антигена

Определение антител в сыворотке крови

Развернутая реакция агглютинации с сывороткой крови. К разведениям сыворотки добавляют диагностикум.

1. **Агглютинация с О-диагностикумом** (бактерии, убитые нагреванием, сохранившие О- антиген) происходит в виде мелкозернистой агглютинации.
2. **Агглютинация с Н - диагностикумом** (бактерии, убитые формалином, сохранившие жгутиковый Н-антиген) - крупнохлопчатая и протекает быстрее.



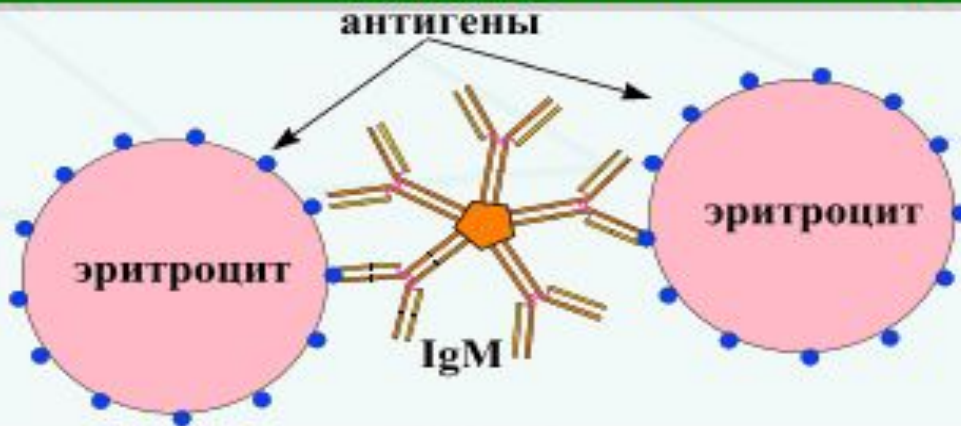
Агглютинация Контроль сыворотки Контроль антигена

В РНГА выявляют антитела сыворотки крови с помощью **антигенного эритроцитарного диагностикума**, который представляет собой эритроциты с адсорбирован

Антигенный эритроцитарный диагностикум



Реакция непрямой (пассивной) агглютинации



Разведения сыворотки крови
1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 Контроль

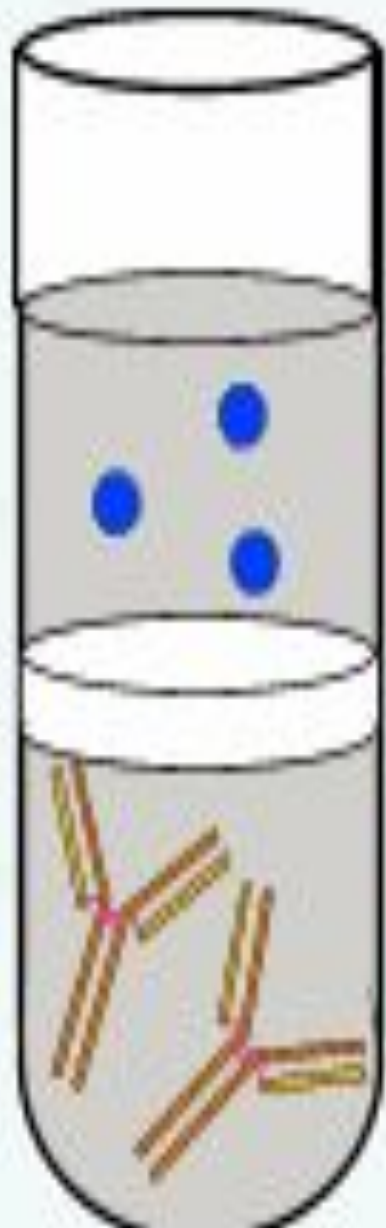


агглютинация нет агглютинации

Реакция преципитации - РП (от лат praecipilo осаждать) - это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого *преципитатом*. Он образуется при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах, избыток одного из них снижает уровень образования иммунного комплекса. Реакцию преципитации ставят в пробирках (реакция кольцепреципитации), в гелях, питательных средах и др. Широкое распространение получили разновидности реакции преципитации в полужидком геле агара или агарозы двойная иммунодиффузия по *Оухтерлони*, *радиальная иммунодиффузия*, *иммуноэлектрофорез* и др.

Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони. Для постановки реакции растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку и после затвердевания в нем вырезают лунки. В лунки геля отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу. В месте встречи в эквивалентных соотношениях они образуют преципитат в виде белой полосы. У многокомпонентных систем между лунками с антигенами и антителами появляется несколько линий преципитата; у идентичных АГ линии преципитата сливаются; у неидентичных АГ - пересекаются

Реакция
преципитации



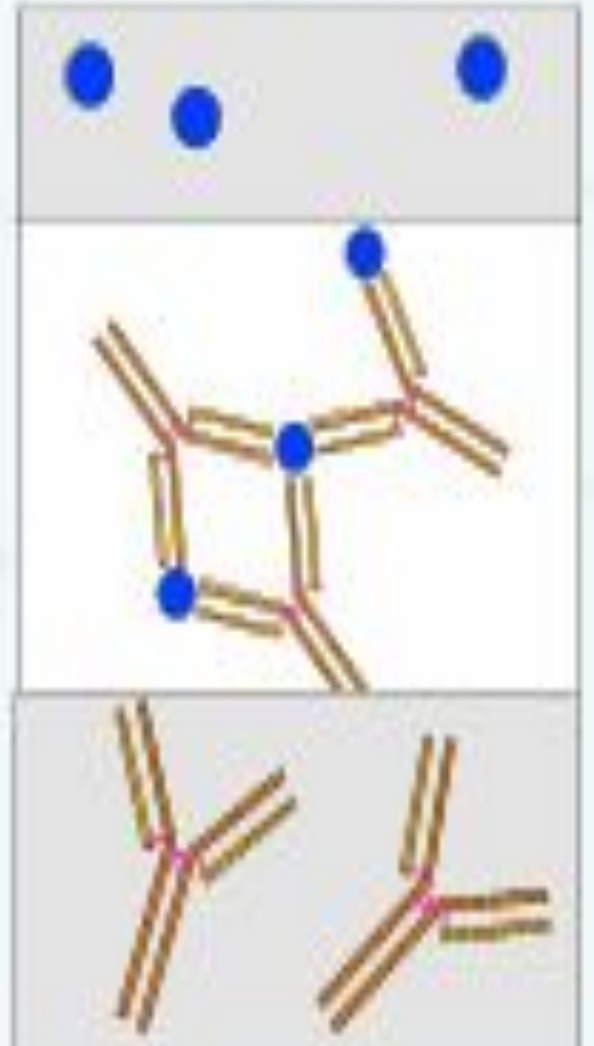
Антигены

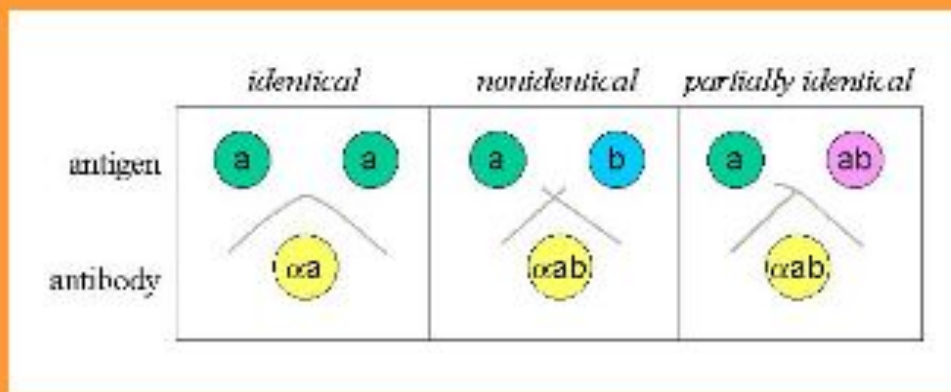


Преципитат



Антитела
ИММУННОЙ
СЫВОРОТКИ





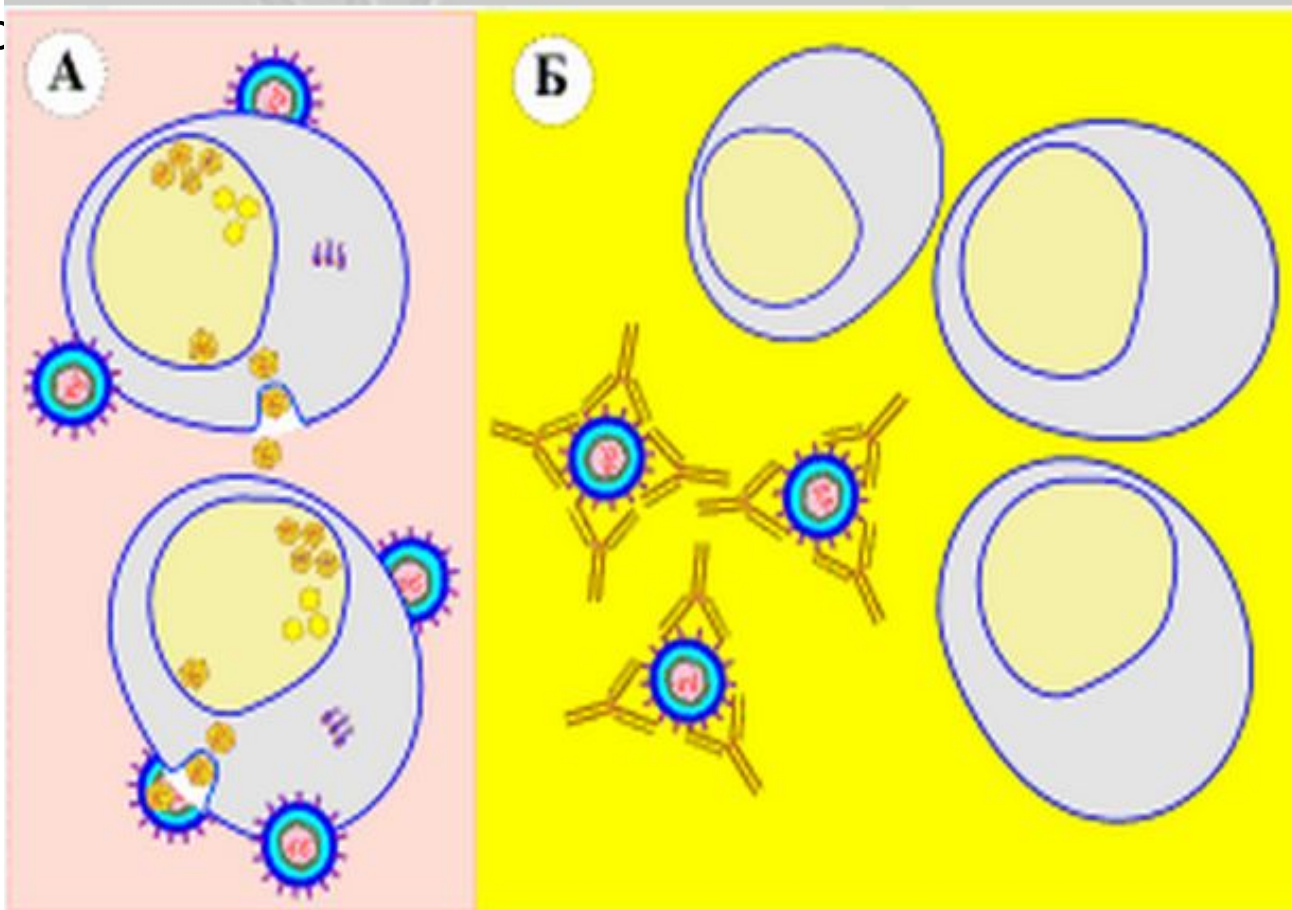
^ РЕАКЦИЯ ДВОЙНОЙ ИММУНОДИФФУЗИИ ПО ОУХТЕРЛОНИ

Для постановки реакции растопленный агаровый гель тонким слоем выливают на стеклянную пластинку и после затвердевания в нем вырезают лунки. В лунки геля отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, которые диффундируют навстречу друг другу. В месте встречи в эквивалентных соотношениях они образуют преципитат в виде белой полосы. В многокомпонентных системах между лунками с антигенами и антителами появляется несколько линий преципитата; у идентичных АГ линии преципитата сливаются; у неидентичных АГ - пересекаются.

Иммуноэлектрофорез - сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации: смесь антигенов вносится в лунки геля и разделяется в геле с помощью электрофореза, затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой диффундируют в гель и образуют в месте "встречи" с антигеном линии преципитации



Реакцию нейтрализации (РН) проводят путем введения смеси антиген - антитело животным или в чувствительные тест-объекты (культуру клеток, эмбрионы). При отсутствии у животных и тест-объектов повреждающего действия микроорганизмов или их антигенов, токсинов говорят о нейтрализующем действии иммунной сыворотки и, следовательно, о **антителе**.

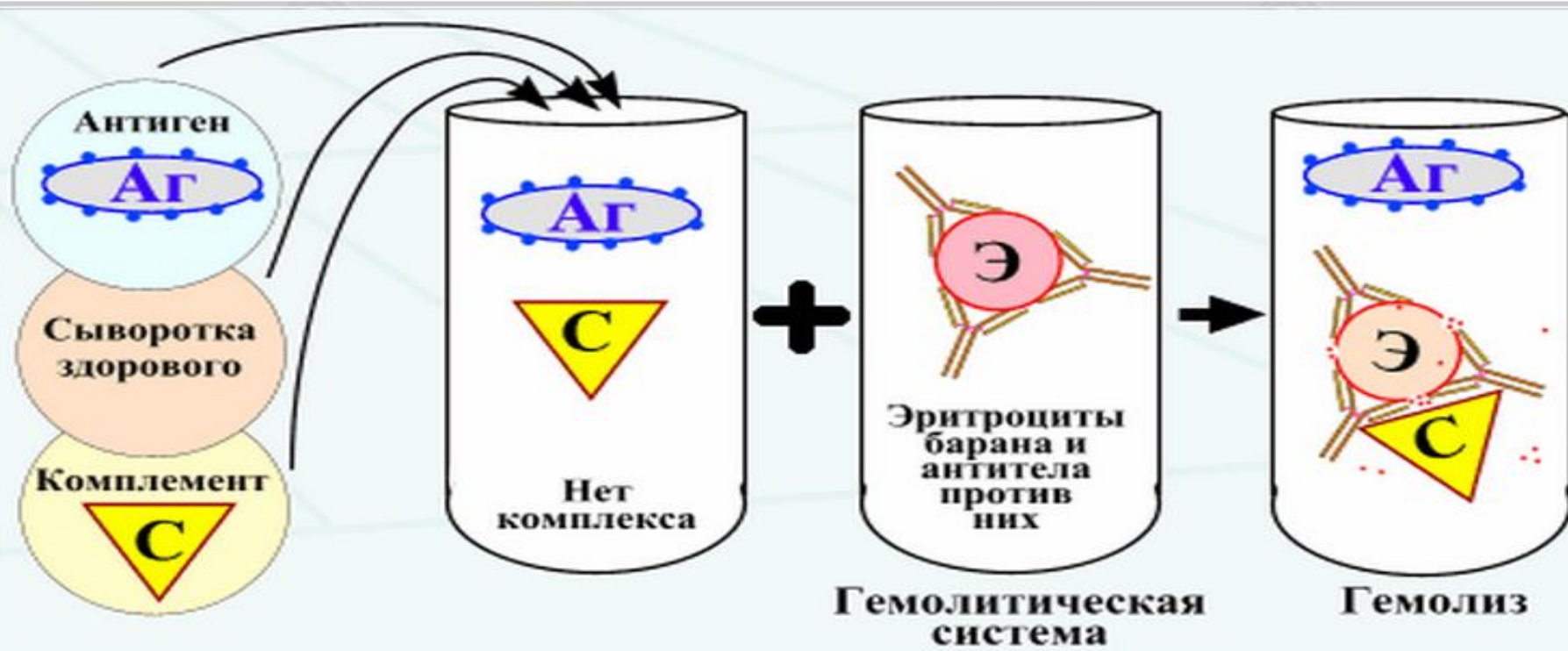
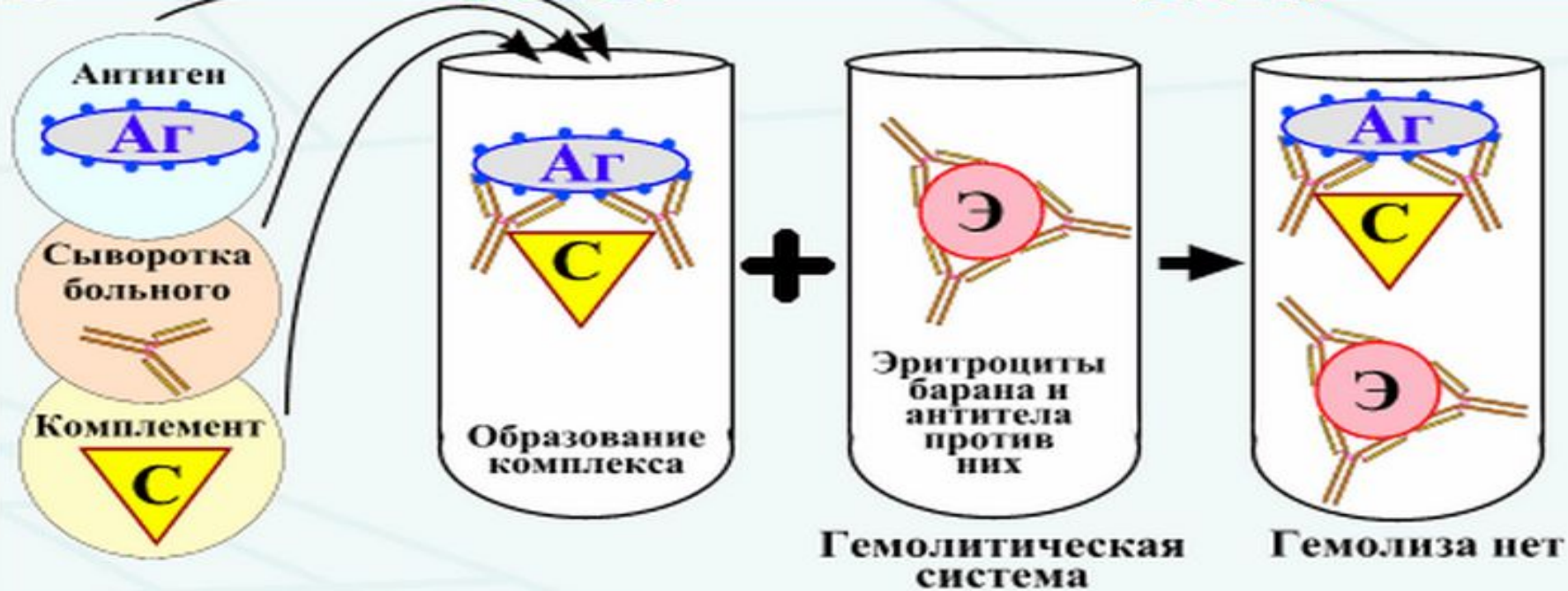


Реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток:

А - цитопатогенный эффект (ЦПЭ) в результате размножения вирусов;

Б - ЦПЭ отсутствует в результате нейтрализации вирусов антителами

Реакция связывания комплемента (РСК) заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они образуют **иммунный комплекс**, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется **комплемент (С)**, т.е. происходит связывание комплемента комплексом антиген - антитело. Если же комплекс антиген - антитело не образуется, то комплемент остается свободным. РСК проводят в две фазы 1-я фаза - инкубация смеси, содержащей антиген + антитело + комплемент, 2-я фаза (индикаторная) - выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана, и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним. В 1-й фазе реакции при образовании комплекса антиген - антитело происходит связывание им комплемента, и тогда во 2-й фазе гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет (реакция положительная). Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исследуемом образце нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит - антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз (реакция отрицательная).



Клеточные методы диагностики инфекционных болезней

Установлены особые иммунологические реакции, не связанные с антителами, а свойственные **только иммунокомпетентным клеткам**. Эту форму реакции организма на антиген в связи с особенностями клеточного иммунного ответа принято называть **клеточным иммунитетом** (англ. cell immunity). **Наиболее яркое проявление его — повышенная чувствительность замедленного типа**, в основе которой лежит действие не антител, а эффекторных элементов клеточного порядка. Термин «повышенная чувствительность замедленного типа» принято использовать как синоним понятия «клеточный иммунитет».

- **Специфический клеточный иммунитет включает в себя образование популяции антигенспецифических Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-эффекторов гиперчувствительности замедленного типа, обладающих способностью специфически распознавать антиген, вызвавший их появление, взаимодействовать с ним и выполнять при этом различные эффекторные функции.**

Иммунологическая память

Способность иммунной системы организма быстрее и интенсивнее **реагировать на повторное введение** антигена называется **иммунологической памятью**. После первичного ответа на антиген в организме образуется определенное количество долгоживущих клеток памяти, сохраняющих информацию об антигене.

Иммунологическая память обусловлена образованием долгоживущих рециркулирующих популяций Т- и В-клеток памяти. Их характерная особенность заключается в быстрой пролиферации под влиянием специфического антигена с образованием большой популяции клеток-эффекторов и синтезом соответственно большого количества антител и цитокинов. Она лежит в основе поствакцинального иммунитета и представляет собой высокоэффективную защиту организма от **реинфекции**. Таким образом, иммунологическая память приобретается и не передается по наследству, т. е. присуща только данному индивиду.

Тесты Т-системы лимфоцитов

При культивировании лейкоцитов *in vitro* при определенных условиях нормальные лимфоциты периферической крови могут превращаться в недифференцированные зародышевые клетки типа бластов.

Процесс превращения лимфоцитов на искусственной питательной среде в различные промежуточные формы получил название **реакции бласттрансформации (РБТЛ)**.

Морфологическая трансформация лимфоцитов может быть индуцирована специфическим и неспецифическим стимуляторами.

Неспецифический стимулятор представляет собой **фитогемагглютинин (ФГА)**. Под его воздействием, обычно через 72 ч, наблюдается отчетливая трансформация лимфоцитов в большие морфологические примитивные клетки, часть которых находится в состоянии митоза; используются для оценки функции лимфоцитов. Оценку трансформации и пролиферации лимфоцитов под влиянием специфических антигенов применяют в основном для диагностики аллергии.

- **Показатель повреждаемости нейтрофилов (ПН).**
- В сенсibilизированном организме элементы белой крови, в том числе нейтрофилы, проявляют повышенную чувствительность к аллергену. Учитываемый критерий **повреждения нейтрофилов — усиление амебоидной реакции** этих лейкоцитов при инкубации крови в смеси со специфическим аллергеном.

Для повышения точности наблюдения за поврежденными нейтрофилами используют чисто химический метод окраски клеток на гликоген по А. Л. Шабдашу, который позволяет точнее дифференцировать нейтрофильные лейкоциты от других форменных элементов крови (эозинофилы, лимфоциты и моноциты содержат значительно меньше гликогена, а в эритроцитах он отсутствует) и обнаружить даже минимальные повреждения нейтрофилов (в виде амебоидных реакций).

Количество обнаруживаемых поврежденных нейтрофилов, например в присутствии туберкулина у больных туберкулезом, находится в прямой зависимости от степени активности специфического процесса (процент поврежденных нейтрофилов в активной фазе туберкулеза в 1,5—3,5 раза выше, чем при затихании процесса).

Реакция специфического лейколиза

Основана на повреждении — разрушении лейкоцитов под влиянием аллергена; первично повреждаются лимфоциты, а остальные лейкоциты — вторично.

Механизм специфического лейколиза заключается в воздействии аллергена на лимфоциты сенсibilизированного организма. Реакция служит для

Реакция ингибции миграции лейкоцитов. Основана на подавлении миграции макрофагов и лейкоцитов под действием медиаторов, вырабатываемых сенсибилизирующимися лимфоцитами в присутствии специфического антигена.

Специфическое розеткообразование. Основано на следующем феномене: В-лимфоциты животного, иммунизированного гетерогенными эритроцитами, способны *in vitro* фиксировать на своей поверхности соответствующие эритроциты, образуя «розетки». Реакция получила название «иммуноцитоприлипание». Воспроизводится *in vitro*, если сенсибилизированные лимфоциты смешивают со взвесью **танизированных** эритроцитов, на которых фиксируются соответствующие аллергены.

Фагоцитарная активность лейкоцитов. Ведущую роль в фагоцитозе играют нейтрофильные гранулоциты и макрофаги. Активность нейтрофильных гранулоцитов можно установить несколькими методами, принимая во внимание следующее: **способность к адгезии** — определение количества клеток, фиксирующихся на стеклянной пластинке при 37°C; **миграцию** — выход нейтрофильных гранулоцитов из капилляров в окружающую ткань (метод «кожного окна»); **хемотоксис** — способность клеток перемещаться в направлении химического градиента; **фагоцитарную активность** — способность захватывать и уничтожать бактерии. Этот тест наиболее полно характеризует функциональные способности нейтрофильных гранулоцитов и широко применяется для

При постановке фагоцитарной реакции учитывают три показателя: 1. активность фагоцитоза (фагоцитарный показатель, процент фагоцитоза) — процент фагированных бактерий; 2. интенсивность фагоцитоза (фагоцитарный индекс, фагоцитарное число) — среднее число микробов, поглощенных одним нейтрофильным гранулоцитом; 3. завершенность фагоцитоза (индекс переваривания) — отношение числа погибших микробных клеток к живым в мазке или снижение интенсивности роста микробов после контакта их с кровью.

Реакция бесубстратного восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест).

Основана на уникальной способности фагоцитов утилизировать кислород с образованием высокорекреогенных свободных радикалов. НСТ-тест принадлежит к чувствительным индикаторам нормы и патологии.

НСТ-тест предложен для разграничения острых бактериальных и вирусных инфекций.

иммуноглобулины

Идея лечить инфекционные заболевания заранее приготовленными препаратами антител, хотя и вытесняемая успехами антибиотикотерапии, все же сохраняет свою ценность в определенных ситуациях. Когда токсины уже проникли в кровоток (например, при столбняке или после укуса змеи) и для их нейтрализации требуется высокий титр специфических антител, жизнь спасти удаётся только введением именно таких препаратов, изготавливаемых обычно из плазмы крови гипериммунизированных лошадей, а иногда из сывороток переболевших животных.

Если расположить препараты антител по градиенту удельной активности, то в конце этого ряда окажется **нормальный иммуноглобулин** - препарат, приготовленный из смеси образцов крови неиммунизированных доноров (**реконвалесцентов**), но содержащий тем не менее антитела к возбудителям банальных инфекций в количестве, вполне достаточном для того, чтобы при введении обеспечивать в течение месяца защиту от инфекции.

Изготовление лечебно-профилактических иммунных сывороток и иммуноглобулинов производит биологическая промышленность. В качестве продуцентов иммуносывороток используют лошадей, мулов, ослов, волов и реже другие виды животных. **Гипериммунизацию** осуществляют нарастающими дозами антигенов по утвержденным производственным схемам, отличающимся продолжительностью иммунизации, интервалами между циклами иммунизации, дозами. По окончании цикла иммунизации, когда в сыворотке крови продуцентов находится максимальное количество специфических антител, у животных берут кровь. Чаще это делают на 10... 14-е сутки после введения продуценту последней дозы антигена.

Из крови выделяют сыворотку общепринятыми методами и стерилизуют ее через бактериальные фильтры **или методом тиндализации**. В качестве консервантов **используют** 0,25...0,5%-е растворы фенола, 0,01...0,03%-е растворы тиомерсала (мертиолята) или другие. Контроль на стерильность сыворотки проводят по общепринятой методике посевами из препарата на питательные среды (МПА, МПБ с глюкозой, МППБ и на агар

- **Безвредность** каждой серии сывороточных препаратов проверяют на лабораторных животных, которым подкожно вводят 10 мл сыворотки. Они должны оставаться здоровыми, без выраженных проявлений местной и общей реакции. **Специфическую активность** сывороточных препаратов определяют с помощью реакции биологической нейтрализации: чем меньше доза сыворотки, способная нейтрализовать действие определенной дозы инфекционного агента или токсина, тем выше ее активность. На каждую проверенную серию сыворотки **заполняют паспорт**, в котором указывают основные показатели: биофабрику, изготовившую сыворотку, название препарата, номер серии, дату изготовления, метод консервирования, титры, сроки и способы хранения.
- На этикетке указывают **лечебные и профилактические дозы** в зависимости от вида и возраста животных. Вводят сыворотку обычно внутримышечно или внутривенно. Гипериммунные сыворотки применяют для лечебных и профилактических целей, так как они создают лишь временный пассивный иммунитет. Иммунитет наступает в ближайшие часы после введения сыворотки (2...3 ч) и не превышает 2...3 нед.

антитоксическая сыворотка против колибактериоза телят, поросят, ягнят; гипериммунная сыворотка против пастереллеза крупного рогатого скота, буйволов, овец и свиней; сыворотка против рожи свиней; антитоксическая сыворотка против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец; сыворотка против диплококковой септицемии телят, ягнят, поросят; антитоксическая противостолбнячная сыворотка.

Сыворотка реконвалесцентов. Эта сыворотка крови переболевших животных, содержащая специфические антитела, применяется с лечебной и профилактической целями.

Сыворотку **реконвалесцентов** рекомендуется получать и применять животным в одном и том же хозяйстве. Кровь от животных-доноров берут непосредственно в хозяйстве или во время убоя их на мясокомбинате.

Диагностические иммунные сыворотки и иммуноглобулины. Получают путем гипериммунизации животных соответствующим антигеном (возбудителем). В большинстве случаев **продуцентами диагностических сывороток являются лабораторные животные (кролики, морские свинки), петухи и реже лошади.** Готовые сыворотки проверяют на стерильность, активность и специфичность. Все диагностические сыворотки содержат специфические антитела к определенному антигену.

Диагностические сыворотки применяют в серологических реакциях в следующих целях:

- для определения возбудителя болезни в патологическом материале (сибирская язва и др.);
- при определении вида (серогруппы, серовара) возбудителей инфекции, выделенных в чистой культуре (сальмонеллез, бруцеллез, листериоз и др.)

Основная масса которых представлена альбуминами и глобулинами.

Активность антител установлена только у глобулиновой фракции сыворотки, в которой методом электрофореза обнаружены α -, β - и γ -глобулины. При гипериммунизации животных в сыворотке крови увеличиваются γ - и β -глобулиновые фракции. В настоящее время белки, синтезирующиеся в организме в ответ на антигенное раздражение и обладающие свойством антител, обозначают термином **«иммуноглобулины»**.

Таким образом, **антитела, синтезирующиеся в организме, неоднородны**; с целью удаления неактивных, балластных белков, повышения эффективности и получения препаратов с высоким содержанием специфических антител применяют методы очистки и концентрирования последних.

Принципы очистки сывороток основаны на выделении из них **активных белковых фракций — иммуноглобулинов** — и удалении балластных фракций, не являющихся носителями антител.

Препараты иммуноглобулинов, содержащие γ - и β -глобулиновые фракции сыворотки крови, намного превосходят по своей профилактической и лечебной эффективности препараты, состоящие из нативной сыворотки.

В настоящее время выпускают специфические иммуноглобулины против бешенства, столбняка, сибирской язвы и др. Иммуноглобулины вводят подкожно или внутримышечно в дозах 0,5...2,0 мл/кг массы тела.

Антитоксические сыворотки. Сыворотки, в состав которых входят антитела (иммуноглобулины), способные специфически связывать и нейтрализовать токсины микробного, растительного и животного происхождения. В целом же данным термином называют гипериммунные сыворотки, содержащие эти антитела.

Антитоксины применяют для профилактики и лечения столбняка, ботулизма, злокачественного отека. Сыворотки вводят на ранних сроках заболевания.

Антитоксинотерапия неэффективна, если клинические признаки болезни уже четко выражены, так как антитоксины не оказывают лечебного действия и могут лишь предотвратить развитие интоксикации. Как и у всех иммуноглобулинов, их

Диагностические антигены и

аллергены

Принцип и методика приготовления антигена аналогичны приготовлению инактивированных вакцин.

Антигены, как и другие диагностические препараты, готовят на биофабриках (биокомбинатах). Антигены в своем составе содержат убитые целые микробные клетки или экстракты, полученные из соответствующих микроорганизмов.

В ветеринарии для диагностики инфекционных болезней используют следующие антигены:

1. Единый бруцеллезный антиген для РА, РСК (РДСК) — биомасса из вакцинного штамма 19, выращенная на обогащенном печеночном агаре, которую инактивируют нагреванием и устанавливают концентрацию микробных клеток по оптическому стандарту до 10 млрд/мл.
2. Бруцеллезный антиген для кольцевой реакции с молоком (КР) — взвесь убитых нагреванием бруцелл, окрашенных в синий цвет гематоксилином.
3. Бруцеллезный антиген для РА на стекле (роз-бенгал) — суспензия убитых нагреванием и фенолом бруцелл, окрашенных бенгальским розовым.
4. Стандартный сибиреязвенный антиген для РП — экстракт из убитых нагреванием бацилл вирулентного штамма сибирской язвы.
5. Сальмонеллезные антигены.

- Аллергены в качестве диагностических препаратов представляют собой также экстракты из бактериальной массы. Их выпускают биофабрики (биокомбинаты).
Указанные препараты используют при аллергической диагностике туберкулеза (туберкулин), паратуберкулеза (паратуберкулин), бруцеллеза (бруцеллин), сапа (маллеин), туляремии (тулярин), сибирской язвы (антраксин) и др.
Туберкулин готовят путем выращивания культур микобактерий туберкулеза бычьего и человеческого вида на мясопептонном глицериновом бульоне (в течение 6...8 нед). Затем культуру стерилизуют в автоклаве, упаривают до 1/10 объема, отслаивают, фильтруют через бактериальные фильтры (Зейтца) и добавляют 50%-й раствор глицерина. Контроль качества аллергена включает в себя установление стерильности и специфической активности. Специфическую активность проверяют на здоровых и реагирующих на аллерген животных параллельно со стандартным аллергеном.
Бактериофаги-вирусы. Обладают способностью проникать в бактериальные клетки, репродуцироваться в них и вызывать их лизис. Источником фагов патогенных микробов служат больные и переболевшие животные и люди, выделяющие с фекалиями фаги во внешнюю среду.
Фаг получают путем добавления в котлы с бульонными бактериальными культурами производственного фага. После выдерживания при 37°C в течение суток культуры фильтруют через бактериальные фильтры. Фильтрат проверяют на чистоту, стерильность, безвредность и активность.
Учитывая высокую специфичность действия бактериофагов на гомологичные им организмы, для дифференцирования и индикации некоторых видов бактерий с успехом применяют соответствующие фаги (например, при сибирской язве, сальмонеллезных инфекциях и др.). Разработана фагодиагностика многих инфекционных болезней

Правила использования и хранения биопрепаратов,

их транспортировка

Эффективность биологических препаратов во многом зависит от соблюдения правил применения, режима и условий их хранения.

В работе с биопрепаратами необходимо действовать в соответствии с рекомендациями и наставлениями по их применению. Соблюдение условия хранения биопрепаратов гарантирует стабильность иммуногенных свойств, их высокую активность и специфичность. Повышенные требования предъявляют к хранению и транспортировке живых аттенуированных вакцин, так как разгерметизация флаконов, как правило, приводит к инаktivации вакцинных штаммов. Сухие биопрепараты имеют ряд существенных преимуществ, так как они сохраняют свои свойства в довольно широком диапазоне температур. Вакцины, содержащие в своем составе депонирующие вещества, перед применением необходимо интенсивно взбалтывать до получения равномерной взвеси.

При растворении сухих биопрепаратов применяют только указанный в наставлении разбавитель. Живые вакцины, оставшиеся после проведения вакцинации, подлежат уничтожению кипячением.

Все флаконы и ампулы с биопрепаратами должны быть опечатаны и снабжены этикетками, на которых указывают наименование препарата, биофабрику, дату выпуска, срок годности, серию, номер госконтроля, дозировку. Хранят и транспортируют прививочные средства при условиях, не влияющих на их макроскопический вид, специфические свойства в течение срока годности.

В производственных условиях биопрепараты хранят в холодильных установках с определенным микроклиматом или на специальных складах (подвалы). Помещения (склады) для хранения биопрепаратов должны быть сухими, темными и прохладными, с равномерной в течение всего года температурой от 2 до 15 °С. Для хранения каждого вида препарата должно быть выделено оборудованное определенное место или отделение (полка, шкаф). Воспрещается совместное хранение годных и выбракованных препаратов. Помещение для хранения препаратов должно быть закрыто, а ключ должен находиться у ответственного лица, который в специальной книге ведет строгий учет поступления и расходования. Биопрепараты выбраковывают при отсутствии на флаконах этикеток, повреждении упаковки, просачивании препарата через пробку, промерзании, наличии посторонних примесей, плесени, пленок, комочков, гнилостного запаха, изменений установленной консистенции и цвета. Браковку препаратов проводят комиссионно с участием ветеринарного врача. Уничтожение забракованных препаратов проводят путем автоклавирования или кипячения при составлении акта. Транспортировку больших партий биопрепаратов в зимнее время производят в обогреваемых вагонах или на обогреваемых автомашинах.

Лиофилизация микроорганизмов (биологических препаратов). Вода удаляется из замороженного материала путем испарения льда, минуя жидкую фазу. Лиофилизированные биопрепараты сохраняют длительное время свои первоначальные свойства и легко растворяются в воде. Лиофильная сушка биопрепаратов включает в себя в два этапа: Жидкие биопрепараты, разлитые по ампулам или флаконам, замораживают при температуре —40...—60 °С.

Замороженные препараты переносят в сушильную камеру и создают глубокий