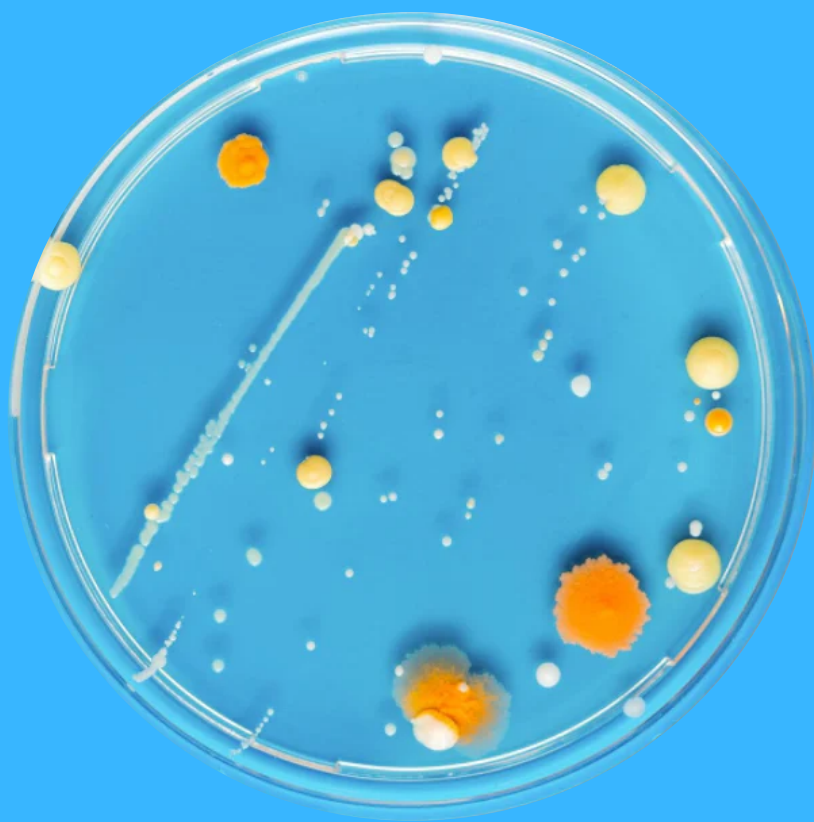


ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии
имени академика А.А. Воробьева ИОЗ имени Ф.Ф. Эрисмана

Рабочая тетрадь по микробиологии и иммунологии



г. Москва

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

Институт общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева



УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИММУНИТЕТЕ

**(учебно-методическое пособие по общей микробиологии для
организации самостоятельной работы студентов на практических
лабораторных занятиях)**

Авторский коллектив: ***Е.О. Халтурина***
 М.И. Карсонова

Москва - 2022

КУРС: «УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИММУНИТЕТЕ»

Цель раздела. Знать: свойства патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, их роль в возникновении инфекционного процесса; защитные механизмы микроорганизмов; строение и функции иммунной системы; виды иммунитета; факторы врожденного и адаптивного (приобретенного) иммунитета; современные методы диагностики инфекционных болезней; принципы и проблемы вакцинопрофилактики и серотерапии инфекционных болезней.

Уметь: поставить диагностические иммунологические реакции и интерпретировать полученные результаты; обосновывать выбор препаратов для иммунопрофилактики и иммунокоррекции инфекционных и неинфекционных болезней.

ЗАНЯТИЕ-

Тема: «ИНФЕКЦИЯ. ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ (семинар)»

Инфекция (infectio /лат./ - загрязнение, заражение) – проникновение в организм болезнетворных микроорганизмов и возникновение сложного комплекса процессов взаимодействия.

Инфекционный процесс – процесс взаимодействия патогенного микроорганизма и восприимчивого макроорганизма в определенных условиях окружающей среды.

Инфекционная болезнь – крайняя степень развития инфекционного процесса.

«Инфекционный процесс» и «инфекционная болезнь» – это не равнозначные понятия. Каждый человек ежедневно сталкивается с миллионами микробов, при этом процесс взаимодействия заканчивается, как правило, победой макроорганизма - и болезнь не возникает. Для возникновения инфекционного процесса и инфекционного заболевания необходимо три компонента (фактора): микроорганизм (возбудитель инфекции), макроорганизм (человек) и окружающая среда. Формы взаимодействия инфекционного агента и организма человека разнообразны и зависят от свойств возбудителя, особенностей реактивности макроорганизма и условий окружающей среды

ВОЗБУДИТЕЛЬ – ИСТОЧНИК - ПЕРЕНОСЧИК

Возбудитель инфекционной болезни – это патогенные микробы, которые способны вызывать заболевание. В зависимости от природы инфекционного

агента болезни разделяют на вирусные, бактериальные, грибковые (микозы), протозойные.

Источник инфекции – это объект, в котором в естественных условиях размножается, накапливается и выделяются во внешнюю среду возбудители и могут заражать здоровых людей.

Инфекционные заболевания делятся по источнику заболевания на:

- 1) **антропонозы** – инфекционные заболевания при которых источником является человек;
- 2) **зоонозы** – инфекционные заболевания при которых источником является животные;
- 3) **сапронозы** – инфекционные заболевания при которых источником заражения являются объекты окружающей среды (воздух, вода, почва).

Переносчик инфекции – это организм, который не вызывает болезни сам по себе, но способен передавать возбудителей инфекционных болезней.

Переносчики относятся к членистоногим (вши, блохи, комары, клещи и др.)

Механизмы и пути передачи инфекционных заболеваний

Механизмы заражения	Пути передачи инфекции	Факторы передачи инфекции	"Входные ворота" инфекции	Группа инфекционных заболеваний
Фекально-оральный	<i>Пищевой (алиментарный)</i>	Контаминированные пищевые продукты	Рот, желудочно-кишечный тракт	Кишечные инфекции
	<i>Водный</i>	Инфицированная вода		
	<i>Контактно-бытовой</i>	Грязные руки, контаминированная посуда, «механические» переносчики (мухи, тараканы)		
Аэрогенный	<i>Воздушно-капельный</i>	Капли слюны из носоглотки при кашле, чихании, разговоре, шепоте и дыхании	Слизистые оболочки дыхательных путей	Респираторные инфекции (инфекции дыхательных путей)
	<i>Воздушно-пылевой</i>	Частицы пыли, несущие на себе микробы		
	<i>Аэрозольный</i>	Пылевой или водный аэрозоль		
Кровяной	Прямой	<i>Трансфузионный</i>	Кровь	Кровяные инфекции
		<i>Трансплацентарный</i>		
		<i>Половой</i>		
	Непрямой	<i>Трансмиссивный</i>		
Контактный	<i>Контактный (прямой)</i>	Контаминированные руки (при рукопожатии, дотрагивании и т.п.), поцелуй, укус животного, травма, прохождение плода через инфицированные родовые пути матери	Кожа, слизистые оболочки мочевыделительной и половой систем, конъюнктивы глаз, волосы, ногти	Контактные инфекции
	<i>Половой (прямой)</i>	Половой контакт		Сексуально-трансмиссивные инфекции
	<i>Контактно-бытовой (непрямой)</i>	Контаминированные предметы (контакт или ранение), все виды оружия, медицинская аппаратура перевязочный материал		Контактные инфекции

ФОРМЫ ИНФЕКЦИИ

По происхождению: *экзогенная, эндогенная*

По локализации возбудителя: *очаговая (локальная, местная), генерализованная*

По количеству возбудителя: *моноинфекция, смешанная (mixed-инфекция)*

По длительности взаимодействия микроба с организмом:

-острая (до 3 месяцев);

-подострая (от 3 до 6 месяцев);

-хроническая, микробоносительство, латентная (от 6 месяцев)

По характеру клинических проявлений:

-манифестная форма (полный набор характерных клинических симптомов),

-инаппаратная форма (бессимптомная)

По очагу распространенности:

-спорадическая – невысокий, обычный для данной местности и времени уровень заболеваемости;

-эпидемия – массовое распространение инфекционного заболевания в какой-либо местности, значительно превышающее обычный уровень заболеваемости;

-пандемия – эпидемия, охватывающая значительную часть населения страны, группы стран, континента

ФОРМЫ ГЕНЕРАЛИЗАЦИИ

Бактериемия – циркуляция бактерий в крови без размножения в ней

Сепсис (септицемия) – генерализованная форма инфекции, при которой возбудитель циркулирует и размножается в крови

Септикопиемия – процесс размножения бактерий в крови с формированием вторичных гнойных очагов во внутренних органах

Антигенемия – наличие антигенов в крови в форме комплексов, представляющих целиком клетку микроба или отдельные антигены микробов

Токсинемия – циркуляция токсинов бактерий в крови

ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Патогенность – потенциальная способность микроба вызывать инфекционный процесс

у определенного макроорганизма при определенных условиях окружающей среды.

Является генотипическим признаком (контролируется хромосомными генами).

Является видовым признаком (присущим виду микроба).

Вирулентность – степень патогенности, индивидуальное свойство конкретного штамма микроба вызывать инфекционный процесс.

Контролируется хромосомными и плазмидными генами.

Изменяется под действием окружающей среды.

Единицы измерения вирулентности бактерий

LD (dosis letalis) – наименьшее количество живого возбудителя или его токсина, вызывающего в определенный срок гибель определенного количества (%) подопытных животных.

LDm (dosis letalis minima) – наименьшее количество живого возбудителя или его токсина, вызывающего в определенный срок гибель 95% подопытных животных.

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ

Факторы, обуславливающие способность микробов вызывать инфекционный процесс.

Адгезия	-пептидогликан; -пили, основные белки наружной мембраны, ЛПС. -поверхностные белки, липотейхоевые кислоты у Gr⁺ бактерий; -капсула бактерий; -белок Р1 в составе выростов ЦПМ у бактерий рода <i>Mycoplasma</i>; -белки капсида, гликопротеины суперкапсида у вирусов
----------------	--

Инвазия	- инвазины – белки наружной мембраны Грам-бактерий; - некоторые ферменты агрессии
Колонизация	- IgA-протеазы; - антилимфоцитарный фактор бактерий; - продукция бактериоцинов, антиоксидантов, сидерофоров
Антифагоцитарная активность	- капсула, микрокапсула, слизистый чехол; - антигены, входящие в их состав (экранируют поверхностные структуры микробов, защищают от действия лизосомальных ферментов и перекисных радикалов)
Ферменты агрессии	- гиалуронидаза (соединительная ткань); - нейраминидаза (слизистые оболочки); - фибринолизин (сгустки фибрина); - плазмокоагулаза (переводит фибриноген в фибрин); - коллагеназа (коллаген мышечных волокон); - лецитиназа С (лецитин и фосфоглицериды)
Другие факторы патогенности	- жгутики – H-антиген; - гемолизины и пр.
Токсины бактерий	- эндотоксины; - экзотоксины

ТОКСИНЫ БАКТЕРИЙ

ЭНДОТОКСИНЫ	- липополисахариды, липид А отвечает за токсичность - обнаружены только у Гр- бактерий - - относительно термостабильны; выдерживают нагревание при температуре 60°C в течение часа без потери токсичности - слабые иммуногены; титры специфических антител и их защитная функция ниже, чем для экзотоксинов - не трансформируются в анатоксины, не чувствительны к формалину - умеренно токсичны; смертельные дозы для животных измеряются десятками и сотнями микрограмм - эндотоксины разных групп бактерий не имеют строго специфичных рецепторов, не обладают
--------------------	---

	органо-тропностью. -CD14 – общий рецептор для ЛПС - все эндотоксины имеют общий эффект: гипертермия, токсикоз, слабость, одышка, диарея, нарушения сердечно-сосудистой системы, снижение давления, гипогликемия, при образовании больших доз эндотоксина в крови – эндотоксический шок - синтез контролируется хромосомными генами
ЭКЗОТОКСИНЫ	- выделяются живой клеткой; в высоких концентрациях обнаруживаются в жидких питательных средах - продуцируются Гр⁺ и Гр⁻ бактериями - полипептиды - относительно термонестабильны; токсичность часто быстро теряется при температуре выше 60°C - обладают высокой антигенностью; стимулируют образование высоких титров антитоксинов (антител) в сыворотках крови; -антитоксины нейтрализуют экзотоксины - трансформируются в анатоксины (токсины, лишенные своих токсических свойств, но сохранившие антигенность) при действии 0,4% р-ра формалина при 38-40°C в течение 4 недель; -анатоксины используют для вакцинации - создания приобретенного искусственного активного антитоксического иммунитета - высокотоксичны; смертельные дозы для животных составляют единицы микрограммов и менее - каждый экзотоксин имеет специфические рецепторы на клетках-мишенях - каждый экзотоксин обладает специфическим эффектом - часто синтез контролируется экстра хромосомными генами (например, плазмидами)

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОТОКСИНОВ

- Токсины, повреждающие клеточные мембраны: энтеротоксины, нейротоксины;
- Токсины, ингибирующие синтез белка: эритрогенин, цитотоксины (гемолизины, лейкоцидины);
- Токсины, активирующие пути метаболизма вторичных мессенджеров (холероген и пр);
- Протеазы;
- Суперантигены

Токсигенность – способность бактерий образовывать белковые токсины.

Токсичность – свойство бактерий образовывать токсические вещества, вызывающие

симптомы интоксикации, в том числе выделять в окружающую среду при разрушении бактерий эндотоксины.

Токсинемическая инфекция – инфекция, при которой возбудитель находится во входных воротах инфекции, а выделенный им экзотоксин циркулирует в крови, повреждая органы и ткани.

Условия возникновения инфекционного процесса:



Активность и интенсивность этого процесса связаны с эффективностью действия всех условий и зависят от дозы и вирулентности возбудителя, от состояния естественных защитных барьеров макроорганизма и места проникновения возбудителя (входных ворот инфекции).

Любое инфекционное заболевание характеризуется своей динамикой, последовательной сменой разных периодов: инкубационного, продромального, клинического (разгар болезни) и исход заболевания.

Восприимчивый макроорганизм

Способность организма противостоять различным микробам обусловлена двумя механизмами: развитием врожденного и адаптивного (приобретенного) специфического иммунного ответа к отдельным патогенам на основе гуморальных и клеточных факторов, которая сразу направлена против множества инфекционных агентов

ИММУННАЯ СИСТЕМА

Иммунная система человека имеет сложную структурно-функциональную организацию и состоит из центральных органов (тимус и красный костный мозг), где происходят процессы антигеннезависимой дифференцировки лимфоцитов (иммунопоз), периферических органов (селезенка, лимфатические узлы, пейеровы бляшки), где происходит антигензависимая дифференцировка лимфоцитов (иммуногенез) и лимфоидной ткани, ассоциированной с кожей и слизистыми/серозными оболочками или иммунной системы кожи, слизистых/серозных оболочек, печени (системы SALT – Skin-Associated Lymphoid Tissue; MALT— Mucosal-Associated Lymphoid Tissue; GALT— Gut-Associated Lymphoid Tissue; BALT— Bronchus-Associated Lymphoid Tissue; NALT— Nose-Associated Lymphoid Tissue; VALT— Vulvovaginal-Associated Lymphoid Tissue). Расположение периферических органов иммунной системы и систем SALT, BALT MALT и пр соответствует основным путям проникновения и распространения биологических агентов (бактерии, вирусы, грибы, простейшие) в организме.

Основными задачами иммунитета являются: распознавание генетического отличия агрессивных чужеродных агентов и измененных собственных макромолекул от нормальных структур организма и устранение их влияния на биологические процессы, протекающие в организме, а также запоминание контакта с конкретными макромолекулами (антигенами), определяющее их ускоренное удаление при повторном попадании в организм. Конечными целями деятельности системы иммунной защиты являются сохранение гомеостаза, структурной и функциональной целостности и генетической индивидуальности

как отдельного организма, так и вида в целом, а также выработка средств профилактики подобных интервенций в будущем.

Иммунная защита от биологической агрессии как внешней, так и внутренней реализуется посредством триады реакций:

- распознавание чужеродных и измененных собственных макромолекул;
- элиминация (удаление) из организма антигенов и несущих их клеток и структур;
- запоминание контакта с конкретными антигенами, для ускоренной их элиминации при повторном поступлении в организм.

Для реализации этих задач на определенных этапах эволюции сформировалась специализированная система - **иммунная система**, которая представляет собой комплекс лимфоидных органов, а также диссеминированных по всему организму клеток, способных выполнять иммунологических функции. Жидкие среды организма (кровь, лимфа, межклеточная жидкость, ликвор и пр) объединяют в единое целое разобщенные компоненты иммунной системы, а также обеспечивают рециркуляцию (перемещение) клеток иммунной системы, способствуя поддержанию ее целостности. В рециркуляции способны принимать участие практически все клетки иммунной системы, а также гемопоэтические стволовые клетки.

В процессе эволюции сформировались специализированные клетки, имеющие мощные системы внутриклеточного киллинга, основной «профессией» которых является **фагоцитоз** (от греч. *phagos* — пожираю, *cytos* — клетка) — поглощение частиц диаметром не менее 0,1 мкм (в отличие от пиноцитоза — поглощения частиц меньшего диаметра и макромолекул) и уничтожение захваченных микробов. Такими свойствами обладают профессиональные фагоциты - полиморфноядерные лейкоциты (в основном нейтрофилы) и мононуклеарные фагоциты - моноциты/макрофаги.

Фагоцитоз складывается из нескольких последовательно протекающих этапов:

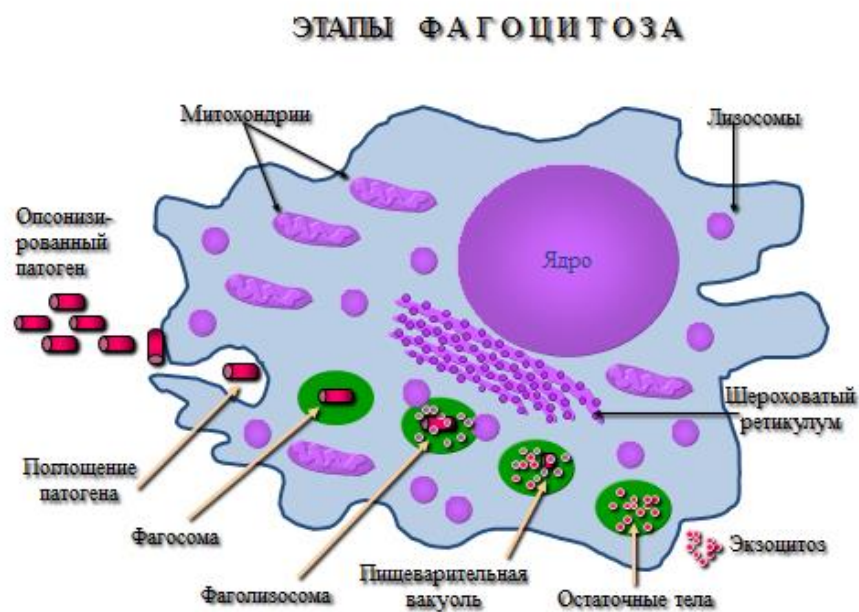
- активация и хемотаксис — целенаправленное движение клетки к объекту фагоцитоза в сторону повышающейся концентрации хемоаттрактантов, роль которых играют хемокины, компоненты комплемента и микробной клетки, продукты деградации тканей организма;

- адгезия (прикрепление) частиц к поверхности фагоцита. В адгезии важную роль играют PRR (патоген-распознающие рецепторы), а также рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулина и C3-компоненту комплемента (такой фагоцитоз называется иммунным).

- поглощение частиц, их погружение в цитоплазму и образование вакуоли (фагосомы);

- внутриклеточный киллинг (убийство) и переваривание. После поглощения частицы фагосомы сливаются с лизосомами — образуется фаголизосома, в которой бактерии гибнут под действием бактерицидных продуктов гранул.

Однако не все микроорганизмы чувствительны к бактерицидным системам фагоцитов и их выживание после контакта с фагоцитами называется **незавершенным фагоцитозом**.



Определение факторов вирулентности бактерий:

А. Гемолизины (гемолитическая активность)

Вирулентные штаммы стафилококков, стрептококков и др. образуют зоны α - или β -гемолиза вокруг колоний на кровяном агаре:

- α -гемолиз характеризуется появлением зеленоватых зон вокруг колоний на кровяном агаре, в результате выработки метгемоглобина (например, характерен для *Streptococcus pneumoniae*)

- β -гемолиз характеризуется образованием прозрачных зон вокруг колоний на кровяном агаре (характерен для *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*)

- γ - гемолиз- это отсутствие видимой зоны просветления вокруг колонии при росте на кровяном агаре

Задание:

- ◆ Определить может ли тестируемый микроорганизм продуцировать гемолизины.
- ◆ Сделать вывод о типе гемолиза.
- ◆ Зарисовать в рабочей тетради демонстрацию

В. Коагулазная активность

Вирулентные штаммы стафилококков (*Staphylococcus aureus*) обладают способностью коагулировать плазму в результате продукции плазмокоагулазы. Выделенную чистую культуру помещают в пробирку с цитратной плазмой кролика и затем инкубируют при 37° С. Процесс коагуляции плазмы в пробирке занимает около 2 часов, после чего можно определить наличие сгустка плазмы внутри пробирки.

Задание:

- ◆ Определить наличие (отсутствие) сгустка плазмы внутри пробирки.
- ◆ Сделать вывод о коагулазной активности стафилококка.
- ◆ Зарисовать в рабочей тетради демонстрацию

С. Лецитиназная активность

На желточно-солевом агаре (ЖСА) большинство вирулентных штаммов стафилококков формируют колонии, окруженные «радужным венчиком» за счет разложения лецитина яичного желтка с помощью фермента лецитиназы

Задание:

- ♦ Оценить лецитиназную активность различных штаммов стафилококка при росте на ЖСА. Обратить внимание на наличие (отсутствие) «радужного венчика», характеризующей лецитиназную активность.
- ♦ Зарисовать в рабочей тетради демонстрацию

D. Капсулы

Микроскопическое исследование окрашенных простым методом инкапсулированных бактерий позволяет выявить неокрашенные капсулы, которые содержат красные бактериальные клетки на розовом фоне (при окраске фуксином).

Задание:

- ♦ Изучить демонстрационные препараты
 1. *Streptococcus pneumoniae* в тканях (окрашивание фуксином). Бактерии располагаются попарно, имеют форму кокков, каждая пара которых окружена капсулой (бесцветным ореолом).
 2. *Klebsiella pneumoniae* в тканях (окрашивание фуксином). Бактерии расположены попарно или беспорядочно, представляют собой инкапсулированные палочки среднего размера.
 - ♦ Зарисовать демонстрационные препараты в рабочей тетради
- Фагоцитоз (завершенный фагоцитоз и незавершенный фагоцитоз).**

Задание:

- ♦ Изучить демонстрационные препараты:
 - *Staphylococcus aureus* в гное (окраска по Граму). Стафилококки расположены внутри цитоплазмы лейкоцитов и между лейкоцитами в мазке.
 - *Neisseria gonorrhoeae* в гное (окрашивание метиленовым синим; незавершенный фагоцитоз). Материал (гной) для микроскопического исследования взят из мочеиспускательного канала пациента с гонореей. *Neisseria gonorrhoeae* проявляется в виде бобовидных диплококков, расположенных в цитоплазме лейкоцитов.
- ♦ Зарисовать демонстрационные препараты в рабочей тетради

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ:

ЗАДАЧА №1

Среди бактерий, способных проникать и существовать внутри клетки хозяина, различают цитозольные и вакуолярные паразиты. Объясните различия между ними. Какие бактериальные системы принимают участие в формировании внутриклеточного бактериального паразитизма

ЗАДАЧА №2

Назовите, в чем заключается особенность строения белковых экзотоксинов. Объясните механизм защитного действия антитоксических сывороток, применяемых при лечении токсикоинфекций.

ЗАДАЧА №3

Для профилактики токсикоинфекций (дифтерия, столбняк) используют препараты анатоксинов. Объясните, что собой представляет анатоксин. Какой иммунитет он создает.

ТЕСТОВЫЙ КОНТРОЛЬ:

1. Факторы патогенности бактерий:

1. Спора
2. Гиалуронидаза
3. Капсула
4. Нейраминидаза

2. Экзотоксины бактерий:

1. Синтезируются грамположительными и грамотрицательными бактериями
2. Выделяются в окружающую среду в процессе жизнедеятельности бактерий
3. Липополисахарид клеточной стенки
4. Обладают специфичностью действия

3. Размножение возбудителя в крови:

1. Бактеремия
2. Сепсис
3. Рецидив
4. Токсинемия

4. Периоды в развитии инфекционного заболевания:

1. Продромальный

2. Реконвалесценция

3. Инкубационный

4. Суперинфекция

5. Патогенность микроба

1. Видовой признак

2. Способность вызывать инфекционное заболевание

3. Индивидуальный, признак штамма

4. Обеспечивает неспецифическую защиту макроорганизма

ЗАНЯТИЕ-

Тема: «АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ. ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ: РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ (РПГА, РЕАКЦИЯ КУМБСА И ДРУГИЕ); РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

АНТИГЕНЫ

Вещества, несущие признаки чужеродной генетической информации и способные при попадании во внутреннюю среду организма вызывать специфические иммунологические реакции направленные на удаление этих веществ из организма, получили название **АНТИГЕНОВ**.

Существует несколько признаков, которыми должно обладать вещество, чтобы выступать в качестве антигена: **чужеродность, иммуногенность, специфичность.**

ЧУЖЕРОДНОСТЬ заключается в том, что молекулы данного типа должны отсутствовать во внутренней среде организма. В тоже время требование чужеродности не является абсолютным – об этом свидетельствует возможность образования аутоантител, т.е. антител к собственным компонентам организма.

ИММУНОГЕННОСТЬ определяет способность антигена вызывать иммунный ответ. Иммуногенность зависит:

1) от пути и режима введения антигена в организм;

2) от структурно-химической природы антигена;

Антигены – это преимущественно белки и углеводы. Липиды и нуклеиновые кислоты слабоиммуногенны.

3) от молекулярной массы вещества;

С повышением молекулярной массы молекулы увеличивается иммуногенность антигена. Существует пороговый уровень размера молекулы определяющий появление иммуногенности, т.е. вещество может обладать специфичностью, но не вызывать иммунный ответ, если это низкомолекулярное соединение. Такие вещества называются **гаптенами**. Гаптены могут приобретать иммуногенные свойства только после конъюгирования с высокомолекулярными носителями, например, белками. К гаптенам относится широкий круг природных соединений:

пептидные и стероидные гормоны, различные лекарственные препараты, витамины и т.д.

4) **от генотипа реципиента**, т.е. от состава генов, контролирующих силу иммунного ответа.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ иммунного ответа обусловлена наличием в молекуле **антигенных детерминант** или **эпитопов** – небольших участков молекулы иммуногена, которые обладают четкой структурной индивидуальностью и которые комплементарны к активному центру антител или антигенраспознающих рецепторов лимфоцитов. Для углеводов характерны повторяющиеся однотипные детерминанты. Для белков свойственны разнообразные детерминанты, против каждой из них может быть индуцирована выработка антител. Размер эпитопов небольшой: 5-20 аминокислотных остатков или около 6 моносахаридных остатков. Размер детерминанты (эпитопа) определяется размерами паратопа или активного центра антигенсвязывающих рецепторов. В формировании антигенной детерминанты существенную роль играют 1) линейная последовательность аминокислотных остатков и 2) пространственная структура молекулы.

На поверхности молекулы формируются несколько одинаковых эпитопов – их количество определяет **валентность** антигена.

Перекрестно-реагирующие антигены: если на двух различных молекулах антигенов имеются одинаковые или сходные антигенные детерминанты, то антитела вырабатываемые на один антиген будут реагировать и со вторым антигеном, такие антигены и называются перекрестно-реагирующие.

КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИГЕНОВ

По происхождению различают экзогенные (возникшие вне организма) и эндогенные (возникшие внутри организма) антигены.

По природе: биополимеры белковой и небелковой (полисахариды, липиды, липополисахариды, нуклеиновые кислоты и др.) природы.

По молекулярной структуре: глобулярные (молекула имеет шаровидную форму) и фибриллярные (форма нити).

По степени иммуногенности: полные и неполные.

По степени чужеродности: ксено-, алло- и изоантигены.

По необходимости вовлечения Т-лимфоцитов в индукцию иммунного ответа, выделяют Т-зависимые и Т-независимые антигены.

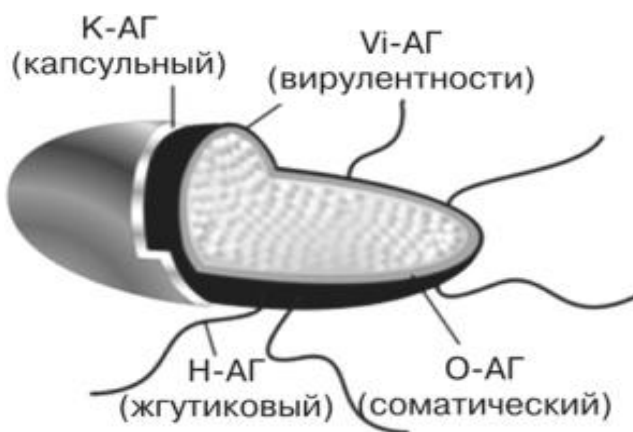
Суперантигены -антигены, которые вызывают поликлональную активацию лимфоцитов, а не клоноспецифическую, как обычные антигены.

Антигены гистосовместимости- это гликопротеиды цитоплазматических мембранах практически всех клеток макроорганизма. Большая часть из них относится к системе главного комплекса гистосовместимости, или МНС (от англ. Main Hystocompatibility Complex). Гены МНС локализованы в нескольких локусах короткого плеча 6 хромосомы и содержат гены 3 классов: I, II, III класса. Антигены гистосовместимости играют ключевую роль в осуществлении специфического распознавания «свой-чужой» и индукции приобретенного иммунного ответа, определяют совместимость органов и тканей при трансплантации в пределах одного вида и другие эффекты.

АНТИГЕНЫ БАКТЕРИИ

В структуре бактериальной клетки различают несколько видов антигенов: соматический О-антиген (LPS = липополисахарид), капсульный К-антиген (полисахаридом или белком) и флагеллярным Н-антиген (белок), Vi-антиген.

Жгутиковые, или Н-антигены, локализуются в их жгутиках и представляют собой эпитопы сократительного белка флагеллина. Соматический, или О-антиген, связан с клеточной стенкой бактерий. Его основу составляют липополисахариды. Капсульные, или К-антигены, встречаются у бактерий, образующих капсулу. Как правило, К-антигены состоят из кислых полисахаридов.



АНТИГЕНЫ ВИРУСОВ

В структуре вирусной частицы различают **ядерные, капсидные и суперкапсидные антигены**. Антигены вирусов различаются по происхождению, часть из них вирусоспецифические, кодируются в нуклеиновой кислоте вируса. Другие, являющиеся компонентами клетки хозяина (углеводы, липиды), формируют суперкапсид вируса при его выходе из клетки путем почкования. Антигены многих вирусов отличаются высокой степенью изменчивости, что связано с постоянными мутациями в генетическом материале вирусов. Примером могут служить вирус гриппа, ВИЧ и др

АНТИТЕЛА

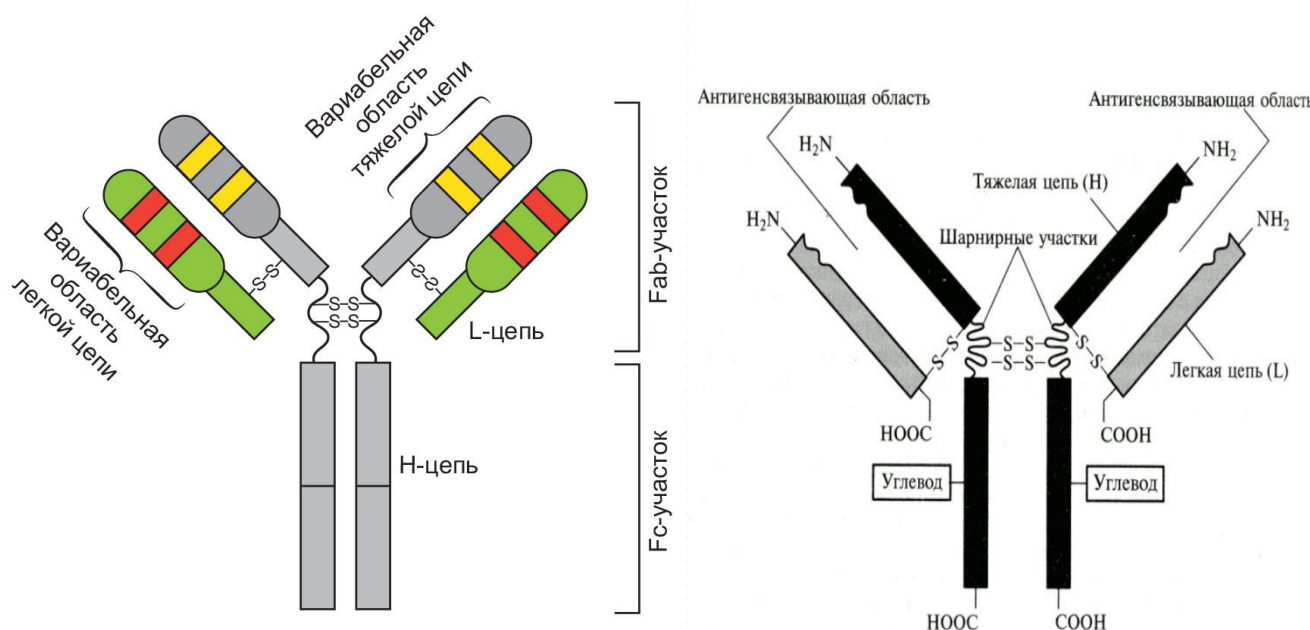
Генетически чужеродные вещества, попадая в организм человека, способны вызывать образование специфических белков крови – **антител (иммуноглобулинов)**.

Биологическая функция антител заключается в защите организма от проникновения чужеродных веществ путем образования прочных специфических иммунных комплексов с соответствующими антигенами и последующего удаления их из организма.

В организме антитела вырабатываются В-лимфоцитами, каждый из которых имеет на своей поверхности до 100 000 рецепторов одинаковой специфичности, способных узнавать любой чужеродный антиген. Антиген, встречаясь в кровотоке с комплементарным ему рецептором, проводит отбор (селекцию) соответствующего В-лимфоцита, который затем пролиферирует и дифференцируется в плазматическую клетку, образуя клон клеток. Каждый клон плазматических клеток секретирует гомогенные по своей структуре антитела.

Структура антител. Хотя существуют некоторые структурные вариации среди антител, типичная молекула антитела состоит из четырех белковых цепей, связанных вместе дисульфидными связями в том, что обычно иллюстрируется как Y-образная структура. Две более короткие цепи, называемые легкими (L) цепями, ковалентно связаны с ветвями более длинных (H) цепей. Каждая цепь имеет переменные и постоянные области. Обе цепи H и L делятся на области константные (обозначенные CH и CL) и области переменные (обозначенные VH и VL) Специфичность объединяющих сайтов антитела для антигена

определяется аминокислотной последовательностью в варибельных областях как H, так и L цепей.



Аминокислотная последовательность в константной области определяет другие характерные свойства антитела, такие как его способность проникать через тканевые барьеры цепи, активировать систему комплемента или активировать фагоциты

Паратоп- участок антигенсвязывающего центра молекулы антитела, который связывается с эпитопом. Паратоп находится на дистальной части варибельной области антитела и сможет связываться с одним эпитопом.

По своим антигенным, эффекторным свойствам и структурным особенностям иммуноглобулины подразделяются на пять основных классов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM.

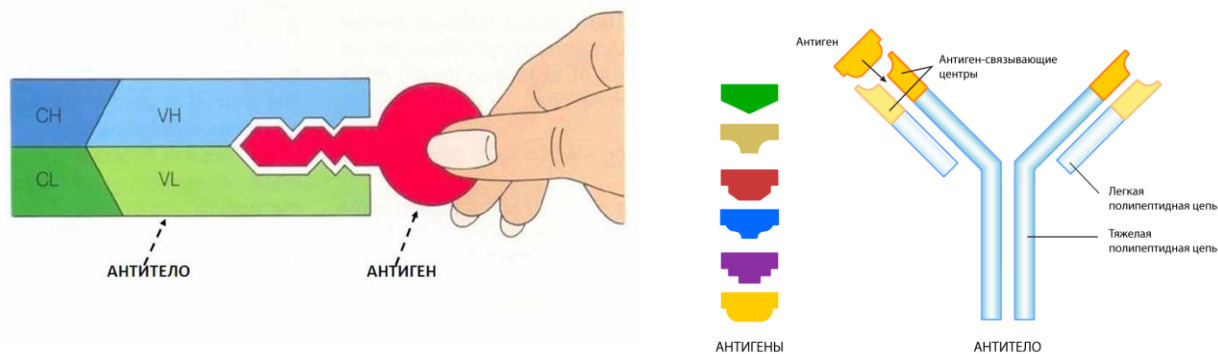
РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА

Иммунодиагностические или серологические (от лат. *Serum*- сыворотка) реакции - это реакции специфического взаимодействия между антителами и антигенами или между антителами и сенсibilизированными лимфоцитами, которые имеют визуальные или детектируемые проявления и могут быть учтены/оценены непосредственно или с использованием специальных приборов (спектрофотометр и пр).

Реакция антиген – антитело высокоспецифическая. В основе реакции антиген–антитело лежит взаимодействие между эпитопом антигена и активным центром антитела (паратопом), основанное на их пространственном соответствии (комплементарности или принцип «ключ - замок»). Образовавшийся комплекс носит название «иммунный комплекс» (ИК). Межмолекулярными силами, удерживающими антигены и антитела в составе иммунных комплексов, являются: электростатические; водородные; гидрофобные; силы Ван-дер-Ваальса.

Эти реакции происходят в живом организме и могут быть воспроизведены в лабораторных условиях (*in vitro*) для идентификации одного компонента с помощью другого.

Принцип комплементарности или принцип «ключ - замок»



Цели постановки серологических реакций:

- 1) идентифицировать «неизвестный антиген» (бактерии, вирус, токсин и т.д. в образце) с помощью «известного антитела» (диагностическая иммунная сыворотка содержащая антитела), то есть для серологической идентификации (сероидентификация, серотипирование);
- 2) для определения «неизвестного антитела» (в сыворотке крови пациента) с помощью «известного антигена» (диагностикум), то есть для серологической диагностики (серодиагностики) инфекционного заболевания.

Таким образом, неизвестный компонент определяют по известному, то есть один компонент в серологических реакциях всегда должен быть известен.

Общие принципы постановки серологических реакций:

1. Постановка реакций происходит преимущественно *in vitro*
2. Проявляются при высокой специфичности (иммунологическом соответствии или комплементарности) и эквивалентом соотношении антигена и антитела в оптимальных температурных условиях и pH среды.
3. Протекают в две фазы: специфическая и неспецифическая

Специфическая фаза- происходит связывание антитела с антигеном в результате чего образуется иммунный комплекс (АГ+АТ), который стабилизирован нековалентными связями: водородные связи, вандерваальсовы силы, гидрофобные взаимодействия и пр. Эта фаза развивается быстро, но ее визуальная детекция невозможна.

Индикаторная фаза - происходит более медленно и проявляет результат реакции, который либо визуализируется непосредственно (видимый результат), либо считывается при помощи специальных устройств и приборов (спектрофотометр, цитометр и пр)

Серологические реакции характеризуются двумя важными параметрами:

Специфичность - способность антигенов или антител реагировать только с гомологичными (высокоспецифичными, комплементарными) антителами, содержащимися в сыворотке крови, либо с гомологичными антигенами соответственно. Чем выше специфичность, тем меньше ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Чувствительность - определяется минимальным количеством АГ (или АТ) в образце, которое возможно выявить с помощью данной реакции. Чем меньше это количество, тем более чувствительной считается реакция.

Хотя большинство серологических реакций построены на одном и том же теоретическом принципе, методы обнаружения специфических реакций между антителом и антигеном различаются:

1. Реакция агглютинации - склеивание и выпадение в осадок цельноклеточных (корпускулярных) антигенов под действием антител в присутствии электролита
2. Реакция преципитации - осаждение мелкодисперстных (молекулярных) антигенов эквивалентным количеством антител в присутствии электролита

3. Реакция связывания комплемента – активация и связывание комплемента образовавшимся иммунным комплексом АГ+АТ
4. Реакция нейтрализации – взаимодействие между АГ и АТ, приводящее к потере или снижению биологической активности антигена.
5. Реакции с использованием меченых антител и антигенов (реакция иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ и радиоиммунный анализ)

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА)

В реакции агглютинации используют антигены в виде частиц. Антигены в виде частиц представляют собой относительно клеточные антигены, такие как бактерии, грибы и т.д., или некоторые растворимые антигены, адсорбированные на частицах (латекс, эритроциты, уголь и т.д.). Они могут быть связаны вместе специфическими антителами с образованием видимых агрегатов. Этот процесс называется агглютинацией. Реакции агглютинации очень чувствительны, относительно легко читаются и доступны в большом разнообразии.

Цели постановки РА:

1. Для идентификации видов и сероваров бактерий с помощью диагностических агглютинирующих сывороток (серотипирование)
2. Для обнаружения антител в сыворотке крови больного (серодиагностика)

Компоненты реакции агглютинации:

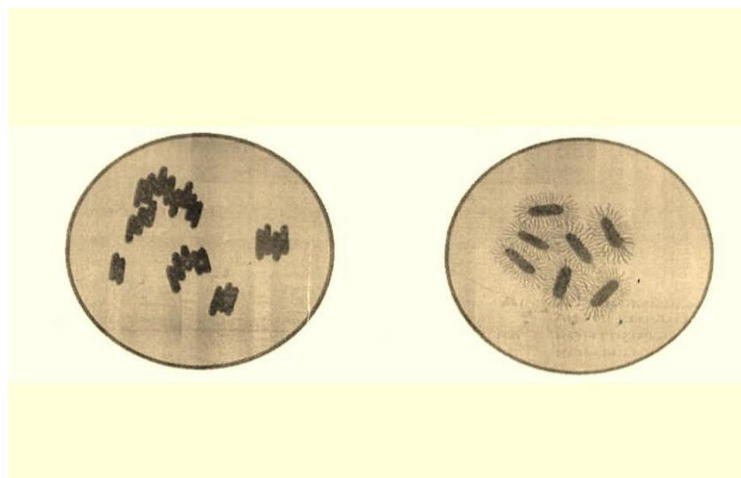
- 1) корпускулярный антиген (агглютиноген);
- 2) антитело (агглютинин);
- 3) электролит (изотонический раствор).

Агглютинирующие сыворотки содержат известные антитела (агглютинины). Они могут быть неадсорбированными (нативными) и адсорбированными.

Неадсорбированные сыворотки (нативные)- содержат групповые антитела к близкородственным видам антигенов.

Адсорбированные сыворотки - содержат антитела к одному (монорецепторная или моновалентная сыворотка) или нескольким (поливалентная сыворотка) антигенам одного вида микроба. Для получения адсорбированных сывороток используют метод адсорбции по Кастеллани.

Титр агглютинирующей сыворотки - это наибольшее разведение сыворотки, при котором еще обнаруживается визуальный результат/эффект реакции агглютинации (осадок, хлопья, агглютинаты).

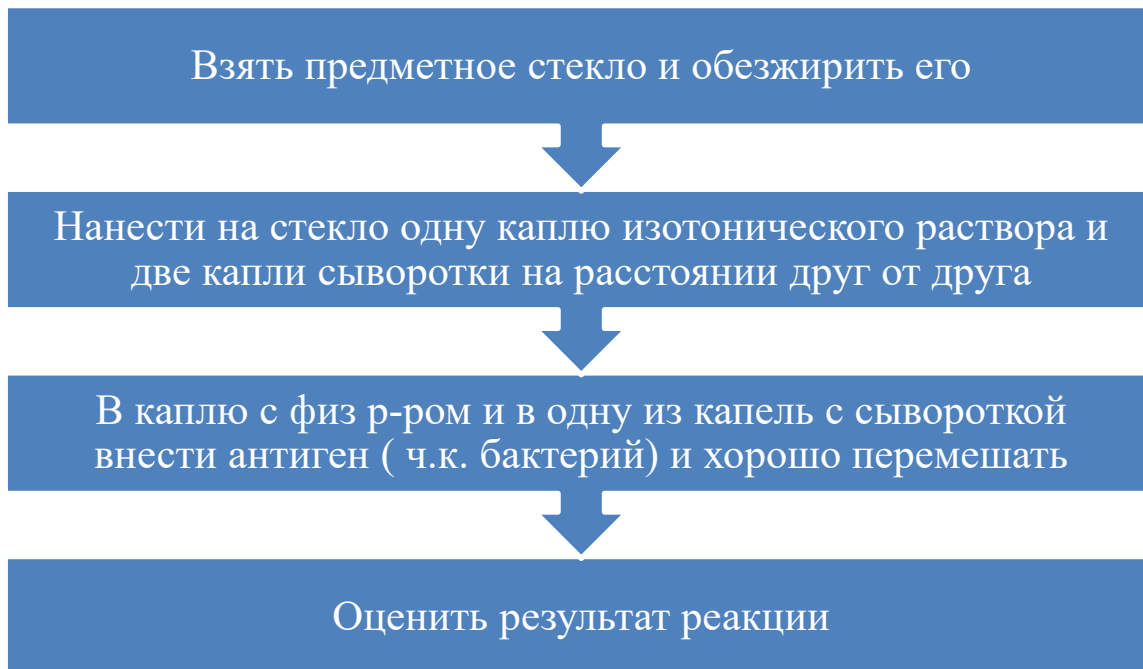


Методы постановки реакции агглютинации:

1. Реакция агглютинации на стекле (ориентировочная)
2. Развернутая реакция агглютинации (в пробирках)

Реакция агглютинации на стекле.

Последовательность действий



Контроль антигена - это капля физ р-ра+ антиген (ч.к. бактерий). Должен быть равномерно мутным

Контроль сыворотки - это капля сыворотки. Должен быть прозрачным.

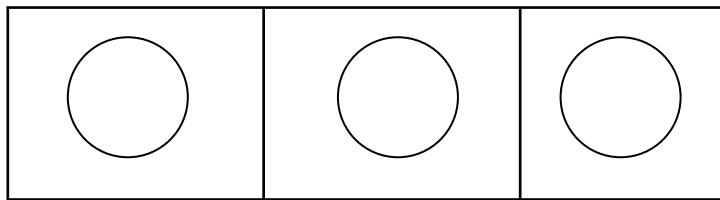
Опыт - капля сыворотки+ антиген (ч.к. бактерий)

Учет результата:

1. возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.
2. Результат считают **положительным**, если в опытной капле (капля сыворотки+ антиген - ч.к. бактерий) появился осадок в виде хлопьев (агглютинат, состоящий из комплексов АТ+АГ).
3. Результат считают **отрицательным**, если в опытной капле имеется равномерное помутнение как и в контроле антигена.

Рисунок . Реакция агглютинации на стекле

1. С адсорбированными сыворотками



Опыт
ч.к. бактерий+
брюшнотифозная сыв.

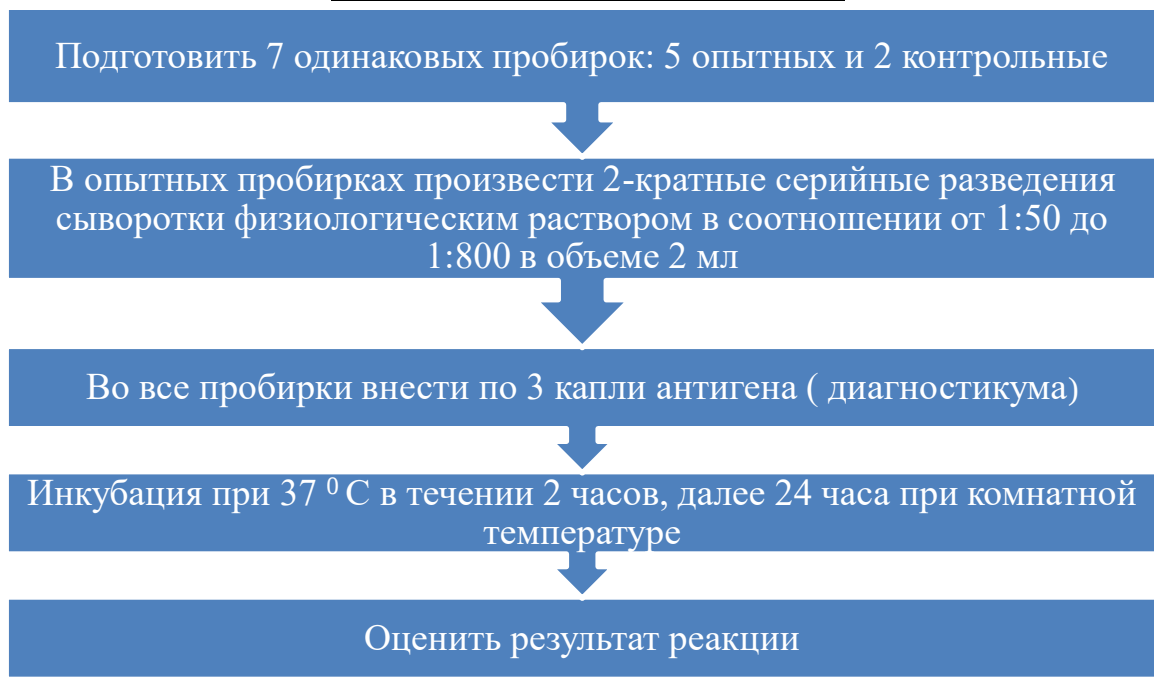
**Контроль
сыворотки**
(капля
сыворотки)

**Контроль
антигена**
(ч.к.+физ.р-р)

ВЫВОД:

Развернутая реакция агглютинации

Последовательность действий



Контроль сыворотки- исходное разведение сыворотки

Контроль антигена- -диагностикум или взвесь живых бактерий

Учет результата:

1. Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.

2. Учет результата проводят по характеру, количеству образовавшегося осадка в виде хлопьев (агглютинат, состоящий из комплексов АТ+АГ) или мутности.
3. О-антитела дают мелкозернистый осадок; Н-антитела- крупнозернистый (крупнохлопчатый)
4. Результат считают **отрицательным**, если в опытных пробирках раствор остается прозрачным как и в контролях.

РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ (ПАССИВНОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РПГА)

Реакция не прямой (пассивной) гемагглютинации - это реакция агглютинации, в которой либо антигены, либо антитела адсорбированы на эритроцитах, которые пассивно склеиваются при образовании иммунного комплекса АГ+АТ с образованием характерного осадка.

В качестве инертных корпускулярных носителей кроме эритроцитов могут использовать: частицы латекса, угля и т.д.

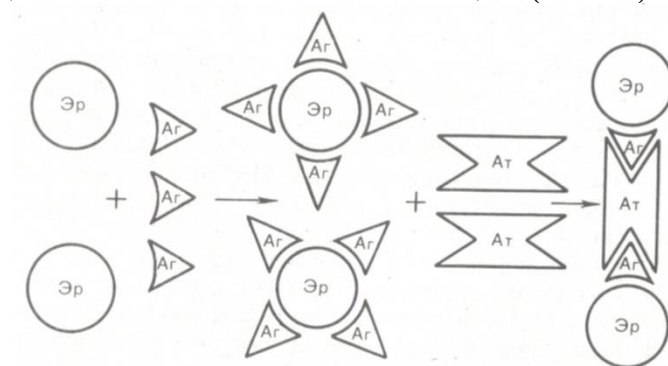
Если на поверхности носителя, например, эритроцита, адсорбированы антитела определенной специфичности, то получают **антительный эритроцитарный диагностикум** (используется для серотипирования)

Если на поверхности носителя, например, эритроцита, адсорбированы антигены, то получают **антигенный эритроцитарный диагностикум** (используется для серодиагностики).

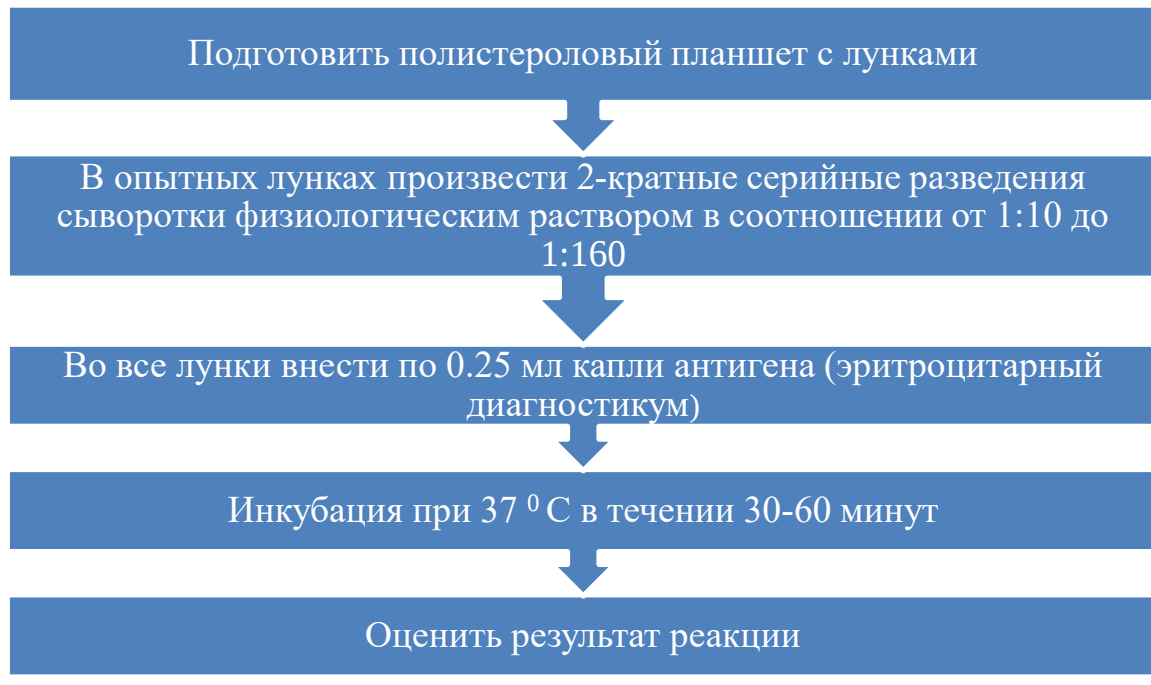
Цели постановки РПГА:

1. Для идентификации возбудителя по его антигенной структуре
2. Для индикации и идентификации бактериальных продуктов-токсинов в исследуемом патологическом материале.

Рисунок . Схема реакции пассивной гемагглютинации (РПГА)



Последовательность действий:



Контроль сыворотки- исходное разведение сыворотки+ физ раствор

Контроль антигена- эритроцитарный диагностикум+ физ раствор

Учет результата:

1. Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.
2. **Положительный результат** - в лунке характерный кружевной осадок эритроцитов, тонкая пленка с фестончатыми краями в виде «зонтика»
3. Результат считают **отрицательным**, если в опытных лунках эритроциты оседают на дно и имеют вид « пуговики» с ровными краями.

Титр РНГА - максимальное разведение сыворотки, дающее положительную реакцию («зонтик»)

Реакция не прямой (пассивной) агглютинации

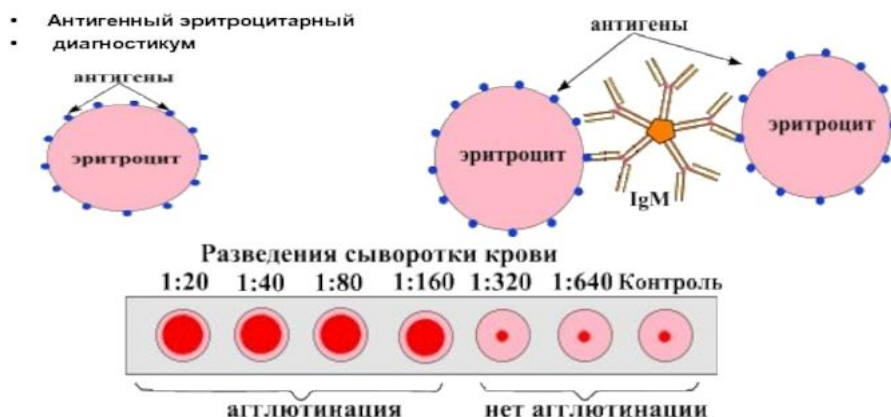


Таблица 16. Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА)

Ингредиенты	пробирки					Контроль антигена	Контроль сыворотки
	1	2	3	4	5		
Изотонический раствор, мл	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Сыворотка больного в исходном разведении 1:25, мл	0,25	→	→	→	→ вылить	--	--
Разведения сыворотки	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	--	1:10
Эритроцитарный диагностикум, мл	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	--
<i>При комнатной температуре в течение 30-60 минут</i>							
Результат:							
<u>ВЫВОД:</u> реакция пассивной гемагглютинации положительная до титра _____.							

РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ (РП)

Реакция преципитации (РП)- это реакция осаждения специфических мелкодисперстных (молекулярных) антигенов эквивалентным количеством антител в присутствии электролита.

Цели постановки РП:

Для выявления или идентификации антигена (преципитиногена) по известной преципитирующей сыворотке, содержащей антитела (преципитины), то есть для серотипирования.

Используется для диагностики ряда инфекций (туляремия, сибирская язва и пр); в санитарно-гигиенических исследованиях для установления фальсификации продуктов; в судебной медицине- для определения видовой принадлежности крови и других биологических жидкостей.

Компоненты реакции преципитации:

- 1) молекулярный антиген (прецитиноген) чаще белково-полисахаридной природы;
- 2) антитело (преципитин);
- 3) электролит (изотонический раствор).

Преципитирующие сыворотки получают путем гипериммунизации кроликов вводя им специфические преципитины-диагностикумы.

Титр преципитирующей сыворотки- это наибольшее разведение антигена, с которым эта сыворотка дает положительную реакцию.

Разновидности реакции преципитации



Реакция кольцепреципитации ставится в узких преципитационных пробирках, куда вносится иммунная сыворотка и на нее медленно наслаивается раствор антигена. При оптимальном соотношении антигена и антител на границе раздела этих двух растворов образуется кольцо преципитата молочного цвета.

Если в качестве антигенов в реакции кольцепреципитации используют прокипячённые и профильтрованные водные экстракты органов и тканей, то реакция носит название реакции **термопреципитации по Асколи**, применяемая для обнаружения термостабильных антигенов возбудителей сибирской язвы и чумы.



Последовательность действий:

В узкую преципитационную пробирку внести 0.2-0.3 мл преципитирующей сыворотки

Наклонив пробирку почти горизонтально, осторожно по стенке пробирки наслоить антиген (преципитиноген)

Медленно вернуть пробирку в вертикальное положение и наблюдать реакцию

Оценить результат реакции

Положительный контроль:

Контроль сыворотки- преципитирующая сыворотка

Контроль антигена- стандартный антиген

Отрицательный контроль: - с нормальной (неиммунной сывороткой) и исследуемым антигеном.

Учет результата:

1. Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.
2. **Положительный результат** – на границе раздела раствора антигена и антитела образуется белое кольцо-преципитат, состоящий из комплексов АГ+АТ.
3. Результат считают **отрицательным**, если растворы в пробирке остаются прозрачными.

Таблица . Реакция кольцепреципитации для определения неизвестного белка

Ингредиенты	Неизвестный белок
Преципитирующая сыворотка против белка человека	
Преципитирующая сыворотка против белка курицы	
<u>ВЫВОД:</u> Неизвестный белок принадлежит _____.	

Таблица . Реакция кольцепреципитации для определения неизвестного гаптена

Ингредиенты	Неизвестный белок
Преципитирующая сыворотка против <i>B.cereus</i>	
Преципитирующая сыворотка против <i>E.coli</i>	
<u>ВЫВОД:</u> Неизвестный гаптен принадлежит _____.	

РЕАКЦИЯ КУМБСА

Реакция Кумбса- реакция для выявления неполных антител при помощи антиглобулиновой сыворотки.

Цель постановки: выявление неполных антител для определения совместимости при гемотрансфузиях, при резус- конфликте, в диагностике ряда аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний (например, выявление неполных антител к возбудителю бруцеллеза)

Неполные (моновалентные) антитела, связываясь с эпитопами антигена, не образуют структуру решетки и реакция между антигенами и антителами не выявляется ни агглютинацией, ни преципитацией, ни другими тестами.

Для обнаружения образовавшегося комплекса антиген-антитело используют дополнительную тест систему (например, антиглобулиновая сыворотка при обнаружении антирезусных антител).

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ:

ЗАДАЧА №1

В лабораторию от больного брюшным тифом поступила кровь. Необходимо поставить развернутую реакцию агглютинации. Какие ингредиенты будут использованы для её постановки? Какой показатель реакции будет использован в качестве диагностики?

ЗАДАЧА №2

Лаборанту требуется поставить реакцию пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА) с целью определения экзотоксинов возбудителя. В лаборатории имеются следующие ингредиенты: 3% взвесь эритроцитов, гемолитическая система, эритроцитарный антительный диагностикум, бактериальный диагностикум, эритроцитарный антигенный диагностикум, растворимый диагностикум из бактериального гаптена, антиглобулиновая сыворотка, комплемент.

1. Какова цель постановки РПГА
2. Подберите необходимые ингредиенты для постановки реакции
3. Как должен выглядеть положительный результат реакции

ЗАДАЧА №3

В лабораторию поступил материал – образцы шкуры с кожзавода с целью выявления зараженности сырья возбудителем сибирской язвы. Какую серологическую реакцию следует применить для обнаружения термостабильного антигена возбудителя сибирской язвы в исследуемом материале? Можно ли использовать этот тест для обнаружения возбудителей при других заболеваниях, если да – то при каких

ТЕСТОВЫЙ КОНТРОЛЬ:

1. Реакция агглютинации

1. Определение неизвестных антител по известным антигенам
2. Определение неизвестных антигенов по известным антителам
3. Антиген в растворимом состоянии
4. Антиген в корпускулярном состоянии

2. Иммунодиагностика:

1. Применяется для определения антител к возбудителю в сыворотке больного
2. Применяется для идентификации микробов
3. Применяется для определения патогенности
4. Применяется для определения степени вирулентности

3. Химические вещества, являющиеся полноценными антигенами:

1. Белок
2. Минеральные соли
3. Полисахарид
4. Липид

4. Перечислите компоненты реакции преципитации:

1. Эритроциты
2. Молекулярный антиген
3. Корпускулярный антиген
4. Специфическая иммунная сыворотка

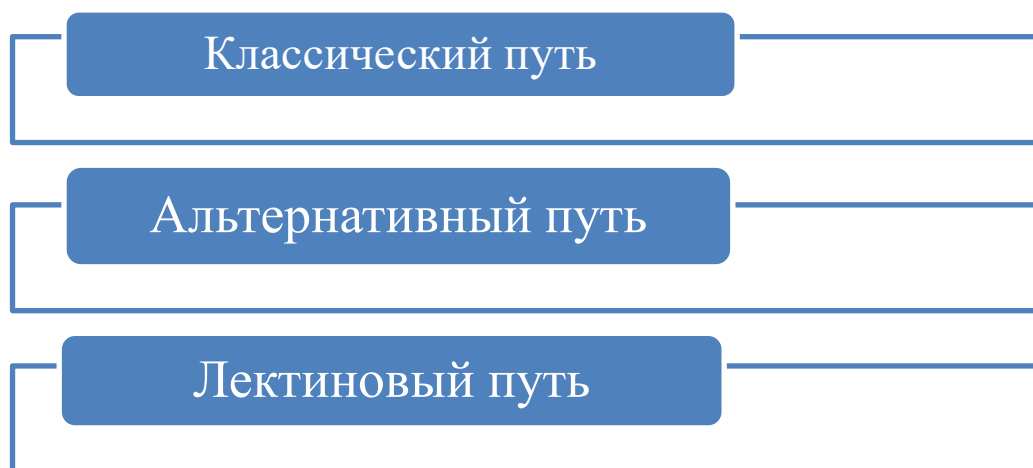
5. Антиген в реакции не прямой (пассивной) гемагглютинации

1. Содержит радиоактивные изотопы
2. Адсорбирован на эритроцитах
3. Содержит флюорохромом
4. Конъюгирован с ферментом

**Тема: «РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА С УЧАСТИЕМ КОМПЛЕМЕНТА:
РЕАКЦИЯ ИММУНОГО ГЕМОЛИЗА, РСК»**

В систему комплемента входит 9 основных белков (обозначаемых как C1, C2—C9), а также субкомпоненты — продукты расщепления этих белков (C1g, C3в, C3а и т.д.), ингибиторы.

Пути активации системы комплемента



Биологические эффекты продуктов активации комплемента:

- вне зависимости от пути активация комплемента завершается образованием мембраноатакующего комплекса (C5, 6, 7, 8, 9) и лизисом клеток (бактерий, эритроцитов и других клеток);
- образующиеся C3a- и C5a-компоненты являются анафилотоксинами, они связываются с рецепторами кровяных и тканевых базофилов, индуцируют их дегрануляцию — выброс гистамина, серотонина и других вазоактивных медиаторов (медиаторов воспалительного ответа). Кроме этого C3a и C5a является хемоаттрактантами для фагоцитов, он привлекает эти клетки в очаг воспаления;
- C3b, C4b являются опсонинами, повышают адгезию иммунных комплексов с мембранами макрофагов, нейтрофилов, эритроцитов и тем самым усиливают фагоцитоз.

Иммунный лизис - это разрушение клеток, несущих антигены, связанные антителами, в присутствии комплемента.

Из реакций лизиса чаще всего применяются реакция гемолиза и бактериолиза.

РЕАКЦИЯ ГЕМОЛИЗА (РГ)

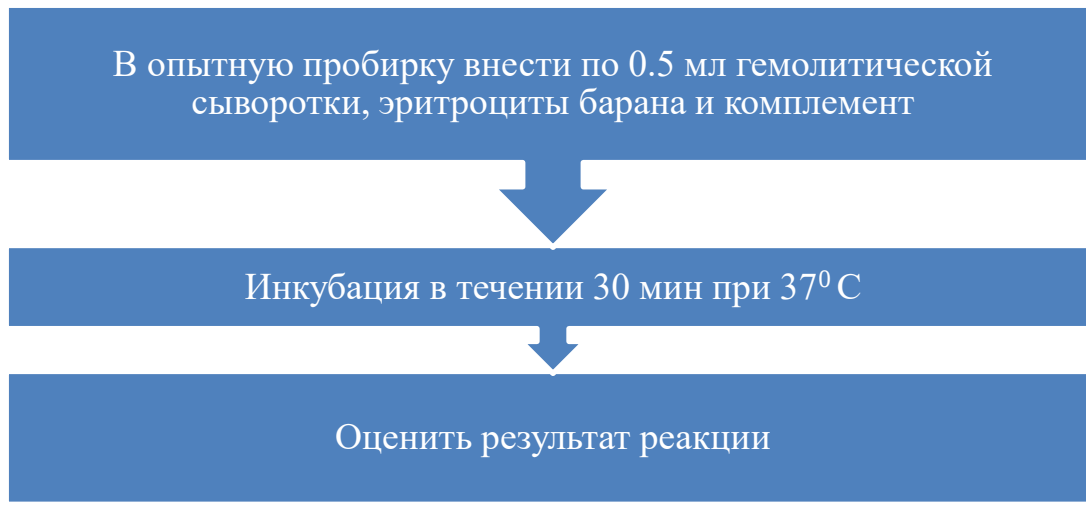
Реакция гемолиза (РГ)- лизис эритроцитов в присутствие специфических антител и комплемента

Цели постановки: Реакция гемолиза имеет прикладное значение. По феномену гемолиза учитывают результаты в реакции титрования комплемента и РСК.

Компоненты реакции иммунного лизиса:

- 1) антиген (корпускулярный)- 3% взвесь эритроцитов барана;
- 2) антитело (гемолитическая сыворотка) - антитела к эритроцитам барана, которые получают путем иммунизации кролика эритроцитами барана;
- 3) комплемент- коммерческий препарат, получают из сыворотки крови морских свинок путем лиофилизации

Последовательность действий:



Контроль 2- эритроциты барана + гемолитическая сыворотка+ физ р-р

Контроль 3- эритроциты собаки + комплемент+ физ р-р

Контроль 4- гемолитическая сыворотка+комплемента+ эритроциты собаки

Контроль 5- эритроциты барана+ физ р-р

Учет результата:

1. Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.
2. **Положительный результат** – изменение цвета раствора в пробирке из темно-красного в ярко красную прозрачную жидкость («лаковая кровь») за счет разрушения эритроцитов.
3. Результат считают **отрицательным**, если гемолиза в пробирке нет.

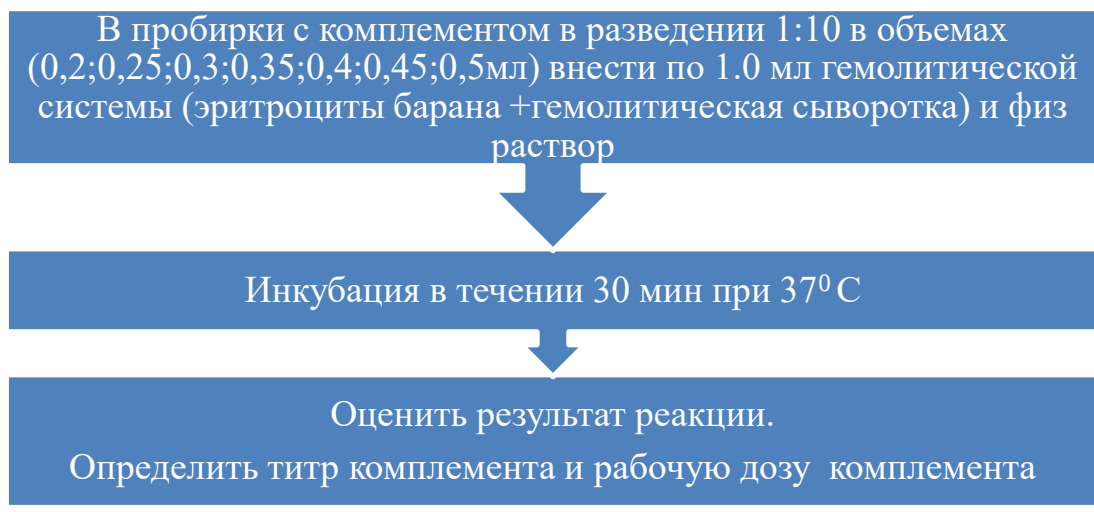
Таблица . Реакция иммунного гемолиза

Ингредиенты	Опыт 1	Контроль 2	Контроль 3	Контроль 4	Контроль 5
Гемолитическая сыворотка кролика, мл	0,5	0,5	--	0,5	--
Эритроциты барана, мл	0,5	0,5	0,5	--	0,5
Комплемент в разведении 1:10, мл	0,5	--	0,5	0,5	--
Эритроциты собаки, мл	--	--	--	0,5	--
Физиологический раствор, мл	--	0,5	0,5	--	1,0
Общий объем, мл	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>Инкубация при 37°C в течение 45-60 минут</i>					
Результат: (гемолиз/отсутствие гемолиза):					
<u>ВЫВОД:</u> Реакция иммунного гемолиза положительная/отрицательная, т.к. 					

Титрование комплемента сыворотки крови

Для определения титра и рабочей дозы производят титрование комплемента с помощью реакции иммунного гемолиза

Последовательность действий



Титр комплемента - это наибольшее разведение комплемента, которое вызывает полный лизис эритроцитов в присутствии гемолитической сыворотки.

Рабочую дозу комплемента рассчитывают исходя из его титра. Рабочая доза должна быть выше титра комплемента на 25%.

Таблица . Реакция титрования комплемента

Ингредиенты	пробирки								Контроль гем. сист 9
	1	2	3	4	5	6	7	Контроль комплем. 8	
Комплемент в разведении 1:10, мл	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	--
Изотонический раствор, мл	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5
Гемолитическая система, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
<i>Инкубация при 37°C в течение 30 минут</i>									
Результаты: (гемолиз/отсутствие гемолиза):									
<u>ВЫВОД:</u> титр комплемента _____ мл; рабочая доза комплемента _____ мл.									

РЕАКЦИЯ СВЫЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

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 (C), т.е. происходит связывание комплемента комплексом АГ+АТ. Если же комплекс антиген антитело не образуется, то комплемент остается свободным.

Образовавшийся в реакции иммунный комплекс является мелкодисперсным и не определяется визуально. Поэтому для выявления связывания комплемента в реакции применяется индикаторная гемолитическая система: эритроциты барана и гемолитическая сыворотка с антителами к ним.

Если антиген не соответствует антителу, то иммунный комплекс не образуется и комплемент остается свободным. Поэтому при добавлении в опытную пробирку гемолитической системы, состоящей из уже готового комплекса АГ+АТ

(эритроциты барана и антитела к ним), происходит активация комплемента с последующим образованием мембраноатакующего комплекса (МАК) и гемолизом эритроцитов барана, что визуально проявляется феноменом «лаковой крови».

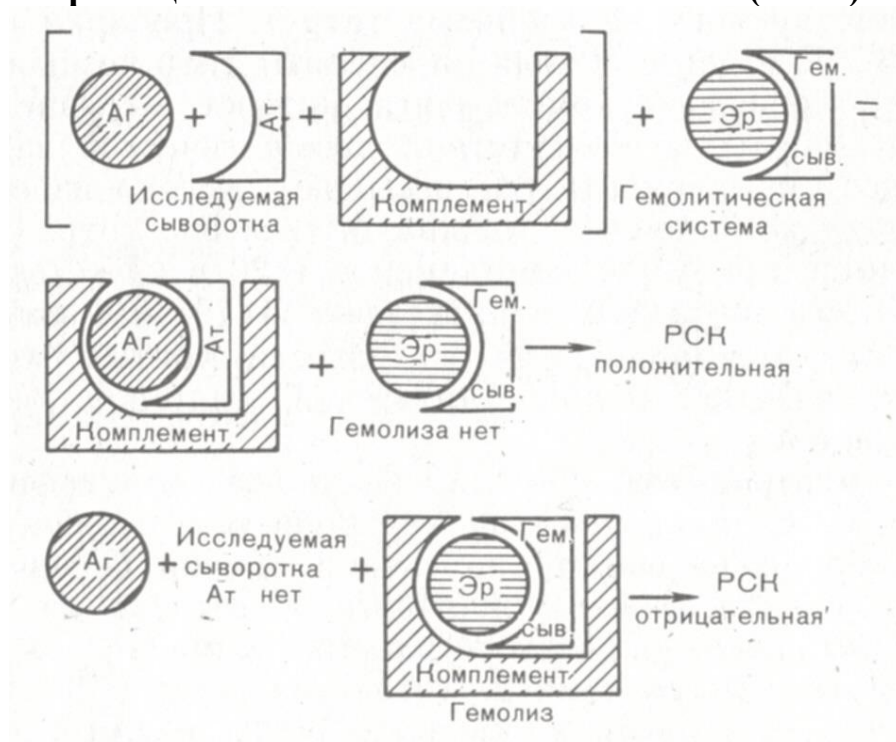
Цели постановки РСК:

1. для экспресс диагностики выявления микробных антигенов (обнаружения бактерий) в материале от больного (например при диагностике гонореи исследуется моча, секрет предстательной железы, гнойные выделения из шейки матки);
2. для выявления антител в сыворотке крови больного

Компоненты РСК с целью определения АТ:

1. исследуемая сыворотка
2. антиген
3. комплемент (сыворотка морской свинки)
4. гемолитическая система состоящая из :
 - а) гемолитической сыворотки (сыворотка кролика, иммунизированного эритроцитами барана)
 - б) эритроциты барана

Рисунок . Схема реакции связывания комплемента (РСК)



РСК проводят в две фазы:

1 фаза - **специфическая**: инкубация смеси антигена, испытуемой сыворотки и комплемента в термостате течении 30 минут.

2 фаза- **индикаторная**: в опытную пробирку и во все контрольные пробирки добавляют одинаковые количества гемолитической системы и учитывают результаты реакции после инкубации в термостате в течении 30 мин.

Последовательность действий



Контроль сыворотки- сыворотка+комплемент+ электролит+ гемолитическая система

Контроль антигена – антиген+комплемент+ электролит+ гемолитическая система

Учет результата:

1 Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.

2. **Положительный результат** –отсутствие гемолиза (жидкость в пробирке полностью бесцветная, а эритроциты оседают на дно).

3. Результат считают **отрицательным** при наличии гемолиза, который проявляется изменением цвета раствора в пробирке из темно-красного в ярко красную прозрачную жидкость («лаковая кровь») за счет разрушения эритроцитов.

Титр РСК- максимальное разведение исследуемой сыворотки, при котором наблюдается положительный результат в виде отсутствия гемолиза.

Таблица . Реакция связывания комплемента с исследуемой сывороткой

Ингредиенты		Опыт 1	Контроль сыворотки 2	Контроль антигена 3
Исследуемая сыворотка в разведении 1:25, мл		0,5	0,5	--
Антиген (диагностикум), мл		0,5	--	0,5
Комплемент в рабочей дозе, мл		0,5	0,5	0,5
Изотонический раствор, мл		--	0,5	0,5
<i>Инкубация при 37°C в течение 45-60 минут</i>				
Гемолитическая система, мл		1,0	1,0	1,0
<i>Инкубация при 37°C в течение 45-60 минут</i>				
Результаты: (гемолиз/отсутствие гемолиза):	Сыворотка больного			
	Сыворотка здорового			
<u>ВЫВОДЫ:</u> РСК положительная/отрицательная с сывороткой здорового, т.к. _____.				
РСК положительная/отрицательная с сывороткой больного, т.к. _____.				

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ:

ЗАДАЧА №1

Лаборанту требуется поставить реакцию связывания комплементы (РСК) с целью определения АТ к возбудителю. В лаборатории имеются следующие ингредиенты: 3% взвесь эритроцитов, эритроцитарные диагностикумы, бактериальный

диагностикум, растворимый диагностикум из бактериального гаптена, антиглобулиновая сыворотка, комплемент, гемолитическая система.

1. Какова цель постановки РСК
2. Подберите необходимые ингредиенты для постановки реакции
3. Как должен выглядеть положительный результат реакции

ЗАДАЧА №2

Объясните, какой феномен лежит в основе РСК. Какова роль комплемента в защите организма человека?

ЗАДАЧА № 3.

В лабораторию поступила кровь больного с подозрением на гонорею. Для подтверждения диагноза необходимо поставить РСК с целью определения АТ к возбудителю. Какие ингредиенты необходимо подготовить для её постановки? По какому признаку оценивается положительный или отрицательный результат реакции?

ТЕСТОВЫЙ КОНТРОЛЬ:

1. Комплемент:
 1. В норме находится в неактивном состоянии
 2. Компонент клеточной стенки бактерий
 3. Активируется комплексом «антиген-антитело»
 4. Обеспечивает противовирусную защиту
2. Компоненты реакции иммунного гемолиза:
 1. Эритроциты
 2. Комплемент
 3. Гемолитическая сыворотка
 4. Диагностикумы
3. Перечислите компоненты РСК с целью определения антител:
 1. Антигенный диагностикум
 2. Комплемент
 3. Гемолитическая система
 4. Исследуемая сыворотка
4. Пути активации комплемента:
 1. классический

2. интерфероновый
3. лектиновый
4. альтернативный

5. Результатом активации комплемента является:

1. лизис бактериальных клеток
2. агглютинация бактериальных клеток
3. опсонизация бактериальных клеток
4. образование хемоаттрактантов C3a и C5a

ЗАНЯТИЕ

ТЕМА: «РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА С «МЕЧЕННЫМИ» РЕАГЕНТАМИ: РИФ (прямой и непрямой варианты), ИФА»

В современной лабораторной диагностике все большее распространение получают серологические реакции с использованием меченых компонентов: антигенов или антител. В качестве меток могут использоваться различные химические вещества, позволяющие визуализировать результат реакции, а именно образование комплекса антиген- антитело. К таким веществам относятся флюорохромы- вещества, светящиеся в ультрафиолетовом свете; радиоизотопы, ферменты. Сами метки не влияют на способность компонентов реакции образовывать иммунные комплексы.

В зависимости от используемой метки выделяют следующие реакции:

1. Иммуноферментный анализ (ИФА)- в качестве метки используется фермент
2. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)- в качестве метки используется флюорохром
3. Радиоиммунный анализ (РИА)- в качестве метки используется радиоизотоп (радиоактивное вещество).

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

Иммуноферментный анализ (ИФА)- предназначен для выявления антигенов или антител с помощью соответствующих им антител/антигенов, конъюгированных с меткой - ферментом (пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой и пр). Основой проведения любого варианта ИФА служит определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями.

После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат и хромоген. Субстрат расщепляется ферментом, а его продукты деградации вызывают химическую модификацию хромогена. При этом хромоген меняет свой цвет – интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Различают несколько десятков модификаций ИФА:

1. ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) - метод определения с помощью иммуносорбентов, связанных с ферментами;
2. EIA (enzyme immunoassay) - метод на основе фермент-иммуноопределения;
3. EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) - способ, основанный на связи с ферментами.

ELISA и EIA - это методы гетерогенного или твердофазного анализа (ТИФА), EMIT является гомогенным ИФА. Для определения антигенов и антител применяются твердофазный (гетерогенный) вариант иммуноферментного анализа. Использование твердой фазы позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции.

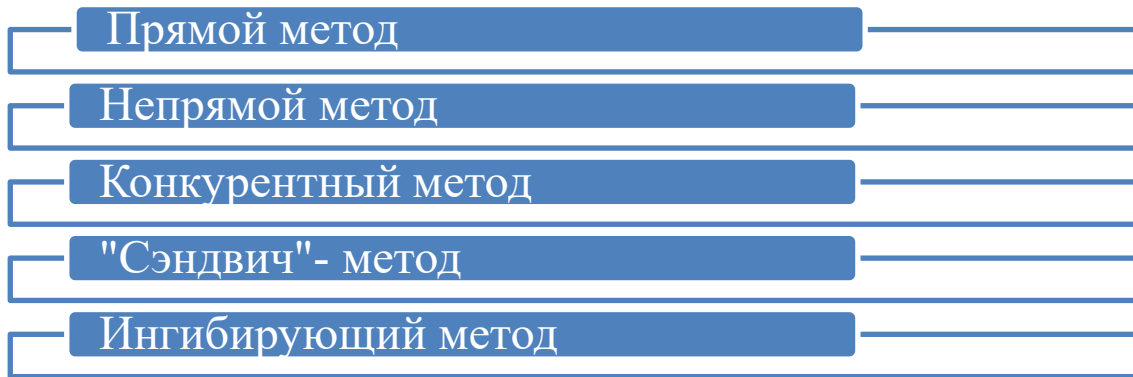
Цели постановки ИФА:

1. Обнаружение специфических антител в биологических материалах (сыворотка крови, слюна и пр)
2. Обнаружение искоемых антигенов в биоматериале

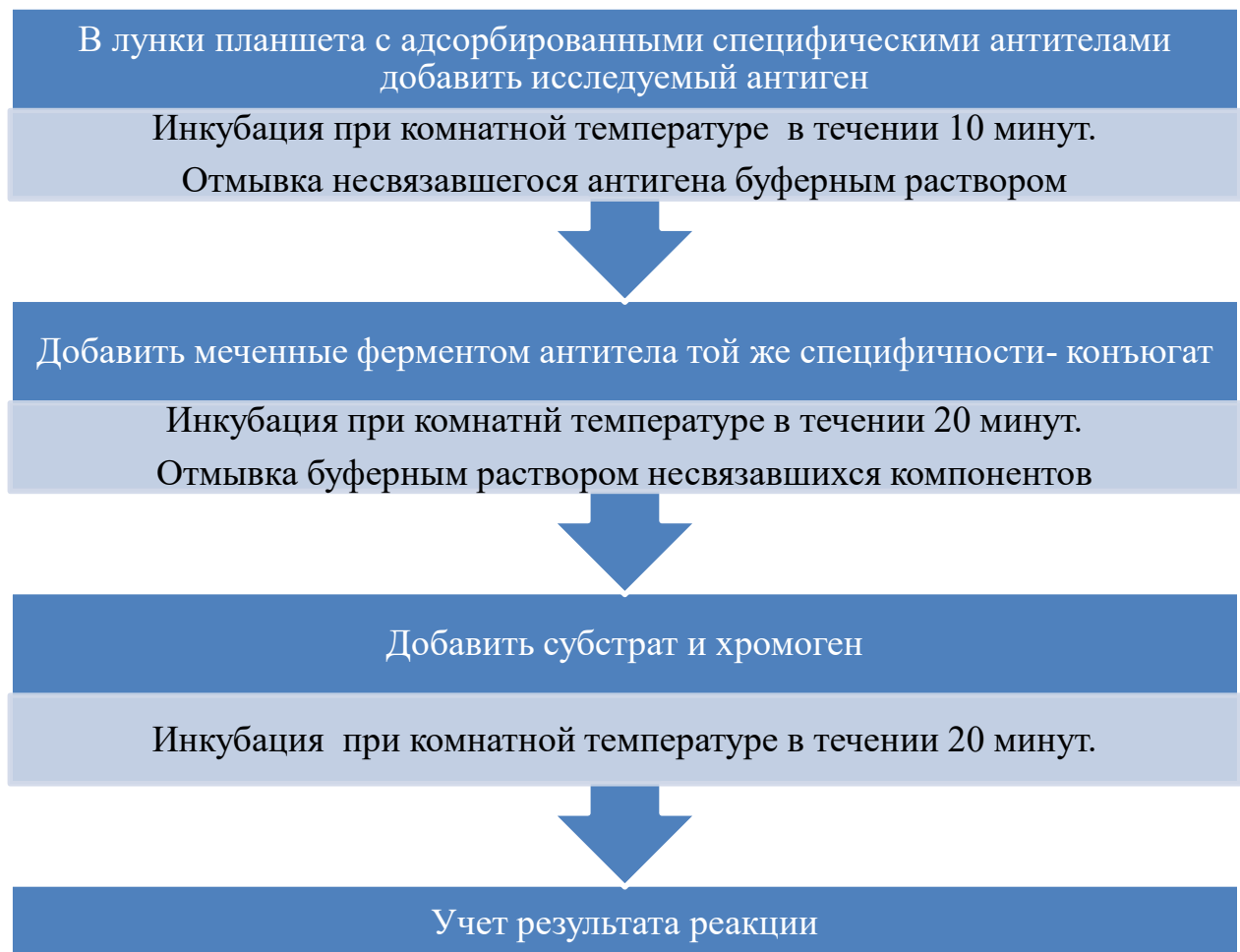
Компоненты ИФА с целью определения антигена:

1. Антитело
2. Антиген
3. Конъюгат – антитело, меченное ферментом
4. Субстрат – вещество, на которое специфически направлено действие фермента. В результате взаимодействия фермента с субстратом возникает продукт реакции.
5. Хромоген – это вещество, обычно бесцветное (лейкоформа), но способное давать окрашенное соединение (хромоформу) в результате взаимодействия с продуктом, возникающим при ферментативной реакции.

Виды твердофазного ИФА



Последовательность действий при прямом методе ИФА («сэндвич» - метод)



Положительные контрольный образец

Отрицательный контрольный образец

Контроль конъюгата

Контроль субстрат-хромогенного реактива

Учет результата:

1. Возможен ТОЛЬКО при безупречных контролях сыворотки и антигена.
2. **Положительный результат** – появление окраски или изменение оптической плотности в лунке (субстрат расщепляется ферментом, продукты реакции окисляют хромоген и появляется окраска или изменяется оптическая плотность среды в лунке))
3. Результат считают **отрицательным** если цвет раствора в лунках планшета не изменяется.

Данный метод называется «сэндвич»- метод, так как при постановке реакции антиген оказывается между иммобилизованными и мечеными антителами.

Рисунок . Схема проведения иммуноферментного анализа (ИФА, «метод сэндвича»)



Таблица . Схема постановки ИФА

Ингредиенты	Опыт	«Положительный контроль»						«Отриц. контроль»
	A ₁ A ₂	B ₁ B ₂	C ₁ C ₂	D ₁ D ₂	E ₁ E ₂	F ₁ F ₂	G ₁ G ₂	H ₁ H ₂
1. Буфер А (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Инкубация при комнатной температуре 10 мин.</i>								
2. Сыворотка больного (мл)	0,1	--	--	--	--	--	--	--
3. Стандартный антиген 100 мкг/мл (мл)	--	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1 вылить	--
4. Отрицательный контроль (мл)	--	--	--	--	--	--	--	0,1
<i>Инкубация при 37°С в течение 20 мин.</i>								
5. Конъюгат (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Инкубация при 37°С в течение 20 мин.</i>								
6. Субстрат (мл)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Инкубация при комнатной температуре 20 мин.</i>								
7. 50%Н ₂ SO ₄ (мл)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Результаты:								
<u>ВЫВОДЫ:</u> ИФА _____ (положительная/отрицательная). Концентрация HBs антигена _____ мкг/мл								

РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ)

РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ)- это реакция обнаружения специфических антигенов в инфекционных материалах, тканях животных и культурах клеток при помощи флюоресцирующих антител (сывороток). Обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

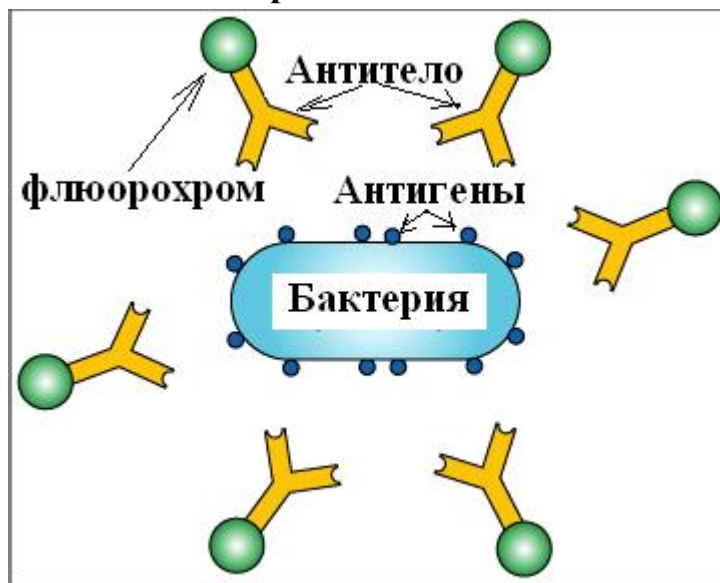
Цели постановки:

Применяется для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний (идентификация возбудителя в исследуемом материале), а также для определения АТ и поверхностных рецепторов и маркеров лейкоцитов (иммунофенотипирование) и др. клеток.

Выделяют два метода РИФ по Кунсу: прямой и непрямой.

При прямом методе РИФ специфические флюоресцирующие антитела образуют комплексы с микробными антигенами, которые светятся ярко-зеленым светом по периферии при люминесцентной микроскопии.

Схема прямого метода РИФ



Компоненты прямой РИФ:

1) исследуемый материал (испражнение, отделяемое носоглотки и др.);

- 2) меченая флюорохромом специфическая иммунная сыворотка, содержащая АТ к искомому антигену;
- 3) изотонический раствор хлорида натрия.

Последовательность действий:

Обработка препарата (мазка) из исследуемого материала
специфической люминисцирующей сывороткой



Инкубация в течении 15-30 минут

Отмывка и высушивание препарата

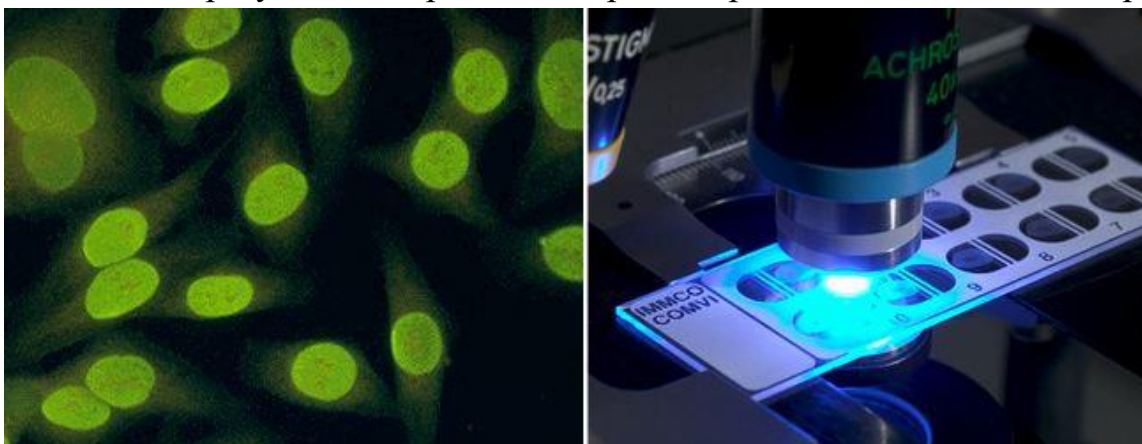


Оценка результата при помощи люминисцентной
микроскопии

Учет результатов реакции:

Положительный результат- обнаружение флюоресценции в виде ярко-зеленого свечения при люминисцентной микроскопии в том участке, где локализуются комплексы АГ-АТ.

Отрицательный результат- черное поле зрения при люминисцентной микроскопии.



Непрямой метод РИФ состоит из двух этапов:

- на первом этапе препарат из исследуемого материала обрабатывают нелюминесцирующей иммунной сывороткой к искомому антигену
- на втором этапе препарат обрабатывают люминесцирующей антиглобулиновой сывороткой, содержащей флюоресцирующие антиглобулиновые антитела.

Схема непрямого метода РИФ



Компоненты непрямого РИФ:

- 1) исследуемый материал;
- 2) специфическая иммунная сыворотка без флюорохрома;
- 3) антиглобулиновая сыворотка (АТ против иммуноглобулина), меченная флюорохромом;
- 4) изотонический раствор хлорида натрия.

Последовательность действий:

Обработка препарата (мазка) из исследуемого материала специфической иммунной сывороткой без флюорохрома с последующим образованием невидимого комплекса АГ-АТ



Инкубация в течении 15-30 минут.
Отмывка буфером несвязавшихся антител.



Обработка препарата люминесцирующей антиглобулиновой сывороткой.



Инкубация в течении 15-30 минут. Отмывка буфером и высушивание

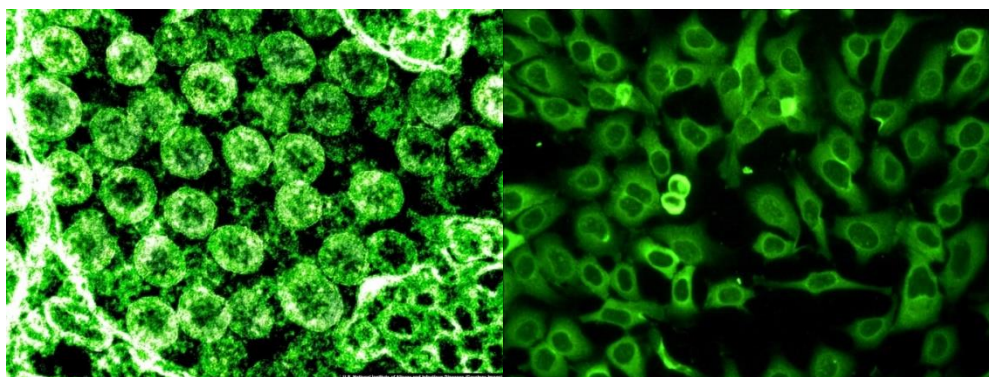


Оценка результата при помощи люминисцентной микроскопии

Учет результатов реакции:

Положительный результат- обнаружение флюоресценции в виде ярко-зеленого свечения при люминесцентной микроскопии в том участке, где локализуются комплексы АГ-АТ.

Отрицательный результат- черное поле зрения при люминесцентной микроскопии.



Примеры:

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ:

ЗАДАЧА №1

При постановки ИФА используют конъюгат. Объясните значение этого компонента. Предложите состав этого компонента для реакции ИФА, которая ставится с целью определить антитела в сыворотке больного.

ЗАДАЧА №2.

Лаборанту требуется поставить реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РИФ). В лаборатории имеются следующие ингредиенты: исследуемый материал; специфическая иммунная сыворотка без флюорохрома; конъюгат антиглобулиновой сыворотки с ферментом, антиглобулиновая сыворотка, меченная флюорохромом, флюорохром, комплемент.

1. Какова цель постановки непрямой реакции иммунофлюоресценции
2. Подберите необходимые ингредиенты для постановки реакции

ЗАДАЧА №3

В диагностических целях при ряде инфекций проводится постановка ИФА

1. Каковы цели постановки этой реакции
2. Объясните механизм этой реакции и перечислите необходимые компоненты для ее постановки
3. Каким образом производится учет результатов реакции

ТЕСТОВЫЙ КОНТРОЛЬ:

1. РИФ используется для:

1. Микробиологической экспресс-диагностики
2. Определения специфических антител
3. Идентификации микробов
4. Титрования комплемента

2. Иммуноферментный анализ (ИФА) применяется для:

1. Определение неизвестных антител по известному антигену
2. Определение количества эритроцитов
3. Определение неизвестного антигена по известным антителам

4. Определение титра комплемента

3. Антитела в РИФ метят

1. Радиоактивным изотопом
2. Супероксидным анионом
3. Флюорохромом
4. Ферментом

4. Достоинства РИФ:

1. Высокая чувствительность
2. Возможность использования для экспресс-диагностики
3. Быстрота получения результатов
4. Специфичность

5. В каких реакциях используют меченные АТ:

1. ИФА
2. РИФ
3. РСК
4. РИА

БАКТЕРИЙНЫЕ И ВИРУСНЫЕ
ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ,
ЛЕЧЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ
ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИИ
(учебно-методическая разработка для студентов)

Москва 1981

Составители: **З. Н. КОЧЕМАСОВА, С. А. ЕФРЕМОВА, Ю. С. НАБОКОВ**

ПРЕДИСЛОВИЕ

В курсе медицинской микробиологии значительное место занимает изучение бактериальных и вирусных препаратов для профилактики, лечения и диагностики инфекционных заболеваний. В общей части курса микробиологии студент знакомится с характеристикой каждой группы препаратов (способы получения, применения, методы контроля, определения активности, титрования, хранение и т. п.).

В целях лучшего усвоения этих вопросов в программе отведено практическое занятие (3 часа на лечебном и санитарно-гигиеническом факультетах), целью которого является изучение основных медицинских биологических препаратов, используемых для создания активного и пассивного иммунитета. При выполнении практической части занятия студенты проводят контроль готовых вакцин и анатоксинов, описывая при этом характер препарата, проверяют морфологию, определяют стерильность, безвредность и титр. Ориентировочной основой деятельности являются наставления к выпускаемым препаратам, наборы вакцин, сывороток, диагностикумов, аллергенов, составляемые сотрудниками кафедры, и настоящая учебно-методическая разработка.

Эти знания и умения, приобретенные студентами на II курсе, являются основой для конкретного применения при изучении частного курса микробиологии. В разделе «Специфическая профилактика и лечение» студенты должны знать характеристику каждого препарата для профилактики, лечения или диагностики изучаемого заболевания.

В «Учебно-методическую разработку» включены предметный указатель и список литературы.

Методическая разработка по данной теме позволяет правильно интегрировать и координировать теоретические знания, полученные на кафедре микробиологии с практическим применением их на кафедре эпидемиологии, инфекционных болезней, детских инфекционных болезней,

хирургии и других.

ВВЕДЕНИЕ

К бактериальным и вирусным препаратам относятся культуры бактерий, вирусы, риккетсии (суспензии живых или убитых микроорганизмов); продукты бактериального происхождения (нативные и обезвреженные токсины, протективные антигены, аллергены); иммунные сыворотки, применяемые для профилактики, лечения и диагностики инфекционных болезней, бактериофаги и др.

В настоящее время выпускается более ста бактериальных и вирусных препаратов, применяющихся для специфической профилактики или специфического лечения инфекционных заболеваний человека, и около 100 наименований имеют препараты, используемые лабораториями с диагностическими целями.

В соответствии с применением и принципами получения бактериальные препараты можно разделить на следующие группы: вакцины, сыворотки, диагностикумы, аллергены, бактериофаги и другие препараты.

Для профилактики и реже для лечения инфекционных болезней широко применяются вакцины (живые, убитые, химические) и анатоксины, которые создают в организме искусственный приобретенный активный иммунитет против соответствующих инфекций.

Пассивный иммунитет, необходимый чаще в лечебных целях, создается введением иммунных сывороток (антитоксических, антимикробных, противовирусных) или иммуноглобулинов — выделенных из сывороток активных фракций — специфических антител.

Большую группу препаратов составляют бактериальные препараты, предназначенные для диагностики: диагностические сыворотки, служащие для идентификации выделенных микроорганизмов; диагностикумы — убитые микроорганизмы или их антигены, используемые при определении антител в сыворотке больного; диагностические аллергены — для обнаружения гиперчувствительности замедленного типа; токсины — необходимые при определении антитоксического иммунитета; бактериофага, позволяющие определять не только вид бактерий, но и их тип. Бактериофаги используются также для профилактики и лечения некоторых заболеваний.

Бактериальные и вирусные препараты готовят, контролируют и применяют в соответствии с инструкциями, утвержденными Министерством здравоохранения СССР. В специальных наставлениях, вкладываемых в каждую коробку с препаратами, имеются основные сведения о препарате, показаниях и противопоказаниях к его применению, о дозах, кратности, способе введения. В наставлении также описаны возможные общие и местные реакции организма на введение соответствующего препарата. На этикетке ампулы указывается название препарата и института, выпустившего его, номер серии препарата и государственного контроля, срок годности, общее количество, доза или титр.

I. ВАКЦИНЫ

Вакцины — препараты, служащие для создания активного

искусственного приобретенного иммунитета. В настоящее время известны следующие вакцинные препараты:

- 1) живые вакцины, представляющие собой ослабленные в своей вирулентности различные микроорганизмы;
- 2) убитые, содержащие инаktivированные возбудители заболеваний;
- 3) химические, состоящие из растворимых антигенов бактерий, извлеченных химическими методами;
- 4) анатоксины, обезвреженные формалином экзотоксины возбудителей токсинемических инфекций.

Препараты, предназначенные для проведения иммунизации против одной какой-нибудь инфекции, получили название моновакцины; против двух инфекционных заболеваний — дивакцины; против трех — тривакцины; против нескольких инфекций — поливакцины. Ассоциированными вакцинами называются препараты, содержащие смесь из антигенов различных бактерий и анатоксинов. Применение ассоциированных вакцин, таких как АКДС (см. с. 19) или ТАВте (см. с. 17) дает возможность создавать иммунитет в отношении нескольких инфекций и сокращать число прививок.

Поливалентными вакцинами принято называть препараты, которые включают несколько разновидностей или серологических типов возбудителей одной инфекции (например, противогриппозные, лептоспирозные и др.).

Живые вакцины

Живые вакцины представляют собой мутанты, то есть вакцинные штаммы микроорганизмов с остаточной вирулентностью, не способные вызывать специфические заболевания, но сохранившие способность размножаться и находиться в организме, приводя к развитию бессимптомной вакцинной инфекции.

Вакцинные штаммы для приготовления живых вакцин были получены различными путями: методом отбора (селекции) мутантов с ослабленной вирулентностью, методом экспериментального направленного изменения вирулентных свойств возбудителя, длительным пассированием в организме животных, методом генетического скрещивания (получения рекомбинантов).

Селекция широко использовалась исследователями при отборе среди лабораторных штаммов спонтанно возникших Мутантов с ослабленной вирулентностью. Так были получены чумная, бруцеллезная, туляреминая вакцины, сибиреязвенная, полиомиелитная и другие.

Метод направленного изменения вирулентности микроорганизмов, связанный с длительным культивированием при неблагоприятных условиях, был разработан Л. Пастером. Пастер, изучая возбудителя куриной холеры, однажды оставил культуры в термостате на длительный срок без пересева. Зараженные этими культурами куры не болели и что еще более важно — при последующем введении свежих вирулентных возбудителей холеры, не реагировали заболеванием.

Это наблюдение легло в основу обобщающего вывода, что

аттенуированные (т. е. ослабленные в своей вирулентности) микроорганизмы обладают способностью вызывать невосприимчивость к вирулентным возбудителям заболеваний. Таким образом, Л. Пастер разработал научные основы получения живых вакцин, установив возможность искусственного ослабления вирулентности патогенных микроорганизмов. Основываясь на своих наблюдениях по получению аттенуированной культуры куриной холеры, Пастер уже целенаправленно создает вакцину против сибирской язвы. Сибиреязвенная вакцина была получена при длительном выращивании сибиреязвенных бацилл при повышенной температуре 42°C (см. с. 8), что и привело к ослаблению вирулентности (действие физического фактора).

Двум французским микробиологам А. Кальметту и Г. Герену удалось получить вакцинный штамм (БЦЖ) пассированием микобактерий туберкулеза бычьего типа на среде с желчью. Желчь и явилась тем фактором, который вызвал снижение вирулентности (воздействие химического вещества).

Л. Пастером была получена вакцина против бешенства (см. с. 10) как результат длительного пассирования вируса уличного бешенства в организме одного и того же вида животных — на кроликах. Многократное пассирование через мозг кролика привело к тому, что вирус максимально адаптировался к мозгу кролика, резко возросла вирулентность вируса для кролика и снизилась для человека и других животных.

В последние годы был применен еще один метод для получения вакцинных штаммов, основанный на использовании генетических скрещиваний, результатом которых являются рекомбинанты со сниженной вирулентностью. Так был получен вакцинный штамм вируса гриппа А при взаимодействии авирулентного исходного штамма (содержащего гемагглютинин H_2 и нейраминидазу N_2) и вирулентного штамма Гонконг (H_3N_2). Рекомбинант содержал гемагглютинин H_3 вирулентного вируса Гонконг и сохранил авирулентность исходного вакцинного штамма.

Живые вакцины имеют целый ряд преимуществ в сравнении с другими видами вакцин, и связано это свойство с тем, что пребывание и размножение в организме человека и животных аттенуированных вакцинных штаммов приводит к развитию вакцинной инфекции (специфического инфекционного заболевания без выраженных клинических симптомов). Вакцинная инфекция, проявляясь ли в виде местного воспалительного процесса или сопровождаемая общей реакцией организма, всегда влечет за собой перестройку иммунобиологических свойств организма и выражается в выработке специфического иммунитета.

Живые вакцины, как правило, вводятся однократно и более простыми способами (перорально, интраназально, накожно, реже подкожно). Способность вакцинного штамма размножаться и присутствие в организме постоянного антигенного раздражителя обеспечивает напряженный, прочный и довольно длительный иммунитет.

К вакцинным штаммам предъявляются следующие основные требования:

- а) наличие остаточной вирулентности;
- б) достаточная иммуногенность;
- в) отсутствие возможности реверсии к исходным свойствам.

Таким образом, вакцинные штаммы должны обладать стойкими, наследственно закрепленными аттенуированными свойствами.

Для сохранения жизнеспособности и стабильности свойств большинство живых вакцин выпускают в сухом виде, что достигается методом лиофилизации — высушивание из замороженного состояния под глубоким вакуумом. Сухие вакцины могут сохраняться в течение года и более при температуре холодильника (не выше 4° — 8°C).

В настоящее время в практике применяются следующие живые вакцины.

1. Сибирязвенная вакцина — первая живая вакцина, которая была получена в 1881 г. Л. Пастером.

Пастер выдерживал культуру возбудителя сибирской язвы в термостате при температуре 42° в течение 12 и 24 дней, получив таким образом два вакцинных штамма: 12-дневный (более вирулентный) и 24-дневный (более ослабленный). Инкубация при такой неблагоприятной температуре привела к частичному снижению вирулентности и утрате способности образовывать споры.

В России по методу, предложенному Пастером, самостоятельно создал вакцину против сибирской язвы Л. С. Ценковский, которая и использовалась для вакцинации животных с 1883 г. по 1942 г.

В 1940 году Н. Н. Гинзбург и А. Л. Тамариной при культивировании на особых питательных средах отобран бескапсульный вариант сибирязвенных бацилл, получивший название СТИ-1 (Санитарно-технический институт). Готовый препарат представляет собой споровую культуру вакцинного бескапсульного штамма и предназначен для специфической профилактики сибирской язвы у людей и животных. В зависимости от показаний, вакцина вводится накожно или подкожно.

2. Чумная вакцина (EV) получена Г. Жираром и Ж. Робином в 1931 г. длительным (5-летним) культивированием чумных бактерий на мясо-пептонном агаре при температуре 16 — 20°C .

Вакцина представляет собой взвесь живых бактерий вакцинного штамма в сахарозо-желатиновой среде, высушенной методом лиофилизации. Профилактические прививки чумной вакциной проводятся по эпидемическим показаниям накожным или подкожным способом.

3. Туляремиальная накожная вакцина получена Н. А. Тайским и Б. Я. Эльбертом в 1942—1946 гг. методом селекции из лабораторных штаммов с ослабленной вирулентностью.

Вакцина вводится накожно (скарификационным методом) или внутрикожно (струевым методом при помощи безыгольного инъектора) при профилактике туляремии в эндемичных по этой инфекции районах.

4. Бруцеллезная накожная вакцина получена П. А. Вершиловой методом селекции и представляет собой вакцинный штамм № 19 — ВА —

слабовирулентный штамм Br. abortus, который обеспечивает иммунитет ко всем трем видам бруцелл.

Вакцинацию населения проводят в районах неблагополучных по бруцеллезной инфекции (наличие бруцеллеза у крупного и мелкого рогатого скота или при выделении бруцелл от других домашних животных). Вакцину вводят только накожно.

5. Вакцина БЦЖ (франц.— BCG—Bacille Calmette Guerin) была получена в 1919 г. А. Кальметтом и М. Гереном длительным пассированием туберкулезных микобактерий бычьего типа на картофельно-глицериновой среде с добавлением желчи. Ими было сделано 230 пересевов в течение 13 лет и получен штамм со сниженной вирулентностью.

В настоящее время вакцина БЦЖ применяется для вакцинации новорожденных на 5—7-й день жизни и последующих ревакцинаций (в 7, 12 и 17 лет) при отрицательных туберкулиновых пробах. Вакцина вводится внутрикожно на наружную поверхность плеча левой руки.

Одним из показателей приобретенного иммунитета в результате вакцинации является переход отрицательной туберкулиновой пробы в положительную с учетом интенсивности реакции и продолжительности во времени с момента введения БЦЖ.

6. Оспенная дермальная вакцина. Вакцинацию против оспы впервые применил Дженнер Э. (1796), вводя здоровым людям инфекционный материал от больных оспой коров. Дженнер исходил из народного наблюдения, что доярки, заражающиеся от коров оспой, легко переболевают коровьей оспой и в дальнейшем не заболевают натуральной оспой.

В СССР для создания активного иммунитета против оспы применяют дермальную оспенную вакцину. Для получения вакцинного материала используют телят, на скарифицированную кожу которых наносят вирус осповакцины. На 5-й день в период максимального накопления вируса собирают соскабливанием оспенный детрит. Детрит гомогенизируют и обрабатывают фреоном 113 для удаления балластных веществ и сопутствующей микрофлоры. Вакцина выпускается со стабилизатором—пептоном, в высушенном виде; для растворения вакцины применяется 50% стерильный раствор глицерина, ампула которого прилагается к каждой вакцине. Вакцина наносится на скарифицированную кожу наружной поверхности плеча.

В настоящее время (с 1 января 1980 г.) обязательное оспопрививание отменено в связи с ликвидацией этого заболевания во всем мире.

7. Антирабическая вакцина. Вакцину против бешенства впервые получил в 1885 г. Л. Пастер пассированием вируса уличного бешенства на кроликах. Пастер провел 133 последовательных пассажа, вводя вирус бешенства интрацеребрально. Пассируя вирус от кролика к кролику, он добился снижения инкубационного периода бешенства у кроликов с 21 дня до 7 дней. Вирус, максимально адаптированный к центральной нервной системе кролика, получил название фиксированного вируса (virus fixe) и отличается от вируса уличного бешенства способностью вызывать

заболевание у кроликов после короткого инкубационного периода (7—4 дня), большей активностью размножения в мозге (не вызывая образование телец Бабеша-Негри), не выделяется со слюной, и почти утратил свои патогенные свойства при подкожном введении кролику. В антигенном отношении *virus fixe* сохранил единство с уличным (диким) вирусом бешенства.

Инактивацию вируса *fixe* Пастер проводил дополнительным высушиванием кусочков мозга зараженных кроликов над парами едкого калия в разные сроки (от 1 дня до 16).

В настоящее время для лечебно-профилактических прививок против бешенства применяются следующие вакцины: антирабическая вакцина типа Ферми и культуральная антирабическая вакцина.

Вакцина Ферми представляет собой гомогенизированную суспензию мозга овец, зараженных вирусом *fixe*, на изотоническом растворе хлорида натрия с добавлением фенола. Вакцина содержит небольшое количество живого фиксированного вируса.

Инактивированная культуральная антирабическая вакцина (Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН

СССР) представляет собой фиксированный вирус бешенства штамм «Внуково-32», выращенный на культуре ткани почек сирийского хомяка и обезвреженный фенолом или ультрафиолетом.

Курс антирабических прививок назначают при укусах, царапинах, ослонении бешеным или подозрительным на заболевание животным, а также при укусах летучих мышей, диких животных, бродячих собак и кошек (наблюдение за которыми невозможно). Вакцину вводят строго подкожно в область живота.

8. Полиомиелитная пероральная живая вакцина типов I, II, III (ЖВС) получена в 1958 г. А. Сейбиным из мелкобляшкообразующих вирусов полиомиелита. Атенуированные вирусы дают мелкие бляшки под агаровым покрытием и обладают способностью размножаться при сравнительно низкой температуре (23°C).

Они потеряли способность размножаться в клетках нервной системы и сохранили энтеротропные свойства. Вакцинные штаммы вируса полиомиелита всех трех типов (I, II, III) выращиваются на первичных культурах почечных клеток африканских зеленых мартышек и выпускаются в форме конфет-драже (моновакцины и тривакцины, содержащие смеси вирусов трех типов) или в жидком виде.

Вакцина применяется для профилактической иммунизации против полиомиелита, начиная с 2-месячного возраста в соответствии с календарем прививок, последовательно с интервалом 4—6 недель (I, III, II типа). Вакцина принимается внутрь и запивается молоком или водой.

Вакцинный штамм вызывает вакцинальную инфекцию, так как вирус размножается в кишечнике и может передаваться другим людям, как и при естественном заболевании. Это очень ценное свойство вакцины, так как приводит к иммунизации всех тех лиц, которые еще не приобрели иммунитета к полиомиелиту.

9. Корева вакцина представляет собой аттенуированный штамм вируса кори — Л—16 (выделенный в Ленинградском институте им. Пастера из крови ребенка, больного корью, и прошедший 23 пассажа на первичной культуре клеток почек морской свинки).

Вакцину приготавливают из культуральной жидкости при выращивании вакцинного штамма Л-16 на культуре клеток почек новорожденных морских свинок (или фибробластах

эмбрионов японских перепелок), освобождают от тканевых элементов и лиофилизируют.

Вакцинации подлежат дети в возрасте от 10 месяцев до 8 лет, препарат вводится подкожно под лопатку.

10. Гриппозная вакцина для интраназального применения представляет собой аллантоисную жидкость из куриных эмбрионов, зараженных вакцинными штаммами вируса, соответственно циркулирующим эпидемическим штаммом. Вакцина выпускается в виде моновакцины типов А₂ и В, вводится интраназально в осенне-зимний период, за 2—3 месяца до начала эпидемического подъема гриппа.

Вакцина вызывает бессимптомную вакцинальную инфекцию с развитием общего и особенно местного иммунитета, обусловленного появлением местных секреторных антител (IgA), которые препятствуют проникновению вируса в клетки.

Гриппозную вакцину для перорального введения получают при культивировании аттенуированных вакцинных штаммов вирусов гриппа на культуре клеток почек куриных эмбрионов в виде моновакцин типов А₂ и В. Пероральная вакцина вызывает вакцинальную инфекцию с развитием гуморального иммунитета.

11. Вакцина против желтой лихорадки (ВЖЛ). Препарат представляет собой живой аттенуированный вирус желтой лихорадки (штамм 17-Д), выращиваемый в курином эмбрионе или в культуре ткани из куриного эмбриона. Вакциной прививают лиц, постоянно проживающих в районах, эндемичных по желтой лихорадке, и людей, выезжающих в эти районы. Привитые получают сертификат установленного ВОЗ образца. Препарат вводится подкожно в области верхней трети плеча.

12. Живая комбинированная сыпнотифозная вакцина Е (ЖКСВ-Е) представляет собой смесь аттенуированного штамма риккетсий Провачека (штамм «Мадрид Е»), выращенного в желточных мешках куриных эмбрионов, с растворимым антигеном, извлеченным из убитой вирулентной культуры риккетсий Провачека (штамм «Брейнль»), Вакцина вводится подкожно, по эпидемическим показаниям.

13. Вакцина против Ку-лихорадки (М-44) — мутант со сниженной вирулентностью, полученный при последовательном пассировании риккетсий Бернета в желточном мешке курших эмбрионов на 44-м пассаже.

Вакцина вводится накожно, по эпидемическим показаниям, в районах, где зарегистрированы случаи заболевания Ку-лихорадкой.

Убитые вакцины

Убитые — корпускулярные вакцины содержат взвеси бактерий, вирусов или риккетсий, инаktivированных повышенной температурой или различными химическими веществами. Убитые вакцины применяются для профилактики инфекционных заболеваний, а также с лечебной целью (для стимуляции защитных свойств организма при хронических процессах).

Для получения убитых вакцин используют высокопатогенные штаммы, полноценные в отношении вирулентности и антигенного строения, отобранные после тщательного изучения. Бактериальные культуры при приготовлении вакцин выращивают в специальных реакторах с жидкой питательной средой, позволяющих получать одновременно сотни литров бактериальной взвеси.

Инаktivация бактериальной массы проводится так, чтобы надежно убить бактерии с минимальным повреждением антигенных свойств. Так, гретые вакцины получают при прогревании бактериальной взвеси при 56°C, не более. При воздействии химических веществ соответственно готовят формалиновые, феноловые, спиртовые, ацетоновые вакцины.

Преимуществом убитых вакцин является относительная простота их получения, не требующая длительного выделения и изучения штаммов, большая устойчивость при хранении и более длительный срок пригодности. К недостаткам вакцин из убитых бактерий следует отнести их меньшую иммуногенность и необходимость двух или трехкратных прививок. А такие вакцины как формализированные еще и достаточно реактогенны, вызывая местную реакцию (боль, чувство жжения на месте введения) и общие явления с повышением температуры тела.

Иммунитет после введения убитых вакцин менее продолжителен в сравнении с иммунитетом, развивающимся после вакцинации живыми вакцинами.

В настоящее время применяются следующие убитые вакцины:

1. Брюшнотифозная спиртовая вакцина, обогащенная Vi — антигеном — комплексный препарат, состоящий из брюшнотифозных бактерий (инаktivированных спиртом) и Vi — антигена *S. typhi*, который выполняет и роль растворителя. Vi — антиген — вещество полисахаридной природы, которое извлекается из брюшнотифозных бактерий (полноценного в антигенном отношении штамма Ty₂ 4446).

Применяется по эпидемическим показаниям, преимущественно для детей (от 7 до 15 лет), вводится строго подкожно.

2. Брюшнотифозная гретая вакцина содержит взвесь тифозных бактерий, выращенных в реакторе в жидкой питательной среде (в условиях аэрации) и убитых в течение часа при 56°C. Вакцина вводится подкожно, только в подлопаточную область.

3. Холерная вакцина содержит 8 млрд. вибрионов биотипов *Vibrio cholerae* и *Vibrio eltor* типов Инаба и Огава (по 2 млрд. каждого биотипа каждого серологического типа), убитых нагреванием или формалином.

Вакцина вводится подкожно взрослым и детям (старше 2 лет), по эпидемическим показаниям, при неблагоприятной эпидемической

обстановке.

4. Коклюшная вакцина содержит 20 млрд. коклюшных бактерий в гладкой форме (1 фаза), убитых формалином или мертиолом. Как отдельная вакцина не применяется, а используется в составе ассоциированного препарата АКДС (см. с. 19).

5. Лептоспирозная вакцина представляет собой взвесь убитых нагреванием лептоспир, наиболее распространенных серологических типов (*Leptospira icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *romona*, *canicola*).

Против лептоспироза вакцинируют людей в очагах инфекции, по эпидемиологическим показаниям. Препарат вводится подкожно.

6. Инактивированная культуральная вакцина против клещевого энцефалита включает в себя культуральный антиген вируса клещевого энцефалита, инактивированного формалином. Вакцина вводится подкожно.

Вакцины из убитых бактерий с успехом применяются и для лечения инфекционных заболеваний, имеющих характер хронического процесса (бруцеллез, хроническая дизентерия, хроническая гонорея, стафилококковые инфекции). Вакцины из убитых бактерий вводятся при недостаточной эффективности лекарственных препаратов, часто связанной со снижением антибиотикочувствительности возбудителей.

Действующим началом таких вакцин является микробная клетка с входящими в ее состав антигенами, которые стимулируют иммуногенез. При лечении убитыми вакцинами активируются фагоцитарные свойства лейкоцитов и клеток макрофагальной системы, усиливается иммуногенез. Действие вакцин строго специфично, применение индивидуально. Это связано с тем, что вакциноterapia вызывает у больных, как правило, обострение инфекционного процесса. Применение получили следующие препараты.

1. Бруцеллезная жидкая вакцина — взвесь убитых нагреванием бруцелл (возбудителей бруцеллеза овечьего и бычьего типов).

Вакцину вводят внутривенно при лечении больных бруцеллезом на всех стадиях заболевания — острой, подострой, хронической форме и в период ремиссий. Вакцина вызывает инфекционно-аллергическую перестройку организма.

2. Дизентерийная спиртовая вакцина представляет собой взвесь дизентерийных бактерий видов Флекснера и Зонне, убитых этиловым спиртом.

Дизентерийная вакцина применяется с целью лечения больных хроническими формами дизентерии (вне обострения), с поздно выявленными формами заболевания, по определенной схеме, указанной в наставлении. Вакцину вводят подкожно в подлопаточную область.

3. Гонококковая вакцина — взвесь гонококков нескольких (не менее 12) свежесделанных штаммов, убитых нагреванием.

Применяется для лечения больных с хронической и острой формами гонореи, а также при различных осложнениях (гонорейные эпидидимиты, бартолиниты, аднекситы, артриты). Вакцина вводится внутримышечно.

4. Стафилококковая вакцина представляет собой инактивированную (при 56°С в течение 2 час.) взвесь 10—12 патогенных стафилококков, выделенных от больных со стафилококковыми поражениями кожи. В 1 мл вакцины должно содержаться 2 млрд. микробных тел в 0,25%-ном феноле, добавляемом в качестве консерванта.

Стафилококковую вакцину используют с целью специфического лечения больных с различными заболеваниями стафилококковой этиологии (фурункулез, пиодермии, абсцессы, флегмоны и т. п.), причем вводить можно подкожно, внутримышечно и внутрикожно.

Для лечебных целей иногда применяют так называемые аутовакцины, которые получают в каждом отдельном случае специально из убитых бактерий возбудителей, выделенных от данного больного.

Химические вакцины

Химическими вакцинами принято называть препараты, содержащие наиболее активные по иммунологическим свойствам антигены, извлекаемые из микробных клеток различными методами (например, ферментативным перевариванием с последующим осаждением антигена этиловым спиртом). Следует помнить, что термин «химическая» вакцина не вполне соответствует своему названию, так как такие вакцины не являются химическими веществами в чистом виде, а представляют собой группы антигенов, эндотоксины и т. д.

Преимущество химических вакцин в том, что, во-первых, из микробных клеток выделяются иммунологически активные субстанции — изолированные антигены (комплекс — липополисахариды с полипептидами или протективные антигены), во-вторых, они менее реактогенны, в-третьих, стабильны и легче подвергаются стандартизации, что дает возможность более точно дозировать, и, наконец, четвертое — химические вакцины можно вводить в больших дозах и в виде ассоциированных препаратов.

Одним из недостатков химической вакцины являются небольшие размеры вводимых комплексов, что приводит к быстрому выведению их из организма и краткому антигенному раздражению. Поэтому химические вакцины вводятся на адьювантах (лат. *adjuvans* — помогающий), в качестве которых используются различные минеральные адсорбенты (гидрат окиси алюминия, фосфат кальция), минеральные масла. Адьюванты способствуют повышению эффективности вакцинации, так как они укрупняют антигенные частицы, создают в месте введения «депо», из которого происходит замедленная резорбция антигена, что приводит к перманентному антигенному раздражению. Кроме того, депонирующие вещества являются неспецифическими стимуляторами, вызывая приток плазматических клеток, непосредственно участвующих в выработке антител, что связано с развитием местного воспалительного процесса и стимуляции пролиферативной и фагоцитарной активности ретикуло-эндотелиальной системы.

В настоящее время в СССР выпускается и применяется химическая тифозно-паратифозная вакцина, которая готовится в нескольких вариантах в зависимости от состава включенных компонентов.

Химическая сорбированная тифозно—паратифозная—столбнячная вакцина (ТАВте) содержит выделенные из брюшнотифозных, А и В-паратифозных бактерий так называемые полные или комплексные антигены, извлеченные путем ферментативного переваривания с помощью трипсина, и очищенный столбнячный анатоксин (см. с. 19).

Вакцина выпускается также в виде ТВте — препарата (без паратифозного А компонента); Тте — вакцины (без паратифозных А и В компонентов) и ТАВ — препарат без столбнячного анатоксина.

Анатоксины

Анатоксины (anatoxinum от греч.— «an» — отрицание и «toxo» — отравляю) представляют собой препараты, полученные из бактериальных экзотоксинов, полностью лишенные токсических свойств, но сохранившие антигенные и иммуногенные свойства. Метод получения анатоксина предложил в 1923 году крупнейший французский ученый Рамон (G. Ramon).

При приготовлении анатоксинов культуры бактерий — возбудителей токсинемических инфекций, продуцирующих экзотоксины, выращивают в жидких питательных средах (реакторах большой емкости) для накопления токсина. Затем фильтруют через бактериальные фильтры для удаления микробных тел.

К фильтрату добавляют 0,3—0,4 % —формалина и помещают в термостат при температуре 37°—40°С на 3—4 недели до полного исчезновения токсических свойств. Полученный анатоксин проверяют на стерильность, безвредность и иммуногенность.

Такие препараты получили название нативных анатоксинов, т. к. они содержат большое количество веществ питательной среды, которые являются балластными и могут способствовать развитию нежелательных реакций организма при введении препарата. Нативные анатоксины необходимо вводить в больших дозах из-за их невысокой удельной активности.

Поэтому в настоящее время применяются преимущественно очищенные анатоксины, для чего нативные анатоксины подвергают обработке различными физическими и химическими методами (ионнообменной хроматографии, кислотному осаждению и др.), чтобы освободить от всех балластных веществ и сконцентрировать препарат в меньшем объеме. Однако уменьшение размеров частиц анатоксина сделало необходимым адсорбировать препарат на адьювантах (см. с. 16). Таким образом, применяющиеся анатоксины являются адсорбированными высокоочищенными концентрированными препаратами.

Специфическую активность или силу анатоксина определяют в реакции флоккуляции в так называемых единицах флоккуляции — (Lf) или по реакции связывания анатоксинов, выражающуюся в единицах связывания— (ЕС).

Титрование анатоксина в реакции флоккуляции (по методу Рамона) производят по стандартной флоккулирующей анитоксической сыворотке, в которой известно количество международных анитоксических единиц (МЕ, см. с. 23) в 1 мл. Одна антигенная единица анатоксина обозначается Limes

flocculationis (Lf — порог флоккуляции), это то количество анатоксина, которое вступает в реакцию флоккуляции с одной единицей дифтерийного антитоксина. Определив дозу анатоксина, давшую инициальную (первичную) реакцию флоккуляции с одной антитоксической единицей сыворотки, рассчитывают количество Lf препарата в 1 мл.

Антигенные свойства столбнячного анатоксина (и некоторых других) обозначают в единицах связывания (ЕС). Для определения ЕС необходимы: испытуемый препарат анатоксина, стандартная антитоксическая сыворотка (с содержанием 0,1 МЕ в 1 мл), опытная доза токсина (вытитрованная к 0,1 МЕ стандартной сыворотки), белые мыши.

Реакцию связывания проводят следующим образом: в ряд пробирок с одинаковым объемом стандартной сыворотки добавляют различные разведения испытуемого анатоксина. Смесь для связывания выдерживают в термостате 45 минут, затем в каждую пробирку добавляют опытную дозу токсина и вновь оставляют в термостате на 45 минут. После этого из каждой пробирки вводят смесь (сыворотки — анатоксина — токсина) 2—4 мышам и наблюдают за состоянием животных в течение 4 суток. Если весь анатоксин, добавленный к сыворотке, связался ею, то добавление токсина и последующее заражение мышей ведет к их гибели. При недостаточной^ дозе анатоксина для связывания всей сыворотки, добавленный токсин нейтрализуется сывороткой, и мыши остаются живыми.

Для расчета ЕС в 1 мл определяемого анатоксина берется то разведение анатоксина, при котором происходит гибель

50% белых мышей на 4-е сутки. Это количество анатоксина содержит дозу, связывающую 0,1 МЕ сыворотки.

Анатоксины применяются для профилактики и реже для лечения токсинемических инфекций (дифтерия, газовая гангрена, ботулизм, столбняк) и некоторых заболеваний, вызванных стафилококками.

Анатоксины выпускаются в виде монопрепаратов и в составе ассоциированных вакцин, предназначенных для иммунизации против нескольких заболеваний.

1. Дифтерийный анатоксин адсорбированный представляет собой фильтрат токсигенного штамма дифтерийной палочки «Парк Вильяме 8», обезвреженный по методу Района. В 1 мл анатоксина содержится 60 Lf (флоккулирующих единиц).

Применяется для профилактики дифтерии в виде моноанатоксина, чаще в составе АДС или АКДС

2. Столбнячный анатоксин сорбированный — препарат, полученный из фильтрата бульонной культуры столбнячной палочки, обезвреженный по методу Рамона при 40°C.

В 1 мл столбнячного анатоксина содержится не менее 20 ЕС.

Применяется в составе АКДС для иммунизации против столбняка детей в возрасте от 6 месяцев до 5 лет с последующими ревакцинациями.

3. Дифтерийно-столбнячный анатоксин адсорбированный (АДС) содержит 60 Lf дифтерийного и 20 ЕС столбнячного анатоксина.

АДС используют вместо вакцины АКДС при отсутствии необходимости иммунизации против коклюша.

4. Адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина (АКДС) содержит коклюшные бактерии I фазы, убитые мертиолом, дифтерийный и столбнячный анатоксины и служит для иммунизации детей против соответствующих инфекций. В 1мл АКДС содержится 30 Lf дифтерийного анатоксина, 10 ЕС столбнячного анатоксина и 20 млрд коклюшных микробных тел.

5. Адсорбированный стафилококковый анатоксин — фильтрат бульонной культуры стафилококков, обезвреженный по методу Района. Препарат должен содержать 10 ЕС в 1 мл.

Анатоксин применяют для профилактики и лечения различных воспалительных процессов, вызываемых стафилококками.

Стафилококковый анатоксин также рекомендуется для иммунизации беременных женщин с целью профилактики стафилококковых заболеваний у новорожденных и матерей.

6. Ботулинический анатоксин выпускается в виде полиана-токсина, в препарате содержатся анатоксины, полученные из экзотоксинов возбудителя ботулизма А, В, С, Е.

Для специфической профилактики полианатоксин рекомендуется вводить работникам лабораторий, имеющих контакт с ботулотоксином.

7. Анатоксины из экзотоксинов возбудителей газовой гангрены *Cl. perfringens* и *Cl. oedematiens* входят в состав комплексного препарата — сорбированной брюшнотифозной вакцины с секстаанатоксином.

II. СЫВОРОТКИ

Для специфического лечения и экстренной специфической профилактики ряда инфекционных болезней применяют сыворотки искусственно иммунизированных животных (в основном лошадей). В качестве лечебно-профилактических сывороток используют и сыворотки крови людей, переболевших инфекционным заболеванием или иммунизированных соответствующими вакцинными препаратами.

Иммунные сыворотки применяют также в лабораториях с диагностическими целями при идентификации выделенных микроорганизмов. Диагностические сыворотки получают при иммунизации кроликов.

1. Лечебные сыворотки

Преимущество лечебных сывороток перед вакцинными препаратами заключается в скорости создаваемого пассивного иммунитета. Введенные иммуноглобулины способны немедленно нейтрализовать патогенные микроорганизмы и токсические продукты их жизнедеятельности.

Однако гетерогенные (т. е. чужеродные) сыворотки обладают одним недостатком — кратковременностью обусловливаемого ими пассивного иммунитета. Быстрое выведение (через 1—2 недели) иммуноглобулинов из организма связано с естественным процессом распада белков и действием образовавшихся антител к введенным белкам — иммуноглобулинам.

При введении гомологичной сыворотки (сыворотки человека) антитела циркулируют в организме в течение 4—5 недель, обуславливая более длительное состояние невосприимчивости, связанное с тем, что происходит медленный процесс разрушения введенных белков.

Следует учитывать и то, что введение гетерогенных сывороток может вызвать побочные реакции — анафилактический шок или сывороточную болезнь.

Анафилактический шок — аллергическая реакция немедленного типа, развивающаяся при повторном парентеральном введении чужеродного белка. Характеризуется, проявлением резкого возбуждения с последующим угнетением центральной нервной системы, бронхоспазмом, резким падением артериального давления — коллапсом, иногда сопровождается судорогами. В целях профилактики развития анафилактического шока перед введением лечебных сывороток производятся кожные тесты для выявления индивидуальной чувствительности к лошадиному белку. С этой целью используют лошадиную сыворотку, ампулы которой находятся в коробках с лечебно-профилактическими сыворотками. В сгибательную поверхность предплечья вводят 0,1 мл сыворотки, разведенной в 100 раз, и наблюдают в течение 20 минут. При наличии отрицательной реакции (диаметр папулы в месте инъекции не превышает 0,9 см, краснота незначительная) вводят лечебную сыворотку в дозе 0,1 мл подкожно и затем через 30—60 минут (при отсутствии реакции) всю необходимую дозу сыворотки (метод десенсибилизации по Безредке). При положительной реакции на лошадиный белок, свидетельствующей о повышенной чувствительности и возможности развития анафилактических реакций, лечебная сыворотка вводится по жизненным показаниям (при прямой угрозе жизни больного) и с особыми предосторожностями только в присутствии врача.

Сывороточная болезнь развивается через 6—14 дней после введения сыворотки и проявляется лихорадкой, наличием пятнисто-папулезной зудящей сыпи, лимфаденитом. Частота развития сывороточной болезни зависит от количества введенного чужеродного белка. Для устранения этого осложнения сыворотки подвергают очистке от балластных белков.

В настоящее время для очистки и концентрации антитоксических сывороток — для выделения иммуноглобулинов — применяется метод «Д и а ф е р м - 3», который включает следующие этапы.

I. Гипериммунная кровь от лошадей подвергается сепарированию для отделения плазмы от форменных элементов крови.

II. К плазме добавляют пепсин для ферментативного гидролиза сывороточных белков.

III. Ферментированная плазма подвергается термоденатурации при температуре 58°C в присутствии 14%-ного сульфата аммония, что приводит к осаждению балластных белков, которые и удаляются.

IV. Для высаливания активных глобулинов из оставшейся жидкой части плазмы добавляют 34% сульфата аммония.

V. Проведение диализа осадка с глобулинами против проточной воды

для удаления сульфата аммония.

VI. Дополнительная очистка диализата от оставшихся балластных белков в присутствии хлороформа, который затем отделяется на сепараторах.

VII. В заключение проводится осветление сыворотки и стерилизующая фильтрация.

В процессе очистки и концентрации полностью удаляются альбумины и большая часть α -глобулинов, остаются γ и β_2 глобулины, которые составляют 90% антитоксинов. Кроме того, при протеолизе происходит глубокое изменение молекулы антитоксического антитела и уменьшаются его нежелательные свойства.

По своей направленности и особенности действия лечебные сыворотки можно разделить на следующие группы: антитоксические, антибактериальные и противовирусные сыворотки (или гетерогенные иммуноглобулины) и иммуноглобулины гомологичные (получаемые из крови человека).

Антитоксические сыворотки

Антитоксические сыворотки получают иммунизацией лошадей возрастающими дозами анатоксинов, а затем и соответствующими токсинами. Сыворотки подвергают очистке и концентрации методом «Диаферм-3», контролю на безвредность, апиrogenность, затем титруют т. е. определяют содержание антитоксинов в 1 мл препарата. Специфическая активность сывороток или количество антител измеряется с помощью специальных методов, основанных на способности сывороток *in vitro* и *in vivo* нейтрализовать соответствующие токсины и выражается в международных антитоксических единицах (МЕ), принятых ВОЗ. За 1 МЕ принимается то минимальное количество сыворотки, которое способно нейтрализовать определенную дозу токсина, выражающуюся в стандартных единицах, обозначаемых как смертельные, некротические или реактивные дозы в зависимости от вида токсина и способа титрования.

Титрование антитоксических сывороток может проводиться тремя методами — методами Эрлиха, Рёмера, Рамона.

Титрование сывороток по методу Рамона осуществляется с помощью реакции флоккуляции по известному анатоксину или токсину, одну Lf (*Limes flocculationis* — порог флоккуляции) которых нейтрализует одна единица дифтерийного антитоксина. Первичная или инициальная реакция флоккуляции наступает при соответствии количества антигенных единиц анатоксина количеству антитоксинов в исследуемой сыворотке. Исходя из результатов первичной реакции флоккуляции и ведется расчет антитоксических единиц в 1 мл испытуемой сыворотки. Однако метод Рамона является только ориентировочным.

Метод Эрлиха. Перед титрованием сывороток по методу Эрлиха проводят определение условной смертельной (опытной) дозы токсина Lt (*Limes tod*). Lt определяется с помощью стандартной антитоксической сыворотки, к определенному количеству которой добавляют различные объемы токсина и после выдерживания смеси при комнатной температуре (в

течение 45 минут) вводят белым мышам или морским свинкам. Затем наблюдают за животными четверо суток. За опытную дозу токсина (Lt) принимается то количество токсина, которое в смеси с 1 МЕ стандартной сыворотки вызывает гибель 50% взятых в опыт животных.

На втором этапе титрования к различным разведениям испытуемой сыворотки добавляют опытную дозу токсина, смесь также выдерживают и вводят животным. По получаемым результатам производят расчет титра испытуемой антитоксической сыворотки.

Метод Рёмера. Титрование антитоксических сывороток по методу Рёмера проводится также в два этапа, но является более экономичным, т. к. опыт проводится на одном животном. Предварительно определяется опытная некротическая доза токсина — Ln (limes necrosis) введением внутрикожно морской свинке различного количества токсина со стандартной сывороткой. За некротическую дозу токсина принимается то его наименьшее количество, которое при внутрикожном введении морской свинке в смеси с 1/50 МЕ стандартной противодифтерийной сыворотки вызывает на месте введения некроз на 4—5-й день. Затем различные объемы испытуемой сыворотки в смеси с оттитрованной некротической дозой токсина вводятся внутрикожно морской свинке и по результатам проводится расчет титра сыворотки. По методу Рёмера титруется противодифтерийная сыворотка.

В настоящее время выпускаются и применяются следующие антитоксические сыворотки.

1. Противодифтерийную сыворотку получают гипериммунизацией лошадей дифтерийным анатоксином и применяют, главным образом, с терапевтической целью.

За 1 МЕ стандартной противодифтерийной сыворотки принимается то ее минимальное количество, которое нейтрализует 100 Dlm стандартного токсина для морской свинки весом 250 г. В 1 мл сыворотки должно содержаться не менее 2000 МЕ. Доза вводимой сыворотки зависит от тяжести заболевания: 5000—15000 МЕ при легких формах и от 30000—50000 МЕ при токсических. Сыворотку вводят подкожно или внутримышечно.

2. Противостолбнячная сыворотка представляет собой препарат, получаемый из сыворотки крови лошадей, гипериммунизированных столбнячным анатоксином или токсином.

За 1 МЕ противостолбнячной сыворотки принимается то количество сыворотки, которое нейтрализует 1000 Dlm стандартного токсина для морской свинки весом 350 г.

В 1 мл противостолбнячной сыворотки должно содержаться не менее 1500 МЕ.

Одна профилактическая доза, равная 3000 МЕ столбнячного антитоксина, вводится подкожно. С лечебной целью сыворотку вводят в значительно больших дозах (100 000—200 000 МЕ) внутримышечно, внутривенно или в спинномозговой канал в зависимости от тяжести заболевания.

3. Противогангренозные моно- и поливалентные сыворотки получают

гипериммунизацией лошадей анатоксинами или токсинами возбудителей газовой гангрены (*Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens*, *Cl. septicum*). Доза каждого типа антитоксинов — 10 000 МЕ в 1 мл сыворотки.

Противогангренозные сыворотки применяются для лечения и профилактики газовой гангрены. С профилактической целью сыворотку вводят внутримышечно, с лечебной — внутривенно, очень медленно, капельным методом.

До установления бактериологического диагноза необходимо вводить смесь моновалентных сывороток или поливалентную сыворотку. После определения вида возбудителя, вызвавшего газовую гангрену, вводится сыворотка соответствующего вида.

4. Противоботулинические анитоксические сыворотки А, В, Е получают от лошадей, гипериммунизированных анатоксинами соответствующих типов, и выпускают в виде моновалентных сывороток, включающих по 1 ампуле сыворотки каждого типа, или в виде поливалентной сыворотки, содержащей в ампуле антитела ко всем 3 типам токсинов клостридий ботулизма.

За 1 МЕ противоботулинической сыворотки принимается то наименьшее количество ее, которое обладает способностью нейтрализовать 10 000 D_{1m} токсина для мышей весом 18—20 г.

Одна лечебная доза антитоксина типа А — 10 000 МЕ, типа В — 5000 МЕ и типа Е — 10 000 МЕ. Антитоксины типов С и F в настоящее время не включаются в поливалентную сыворотку, так как заболевания, вызываемые возбудителями этих типов, встречаются редко.

При первых признаках заболевания больному вводят поливалентную сыворотку (внутримышечно или внутривенно). После установления типа токсина назначается соответствующая моновалентная сыворотка.

С профилактической целью сыворотки вводят людям, употреблявшим продукты, вызвавшие отравление.

Антибактериальные и противовирусные сыворотки

Антибактериальные сыворотки получают гипериммунизацией лошадей соответствующими убитыми бактериями или антигенами и содержат антитела с агглютинирующими, литическими и опсонизирующими свойствами.

Они не нашли широкого применения в силу их малой эффективности.

Антибактериальные сыворотки относятся к нетитруемым препаратам, так как общепринятой единицы измерения их лечебной силы не существует. Поэтому антибактериальные лечебные сыворотки дозируются в объемных единицах, непосредственно у постели больного, исходя из степени тяжести заболевания.

Для очистки и концентрации антибактериальных сывороток и некоторых противовирусных используют метод, основанный на разделении белковых фракций нативных сывороток и выделении активных иммуноглобулинов этиловым спиртом при низкой температуре (метод водно-спиртового осаждения на холоду).

Среди антибактериальных сывороток (иммуноглобулинов) получили применение следующие препараты:

1. Противосибиреязвенный глобулин — содержит β и γ глобулины, извлеченные из сывороток лошадей, гипериммунизированных сибиреязвенными бациллами. Применяются для профилактики людям, имевшим контакт с инфицированным материалом, и для лечения сразу после установления диагноза. Глобулин вводят внутримышечно.

2. Гамма-глобулин* противолептоспирозный получают из сыворотки крови волов, гипериммунизированных патогенными для человека лептоспирами (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. canicola*, *L. tarassovi*).

Активность препарата определяется в реакции агглютинации, агглютинационный титр должен быть не ниже 1 : 8000.

Гамма-глобулины применяются для лечения лептоспирозов. Препарат дозируется в объемных единицах в зависимости от тяжести заболевания и вводится внутримышечно. Перед введением гамма-глобулина необходимо проверить чувствительность больного к гетерогенному воловьему белку.

* Более правильное название препаратов — «иммуноглобулины», но для многих выпускаемых сывороток еще сохранилось старое название «гамма-глобулины».

Антивирусные сыворотки также получают из сыворотки крови животных, иммунизированных вакцинными штаммами вирусов или соответствующими вирусами. Выпускают антивирусные сыворотки, очищенные методом спиртового фракционирования при низкой температуре.

Имеют применение следующие препараты:

1. Гамма-глобулин против клещевого энцефалита содержит гамма-глобулиновую и частично бета-глобулиновую (5 — 30%) фракции, извлеченные из сыворотки лошадей, гипериммунизированных вирусом клещевого энцефалита.

Гамма-глобулин применяют для лечения и профилактики клещевого энцефалита, омской геморрагической лихорадки и двухволнового менингоэнцефалита, вводят внутримышечно.

2. Антирабический гамма-глобулин (иммуноглобулин гетерогенный) извлекается из сыворотки крови лошадей, гипериммунизированных вирусом *fixe*. Активность гамма-глобулина должна быть не ниже 800 МЕ/мл.

Антирабический гамма-глобулин рекомендуется вводить внутримышечно за 24 часа перед началом вакцинации антирабической вакциной всем пострадавшим людям, получившим укусы бешеных животных, оцениваемые как укусы средней тяжести и тяжелые.

Иммуноглобулины (гомологичные)

Иммуноглобулины, получаемые из крови человека, готовят двух видов — противокоревой (или нормальный) и иммуноглобулины направленного действия. Преимущество этих иммуноглобулинов перед гетерогенными в том, что они практически не реактогенны и циркулируют в организме более

продолжительное время, в течение 30—40 дней.

Извлекают иммуноглобулины из сыворотки крови человека путем фракционирования (по методу Кона) этиловым спиртом при температуре ниже нуля.

Противокоревой (или нормальный) иммуноглобулин получают из донорской, плацентарной или абортной крови. Содержит антитела против вируса кори, а также против вирусов гриппа, гепатита, полиомиелита, возбудителей коклюша и некоторых других вирусных и бактериальных инфекций.

Препарат применяют для профилактики кори, инфекционного гепатита, коклюша, полиомиелита, менингококковой инфекции и др.

Для профилактики кори иммуноглобулины вводят всем детям старше 3 месяцев, бывших в контакте с больным и не привитым коревой вакциной. Иммуноглобулины вводят с профилактической целью всем детям до 6 лет, контактировавшим с больным коклюшем и не привитым против этой инфекции.

Профилактика гепатита А иммуноглобулином проводится в предэпидемический период и в эпидемических очагах. Препарат в некоторых случаях оказывает защитное действие или чаще смягчает клиническое течение болезни. Очень важно правильное соблюдение дозировки иммуноглобулина (0,02 мл на 1 кг веса). Продолжительность профилактического действия препарата 3—6 месяцев.

Иммуноглобулины направленного действия готовят из сыворотки крови людей-добровольцев, подвергшихся специальной иммунизации против определенной инфекции. Такие препараты содержат повышенные концентрации специфических антител и используются для лечебных целей. В настоящее время получают иммуноглобулины направленного действия против гриппа, бешенства, оспы, клещевого энцефалита, столбняка и стафилококковых инфекций.

1. Противогриппозный донорский гамма-глобулин (иммуноглобулин) готовят из сыворотки крови доноров, иммунизированных живой гриппозной вакциной типов А и В.

Применяется препарат для лечения, профилактики гриппа и вводится внутримышечно в определенных дозах в зависимости от возраста.

2. Антирабический гамма-глобулин (иммуноглобулин) извлекают из сыворотки людей, иммунизированных вакцинным штаммом вируса бешенства. Этот препарат вводится людям, укушенным бешеными животными, и которым нельзя вводить гетерогенный антирабический гамма-глобулин из-за высокой чувствительности к лошадиному белку. Применяется препарат также при лечении осложнений, вызванных антирабическими прививками.

3. Противооспенный донорский иммуноглобулин содержит гамма-глобулиновую фракцию крови доноров, специально ревакцинированных против оспы. Кровь для приготовления иммуноглобулина берут, начиная с 14—21-го дня после ревакцинации при максимальном содержании в ней

вируснейтрализующих антител (не ниже 1 : 4000).

Препарат применяется при лечении осложнений после прививок против оспы и для лечения заболевания.

4. Иммуноглобулин человеческий противостолбнячный получают из сыворотки крови людей-доноров, ревакцинированных столбнячным анатоксином.

Противостолбнячный иммуноглобулин применяется для экстренной профилактики столбняка у непривитых детей и взрослых и, в случае необходимости, при лечении столбняка. Препарат можно вводить отдельно или в сочетании с анатоксином. Показанием к экстренной профилактике столбняка являются травмы, ожоги и обморожения II и III степени и в ряде других случаев, связанных с нарушением целостности слизистых, кожи.

Экстренная активно-пассивная профилактика столбняка при травмах введена в СССР с 1960 года.

5. Иммуноглобулин человеческий противостафилококковый представляет собой гамма-глобулиновые фракции сыворотки крови людей-доноров (иммунизированных стафилококковым анатоксином) и из плацентарной крови.

В 1 мл препарата должно содержаться 50 МЕ донорского иммуноглобулина и 20 МЕ плацентарного иммуноглобулина.

Противостафилококковый иммуноглобулин применяется для лечения детей и взрослых различными стафилококковыми инфекциями, особенно при септическом течении заболеваний.

С этой же целью используется и антистафилококковая плазма, представляющая собой жидкую часть крови людей-добровольцев, иммунизированных стафилококковым анатоксином.

2. Диагностические сыворотки

В диагностике инфекционных болезней широко применяются иммунные реакции при идентификации возбудителя: при установлении родовой, видовой и типовой принадлежности микроба (вируса). Для постановки таких реакций необходимы специфические диагностические сыворотки, которые в зависимости от содержания соответствующих антител называются агглютинирующие, преципитирующие, гемолитические, противовирусные. С диагностической целью используются люминесцирующие сыворотки, содержащие антитела, меченные флюоресцирующими красителями.

Иммунные диагностические сыворотки получают из крови животных (в основном кроликов), иммунизированных соответствующими микробами или антигенами.

Агглютинирующие сыворотки

Агглютинирующую сыворотку получают иммунизацией кроликов (внутривенно, подкожно или внутрибрюшинно) взвесью убитых бактерий, начиная с дозы 200 млн., затем 500 млн., 1 млрд., 2 млрд., микробных тел в 1 мл, с интервалами 5 дней. Через 7—8 дней после последней иммунизации берут кровь и определяют титр антител. Титром агглютинирующей

сыворотки называется то максимальное разведение сыворотки, при котором происходит агглютинация с соответствующим микроорганизмом.

Агглютинирующие сыворотки применяются при идентификации микроба в развернутой реакции агглютинации. Если изучаемый микроорганизм агглютинируется сывороткой до титра или до половины значения титра, его можно считать принадлежащим к тому виду, название которого указано на этикетке ампулы.

Неадсорбированные агглютинирующие сыворотки обладают (Высоким титром — до 1 : 12800— 1 : 25600.

Недостатком таких сывороток является то, что они способны давать групповые реакции агглютинации, так, как они содержат антитела к бактериям, имеющим общие антигены в пределах семейства, группы и рода.

Поэтому в настоящее время большинство агглютинирующих сывороток выпускаются адсорбированными, монорецепторными и адсорбированными поливалентными, содержащими только типовые или видовые антитела и соответствующими или определенному типу или виду микроорганизма. Эти сыворотки не подлежат разведению.

Для получения таких сывороток применяют метод Кастеллиани — метод адсорбции, который состоит в том, что при насыщении агглютинирующей сыворотки родственными гетерогенными бактериями происходит адсорбция групповых антител, а специфические антитела остаются в сыворотке. В зависимости от полноты истощения групповых агглютининов можно получить монорецепторные сыворотки — сыворотки, имеющие антитела только к одному рецептору-антигену или адсорбированные, поливалентные, дающие реакции агглютинации с двумя — тремя родственными бактериями, имеющими общий антиген, в отношении которого проводилась адсорбция.

Адсорбированные сыворотки применяют при идентификации выделенных возбудителей в реакции агглютинации на стекле (пластинчатый метод).

Агглютинирующие сыворотки наиболее широко применяются при диагностике заболеваний, вызываемых бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. Так, при идентификации эшерихий используются поливалентные и типовые ОК-сыворотки; при дифференциации сальмонелл — набор сывороток: агглютинирующая адсорбированная поливалентная сальмонеллез-ная О-сыворотка (групп А, В, С, Д, Е) — для определения принадлежности к роду *Salmonella*, при положительном результате — определяют отдельно с каждой сывороткой (входящей в смесь) серологическую группу и в заключение определяется серологический тип выделенного возбудителя с моно-рецепторными Н-сыворотками сальмонелл, входящих в данную группу.

Преципитирующие сыворотки

Преципитирующие сыворотки получают иммунизацией кроликов убитыми микроорганизмами, антигенами бактерий, экстрактами микробов и т. п. Иммунизация проводится длительно в течение нескольких месяцев по

определенным схемам. По одной из схем иммунизацию начинают со 100 млн. бактериальных клеток в 1 мл, увеличивая дозу в 2 раза, заканчивая введением 10—20 млрд. в 1 мл, проводя 10—12 инъекций с интервалом в 4—6 дней.

Титром преципитирующей сыворотки называется то максимальное разведение антигена, которое преципитируется цельной сывороткой. Сыворотки выпускают с титром не меньше 1 : 100 000. Это связано с тем, что антиген, определяемый в реакции преципитации, имеет микроскопическую величину и в единице объема его может содержаться больше, чем в таком же объеме антител.

Специфические преципитирующие сыворотки применяются при диагностике инфекционных заболеваний (менингит, сибирская язва, чума, туляремия, полиомиелит и др.); в судебно-медицинской практике для определения видовой принадлежности белка крови; в санитарной практике для обнаружения соответствующих белковых веществ в продуктах (при подозрении на фальсификацию).

Реакция преципитации может быть поставлена в виде кольцепреципитации или реакции преципитации в геле, последняя дает возможность изучать тонкую антигенную структуру бактерий и вирусов.

Гемолитическая сыворотка

Гемолитическую сыворотку получают путем 3—4-кратной иммунизации кроликов взвесью эритроцитов барана с интервалом в 2—3 дня. Титром сыворотки называется то ее максимальное разведение, которое в объеме 0,5 мл в присутствии комплемента вызывает гемолиз 0,5 мл 3%-ной взвеси эритроцитов барана в течение часа при температуре 37°C. Титр должен быть не ниже 1 : 1200—1 : 1500.

Гемолитическая сыворотка применяется в реакции связывания комплемента (РСК) в индикаторной системе (гемолитическая сыворотка + эритроциты барана).

Противовирусные сыворотки

Иммунные противовирусные сыворотки, применяющиеся при идентификации вирусов, получают от различных животных в зависимости от вида вируса.

Так, например, сыворотку против вируса вакцины, оспы и аденовирусов получают иммунизацией соответствующими вирусами кроликов; против вируса гриппа — белых хорьков, крыс, кур, мышей; против вируса кори — морских свинок и т. п.

В некоторых случаях предпочтительнее сыворотка реконвалесцентов, например, при диагностике полиомиелита, хотя против каждого отдельного типа вируса сыворотки можно получить иммунизацией обезьян.

Необходимость строгого выбора животного для получения иммунных сывороток связана с учетом содержания в них неспецифических ингибиторов, которые подавляют активность вирусов и неспецифических агглютининов.

Поэтому перед проведением реакций обязательно освобождают иммунные сыворотки от термолабильных (прогреванием при 56°C — 30

мин.) и термостабильных (ферментированием, обработкой углекислотой и др. методами в зависимости от вида вируса) ингибиторов и проверяют на наличие, неспецифических агглютининов.

Иммунные диагностические противовирусные сыворотки применяются для определения вида или типа вируса, в реакциях торможения гемагглютинации (РТТА), связывания комплемента (РСК), реакции нейтрализации на лабораторных животных, в культурах клеток и развивающихся куриных эмбрионах.

Люминесцирующие сыворотки

Люминесцирующие сыворотки представляют собой иммунные сыворотки, содержащие специфические антитела, меченные флюоресцирующими красителями. При приготовлении люминесцирующих сывороток проводят присоединение к глобулиновой фракции иммунной сыворотки различных флюорохромов путем прочной химической связи.

Микроорганизмы, обработанные люминесцирующими сыворотками, приобретают способность светиться при просмотре препаратов с помощью люминесцентных микроскопов (МЛ-1, МЛ-2, МЛ-3, МЛД-1). Для маркирования антител люминесцирующих сывороток чаще всего применяется изотиоцианат флюоресцеина, дающий ярко-зеленое свечение по периферии клеток с характерной для данного вида бактерий морфологией; реже — различные производные родамина, которые придают оранжево-красное свечение.

Приготовление препаратов для люминесцентной микроскопии несложно: исследуемую взвесь, содержащую микроорганизмы, наносят на предметное стекло, высушивают, фиксируют в жидком фиксаторе (этанол, ацетон и др.), окрашивают люминесцирующей сывороткой в течение времени, указанного на этикетке ампулы с сывороткой. Просматривают препараты в падающем свете люминесцентного микроскопа с иммерсионной системой.

Интенсивность свечения оценивается по четырехплюсовой системе:

+ + + + — очень яркое свечение по периферии бактерий, контрастируемое с темным телом микроорганизма;

+ + + — яркая флюоресценция периферии изучаемого микроорганизма;

+ + или

+ — слабое свечение периферии клетки, не контрастируемое с телом бактерии.

Метод люминесцентной микроскопии широко используется с диагностической целью — для выявления патогенных микроорганизмов в патологическом материале от больного, обнаружения бактерий непосредственно в объектах внешней среды (воды, смывы, почвы и т. д.), а также при определении и титровании антител в сыворотке больных.

Люминесцентно-серологический метод (метод Кунса) для выявления микроорганизмов и антител используется в 2 модификациях: прямой и непрямой метод.

1. Прямой метод заключается в том, что исследуемый препарат

обрабатывается люминесцентной сывороткой, специфической в отношении изучаемого микроорганизма. В результате образуется флюоресцирующий комплекс антиген — антитело.

В настоящее время выпускаются люминесцирующие сыворотки: колиэнтеритные, брюшнотифозные, паратифозные А и В, дизентерийные Флекснера и Зонне, холерная, бруцеллезная, туляремийная, сибиреязвенная, чумная.

2. Непрямой метод может быть использован как для выявления бактерий, так и определения антител. Сущность непрямого метода состоит в том, что сначала проводится обычная иммунная реакция между антигенами и специфическими к ним антителами, затем этот комплекс обрабатывается люминесцирующей антисывороткой, специфичность антител которой направлена против белков сыворотки того вида животного, от которого получена иммунная сыворотка. Результатом является флюоресцирующий комплекс: антиген — антитело — антиантитело. Для постановки непрямого метода выпускаются люминесцирующие сыворотки против глобулинов кролика, человека, лошади и др.

Этот метод имеет определенное преимущество перед прямым, так как является в 10—12 раз более чувствительным и для его постановки можно в лаборатории иметь ограниченный набор люминесцирующих сывороток.

Следует подчеркнуть те несомненные преимущества метода люминесцирующих антител, благодаря которым в настоящее время он широко применяется в практике. Во-первых, реакция позволяет наблюдать соединение антигена бактерий с антителами буквально на одной особи и, следовательно, характеризуется высокой чувствительностью, во-вторых, реакция является универсальной (так как может использоваться для обнаружения бактерий, вирусов, риккетсий и их растворимых антигенов), и в-третьих, реакция характеризуется простотой приготовления препаратов и быстрым получением ответа, и, наконец, позволяет исследовать не только живые, но и погибшие микроорганизмы.

Люминесцентная микроскопия используется для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний.

III. ДИАГНОСТИКУМЫ

В диагностических целях при обнаружении антител в сыворотке крови больных, реконвалесцентов и бактерионосителей используются серологические реакции.

Для постановки таких реакций применяются диагностикумы-препараты, содержащие взвесь обезвреженных микроорганизмов или определенные антигены.

Необходимость использования диагностикумов для серологических реакций связана не только с явным их преимуществом перед живыми культурами микробов (безопасность в работе), но еще и потому, что для приготовления диагностикумов подбираются штаммы микроорганизмов с высокой чувствительностью к антителам и способностью длительно сохранять антигенные свойства.

Для инактивации микроорганизмов при приготовлении диагностикумов чаще всего используются химические вещества, особенно формалин, являющийся лучшим консервантом. Убитые нагреванием микробы хуже сохраняют антигенные свойства и применяются редко.

В серологических реакциях (реакции агглютинации, реакции пассивной гемагглютинации, реакции связывания комплемента, реакции торможения гемагглютинации) для выявления специфических антител применяются: бактериальные, эритроцитарные и вирусные диагностикумы.

Бактериальные диагностикумы могут содержать инаktivированную микробную взвесь или отдельные антигенные компоненты бактерий: О, Н или Vi-антигены и используются в реакциях агглютинации.

Эритроцитарные диагностикумы представляют собой эритроциты (обработанные танином или формалином) с адсорбированными на них антигенами, извлеченными из бактерий, и применяются в РПГА (реакции пассивной гемагглютинации). В том случае, когда РПГА используется для выявления антигена в выделениях больных, в тканях и др., применяют «антительные диагностикумы», т. е. эритроциты, сенсibilизированные антителами.

Вирусные диагностикумы — препараты, содержащие инаktivированные вируссодержащие жидкости (культуральные, из куриных эмбрионов или организма животных, зараженных соответствующим вирусом), применяются в РСК (реакции связывания комплемента), реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции нейтрализации.

В настоящее время в лабораториях используются следующие диагностикумы.

1. Бактериальный диагностикум сальмонелл тифа (или сальмонелл паратифа А и В, шигелл Флекснера, Зонне и др. бактерий семейства *Enterobacteriaceae*) является 3-млрд. взвесью бактерий, инаktivированных формалином, и применяется в реакции агглютинации для обнаружения антител в сыворотке больных.

2. Сальмонеллезные О-диагностикумы содержат О-антигены различных групп сальмонелл (инаktivированных 15%-ным раствором глицерина). Применяются для выявления О-антител при сальмонеллезных инфекциях в реакции агглютинации с сывороткой больных.

3. Сальмонеллезные Н-монодиагностикумы (Н-антигены 1 и 2-й фазы) — представляют собой жгутиковые антигены 1-й фазы (а, в, с, е, еh и др.) и 2-й фазы (1, 2, 5, 6, 7), выделенные путем обработки 0,5—0,75%-ным формалином из бульонной культуры сальмонелл соответствующих видов и используются в реакции агглютинации для определения заболевания в прошлом (анамнестическая реакция агглютинации) и реже с диагностической целью.

4. Vi — брюшнотифозный диагностикум — препарат, полученный из *S. typhi* в Vi — форме воздействием формалина, применяется в реакции агглютинации при выявлении брюшнотифозного бактерионосительства.

5. Единый бруцеллезный диагностикум — взвесь бруцелл

(инактивированных фенолом), подкрашенная метиленовым синим. Единый диагностикум применяется для определения антител в сыворотках крови больных бруцеллезом людей и животных в реакциях агглютинации Райта и Хеддльсона.

6. Эритроцитарный сальмонеллезный О-диагностикум — взвесь эритроцитов с адсорбированными на них О-антигенами различных групп сальмонелл. Используется для постановки РПГА с сывороткой больного при уточнении клинического диагноза сальмонеллезной инфекции.

7. Эритроцитарный Vi-диагностикум — эритроциты, сенсibilизированные очищенным Vi-антигеном *S. typhi*, применяется в РПГА при выявлении брюшнотифозного бактерионосительства.

8. Гриппозный диагностикум представляет собой аллантоисную жидкость инфицированных вирусом гриппа (типов А, В) куриных эмбрионов и инактивированную мертиолом или формалином. Диагностикумы необходимы при постановке РТГА с парными сыворотками больных для уточнения клинического диагноза и циркулирующего типа вируса гриппа.

9. Диагностикум вируса клещевого энцефалита получают из суспензии мозга белых мышей, зараженных вирусом клещевого энцефалита. Суспензию подвергают центрифугированию (для осветления) и инактивируют химическими веществами.

Диагностикум используется в РТГА и РСК с сывороткой больных при диагностике заболевания.

IV. АЛЛЕРГЕНЫ И ТОКСИНЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ КОЖНЫХ ПРОБ

Аллергены бактериальные или инфекционные представляют собой взвесь убитых микробных клеток или извлеченных из них различных фракций и применяются в качестве диагностических препаратов для выявления повышенной чувствительности организма к возбудителям инфекционных заболеваний.

Бактериальные экзотоксины (дифтерийный, скарлатинозный), используются для кожных проб при определении антитоксического иммунитета к этим заболеваниям.

Аллергические кожные пробы применяются с целью диагностики при многих инфекционных заболеваниях, сопровождающихся аллергической перестройкой организма. В зависимости от способа введения аллергена кожные пробы могут быть аппликационные — при определении чувствительности к некоторым лекарственным, химическим веществам; скарификационные — при определении чувствительности к бытовым, пылевым, эпидермальным аллергенам и внутрикожные — при определении чувствительности к бактериальным и грибковым аллергенам.

Диагностическое значение реакций организма на аллергены различно в течение инфекционного процесса. В начале инфекционного процесса положительная реакция свидетельствует только о зараженности определенным возбудителем и состоянии аллергии к нему и не может расцениваться как диагностическая. В разгар заболевания аллергическая

проба учитывается как диагностическая. После некоторых инфекционных болезней остается аллергия к соответствующему возбудителю в течение нескольких лет, обнаружение которой свидетельствует о перенесенной инфекции. При положительной реакции на аллерген, учитываемой через 20 минут, а затем через 24 и 48 часов (редко 7 суток), ощущается чувство жжения на месте введения препарата, появляется покраснение, отек, может быть везикула.

Аллергены, применяемые с диагностической целью, разнообразны по химической природе и методам получения.

Ниже приводится описание некоторых диагностических препаратов, вошедших в широкую практику.

1. Туберкулин. В настоящее время выпускаются три препарата для проведения аллергических туберкулиновых проб: альт-туберкулин Коха, сухой очищенный туберкулин (РРД) и очищенный туберкулин в стандартном разведении.

Альт-туберкулин Коха (АТК) — желтовато-коричневая жидкость, получаемая в результате выпаривания до 1/10 первоначального объема 5—6-недельной культуры микобактерий, выращенной на глицериново-мясопептонном бульоне. Старый туберкулин Коха содержит продукты жизнедеятельности и распада микобактерий и питательную среду. Препарат должен содержать не менее 90000 ТЕ (туберкулиновых единиц) в 1 мл.

Альт-туберкулин рекомендуется применять только для кожных проб Пирке.

Сухой очищенный туберкулин (РРД) — (*Derivatum proteinos purificatum tuberculinii mammalinii*) представляет собой белковый препарат, полученный из фильтрата культуры микобактерий туберкулеза осаждением химическими веществами с последующей очисткой. В 1 мл очищенного сухого туберкулина содержится 50000 ТЕ. Препарат применяется для внутрикожных проб по Манту, подкожной пробы Коха и других тестов.

Очищенный туберкулин в стандартном разведении (РРД-2) приготовлен из порошка-туберкулина разведением его в растворителе (твин-80), обеспечивающим стабилизацию биологической активности препарата — 2 или 5 ТЕ в 0,1 мл.

Применяется только для постановки внутрикожных проб по Манту.

Преимуществом очищенных туберкулинов является их большая чувствительность и стандартность.

Туберкулиновая диагностика проводится с целью определения инфицированности населения, особенно детей и подростков, туберкулезом; при отборе людей, подлежащих прививкам против туберкулеза; определения эффективности вакцинации и т. д.

При массовой туберкулиновой диагностике применяют внутрикожную пробу Манту, используя очищенный туберкулин в стандартном разведении.

При отсутствии у обследуемого человека инфицированности микобактериями туберкулеза наблюдается отрицательная реакция; при размере инфильтрата 2—4 мм — проба сомнительная, поэтому реакцию

следует повторить через 3—4 недели. Если инфильтрат более 5 мм — реакция расценивается как положительная.

2. Тулярин содержит убитые нагреванием при 70°C микроорганизмы в 3%-ном глицерине, применяется для внутрикожного введения при диагностике туляремии, начиная с 3—5-го дня болезни. Проба с тулярином применяется также для определения поствакцинального иммунитета.

3. Бруцеллин — представляет собой фильтрат 3-недельной (убитой нагреванием) бульонной культуры всех трех видов бруцелл.

Препарат вводится строго внутрикожно при диагностике бруцеллеза и при определении иммунитета у вакцинированных людей (кожная проба Бюрне).

4. Токсоплазмин — антигенный комплекс, полученный из экссудата брюшной полости мышей, зараженных внутрибрюшинно возбудителем токсоплазмоза. Препарат не должен содержать жизнеспособных токсоплазм.

Токсоплазмин применяется для диагностики при заболеваниях, подозрительных на токсоплазмоз — при акушерской патологии, поражении глаз, лихорадках неясной этиологии и т. п.

5. Антраксин — препарат, содержащий белково-полисахаридно-нуклеиновый комплекс, полученный путем гидролиза сибиреязвенных бацилл. Антраксин используется для диагностики у больных сибирской язвы, для определения состояния аллергии у иммунизированных людей и у перенесших эту инфекцию. Аллергическая проба положительна уже в первые дни заболевания.

6. Дизентерии — является белковой фракцией двух возбудителей дизентерии шигелл Флекснера и Зонне и используется в качестве дополнительного средства диагностики при подозрении на дизентерийную этиологию желудочно-кишечного заболевания у людей всех возрастов.

7. Бактериальные аллергены из таких микроорганизмов как стафилококки, стрептококки, пневмококки, нейссерии катаральные, эшерихии, энтерококки, протеи, ложнодифтерийные палочки получают в виде очищенных термостабильных фракций фильтратов 5—6-суточной бульонной культуры (метод Андо-Вержиковского) или в виде нативных препаратов — инаktivированной взвеси бактерий, содержащей и продукты метаболизма. Очищенные бактериальные аллергены представляют собой извлеченные из микроорганизмов белки (до 83%) с небольшой примесью Сахаров и нуклеиновых кислот. Препараты предназначены для выявления повышенной чувствительности организма к микроорганизмам, из которых они получены.

Бактериальные экзотоксины (дифтерийный и скарлатинозный) применяются для определения антитоксического иммунитета к дифтерии в реакции Шика и к скарлатине в реакции Дика.

Дифтерийный токсин готовят из очищенного экзотоксина, после двухлетней выдержки, разведением в глицерино-желатиновой смеси с таким расчетом, чтобы в 0,2 мл содержалось 1/40 Dlm для морской свинки. Токсин вводят в дозе 0,2 мл строго внутрикожно в среднюю часть ладонной

поверхности предплечья. При положительной реакции на токсин (т. е. при отсутствии антитоксического иммунитета у обследуемого), учитываемой через 72—96 часов, на месте введения появляется инфильтрат и эритема от 15 до 30 мм. Следовательно, необходимо дополнительное вакцинирование против дифтерии. Детям с отрицательной реакцией Шика (при отсутствии местных изменений вследствие нейтрализации антитоксинами введенного токсина) дополнительных прививок не проводят. Скарлатинозный токсин (эритрогенный) — термостабильный нуклеопротеид стрептококка, консервированный фенолом (0,2%) или мертиолатом (в разведении 1:10000). Скарлатинозный токсин дозируется в так называемых кожных дозах, причем за одну кожную дозу принимается такое количество токсина, которое при внутрикожном введении кролику вызывает воспаление (15—20 мм). Для определения напряженности иммунитета против скарлатины детям строго внутрикожно вводят скарлатинозный токсин в дозе 0,1 мл (одну кожную дозу для кролика). Учет реакции проводят через 18—24 часа. Положительной реакцией, свидетельствующей об отсутствии иммунитета к скарлатине, считается образование в месте введения эритемы, размером от 20—30 мм и более при резко положительной реакции.

V. БАКТЕРИОФАГИ

Препараты бактериофагов применяют для лечения и профилактики инфекционных болезней, а также для определения фагочувствительности и фаготипирования при индикации микроорганизмов. Действие фагов основано на их строгой специфичности.

Активный препарат фага представляет собой фильтрат бактериальной культуры, зараженной соответствующим фагом.

Лечебно-профилактическое действие фагов обусловливается литической активностью самого фага, а также иммунизирующим действием находящихся в фаголизатах компонентов (антигенов) разрушенных микробных клеток, особенно при дополнительном и неоднократном применении.

При получении препаратов-бактериофагов используют проверенные производственные штаммы фагов и соответственно типичные культуры микроорганизмов. Выращенную в жидкой питательной среде бактериальную культуру заражают маточной взвесью фага. Лизированную фагом культуру фильтруют через бактериальные фильтры и к фильтрату, содержащему фаг, в качестве консерванта добавляют раствор хинозола.

Готовый препарат фага представляет собой прозрачную жидкость желтоватого цвета, для более длительного хранения некоторые фаги выпускаются в сухом виде (в таблетках). При лечении и профилактике кишечных инфекций жидкие бактериофаги применяют одновременно с содовым раствором, так как кислое содержимое желудка разрушает фаг, таблетки же покрыты кислотоустойчивой оболочкой. Сохраняется бактериофаг в организме недолго 5—7 дней, поэтому рекомендуется применять повторно.

В настоящее время в Советском Союзе выпускаются следующие

препараты, используемые для лечения и профилактики:

1. Поливалентный брюшнотифозный сухой бактериофаг представляет собой фильтрат фаголизата брюшнотифозных бактерий, содержащих Vi — антигены, чувствительных к наиболее распространенным фаготипам (А, С, Д, Е и F) бактерий брюшного тифа. Препарат применяется при массовой профилактике брюшного тифа, а также при противоэпидемических мероприятиях в очагах брюшного тифа. Бактериофаг выпускается в таблетках, покрытых кислото-устойчивой оболочкой (для предупреждения растворения в желудке) и применяется *per os* по одной таблетке в течение 3—7 дней в зависимости от эпидемической обстановки.

2. Поливалентный сальмонеллезный жидкий бактериофаг групп А, В, С, Д, Е — получен из смеси фаголизатов нескольких типов, наиболее распространенных сальмонелл (из серологических групп А, В, С, Д, Е). Бактериофаг применяют для лечения больных сальмонеллезами, для санации реконвалес-центов и носителей сальмонелл, по эпидемическим показаниям и с целью профилактики.

3. Поливалентный дизентерийный бактериофаг (сухой и жидкий) является смесью фильтратов фаголизатов шигелл Зонне, Флекснера. Бактериофаг применяют с профилактической целью в сезон подъема заболеваемости (в детских учреждениях и среди работников пищевой промышленности) и в очагах заболевания по эпидемическим показаниям. Фагирование проводят 1 раз в 3 дня (по одной таблетке). Для лечения дизентерийный бактериофаг применяют с первого дня заболевания по определенной схеме назначений.

4. Бактериофаг коли жидкий представляет собой фильтрат фаголизатов, наиболее часто выделяющихся энтеропатогенных эшерихий. Коли-бактериофаг рекомендуется для лечения больных с заболеваниями внутренних органов, вызванных эшерихиями, с поражениями кожи (фурункулы, абсцессы, гнойные осложнения при хирургических операциях и т. п.), но только после определения чувствительности к фагу выделенной от больного культуры кишечной палочки. Препарат применяется местно, подкожно и внутримышечно (непосредственно в очаг поражения и вдали от места локализации воспаления). Коли-бактериофаг используют и с целью профилактики при обработке послеоперационных ран.

5. Бактериофаг протейный состоит из смеси фаголизатов, активных в отношении некоторых видов протеев, способных вызвать воспалительный процесс.

Фаг применяют с лечебной целью (местно или введением в полость поражения) после проверки способности фага лизировать *in vitro* возбудителя, выделенного от больного.

Коли-протейный фаг жидкий представляет собой смесь фильтратов фаголизата энтеропатогенных эшерихий и протеев. Фаг применяется *per os* при лечении детей с кишечной инфекцией, вызванной энтеропатогенными эшерихиями и протеем.

6. Стафилококковый фаг — жидкий является фильтратом фаголизата

патогенных стафилококков, применяется с лечебной целью при стафилококковых поражениях кожи и подкожной клетчатки наружно, а также подкожно и внутримышечно. При наличии воспаления в полостях (брюшной, плевральной, суставной и т. д.) фаг вводят непосредственно в очаг поражения. Стафилококковый фаг используют и с профилактической целью для орошения послеоперационных и свежееинфицированных ран.

7. Стрептококковый фаг жидкий получен из фаголизата патогенных для человека стрептококков различных серологических типов. Фаг применяют для лечения и профилактики заболеваний, вызванных стрептококками. Препарат применяется наружно, а также подкожно, внутримышечно.

Диагностические бактериофаги широко применяются для идентификации бактерий, выделенных от больного или из инфицированных объектов внешней среды. С помощью бактериофагов, в силу их высокой специфичности, можно определить виды бактерий и с большей точностью отдельные типы выделенных бактерий.

В настоящее время наиболее разработана фагодиагностика и фаготипирование в отношении бактерий рода *Salmonella*, *Vibrio* и патогенных стафилококков. Фаготипирование помогает устанавливать или исключать источник инфекции, изучать эпидемические связи, отличать спорадические случаи заболевания от эпидемических.

В основе фагодиагностики и фаготипирования лежит принцип совместного культивирования выделенного микроорганизма с соответствующими видовыми или типовыми фагами. Положительным результатом считается наличие хорошо выраженного лизиса исследуемой культуры с видовым, а затем с одним из типовых фагов.

VI. ПРОЧИЕ ПРЕПАРАТЫ

Бактерийные препараты из живых бактерий — симбиотической микрофлоры кишечника человека (таких как бифидобактерии, кишечная палочка, лактобактерии) — получили широкое применение для восстановления нормального биоценоза после длительного лечения антибиотиками, при кишечных дисфункциях (особенно у детей), при аллергических состояниях и т. д. Наряду с антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий кишечника существенной является роль этих препаратов в витаминнообразовании, а также ферментативные и иммунизирующие свойства.

Большим преимуществом препаратов является их физиологичность и поэтому полная безвредность для организма взрослых и детей.

В настоящее время выпускаются следующие препараты: бифидумбактерин, колибактерин, бификол, лактобактерии.

Бифидумбактерин

Бифидумбактерин — препарат, содержащий живые *Bifidum-bacterium bifidum* в высушенном виде (штамм 1). Применение бифидумбактерина необходимо при дефиците бактерии би-фидум, который наблюдается при хронических формах дизентерии, колитах, при дисбактериозах, развивающихся как результат длительной антибиотикотерапии. Препарат

рекомендуется также для санации реконвалесцентов после перенесенной дизентерии.

Бактерии бифидум, как основной представитель анаэробной нормальной микрофлоры, играют значительную роль в функции кишечника. Эти бактерии оказывают угнетающее действие на гнилостную флору, обладают антагонистическими свойствами в отношении патогенных представителей семейства *Enterobacteriaceae*, участвуют в пищеварении и синтезе витаминов (в частности, витаминов группы В). Они создают в кишечнике кислую среду, способствующую всасыванию кальция, железа, витамина Д. Особенно этот препарат необходим при лечении детей с кишечными нарушениями.

Колибактерин

Колибактерин содержит живые кишечные палочки штамма М-17, антагонистически активные в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов (особенно в отношении шигелл Флекснера и Зонне). Препарат выпускают в жидком виде и таблетках. Колибактерин применяют при хронических колитах, дисбактериозах, санации реконвалесцентов, профилактике дизентерии и других кишечных заболеваний инфекционной природы. Колибактерин применяется per os от 4 до 10 доз в сутки (доза — 1 мл жидкого препарата или 1 таблетка) в зависимости от возраста, тяжести и продолжительности кишечного процесса.

Бификол

Бификол сочетает в себе оба препарата (бифидумбактерин и колибактерин), являясь комплексным биологическим соединением из бактерий анаэробной (*B. bifidum*, штамм 1) и аэробной (*E. coli*, штамм М-17) флоры кишечника человека. Бификол обладает высокой терапевтической и saniрующей эффективностью.

Показания к применению препарата те же, что и бифидумбактерина и колибактерина.

Лактобактерин

Лактобактерин представляет собой лиофилизированную культуру молочнокислых бактерий (штаммов *Lactobacterium fermenti* и *Lactobacterium plantarum*). Эти микроорганизмы обладают антагонистическими свойствами в отношении энтеропа-тогенных эшерихий, шигелл, протеев, гемолитических стафилококков и некоторых других микроорганизмов. Отличительным признаком является его устойчивость к антибиотикам широкого спектра действия, что дает возможность применять лактобактерин параллельно с антибиотикотерапией.

Антифагин (стафилококковый)

Антифагин является препаратом, который обладает способностью стимулировать естественные защитные силы организма, особенно эффективность фагоцитоза.

Стафилококковый антифагин представляет собой термостабильный стафилококковый антиген, получаемый из 10—12 штаммов патогенных стафилококков (выделенных от больных) путем прогревания взвеси культур

при 100°C в течение 1 часа и последующего фильтрования через бактериальные фильтры.

Стафилококковый антифагин назначают взрослым и детям при различных гнойничковых поражениях кожи: фурункулез, карбункулы, гидрадениты и т. п. Вводится препарат подкожно в течение 5—6 дней по определенной схеме.

Антифагин предназначен для специфической иммунотерапии при хронических процессах, так как он усиливает фагоцитарную активность лейкоцитов, способствуя более быстрому поглощению стафилококков и их разрушению в лейкоцитах, а также увеличению общего числа лейкоцитов и нарастанию титра агглютининов.

Интерферон

Человеческий лейкоцитарный интерферон — видоспецифический белок, продуцируемый клетками культуры тканей из лейкоцитов донорской крови под воздействием вируса — интерфероногена. В качестве интерфероногена может быть взят любой вирус, не обладающий токсичностью и вирулентностью. Интерферон обладает широким антивирусным спектром, то есть практически действует на все вирусы. Ему присуща высокая видовая специфичность: интерферон, полученный на клетках культуры ткани человека, способен оказывать действие только в организме человека. Изучение механизма действия интерферона показало, что в клетках, подвергшихся действию препарата, нарушается процесс трансляции вирусных информационных РНК в клетках, что приводит к подавлению образования полисом и отсутствию синтеза белков.

Интерферон предназначен для профилактики и лечения гриппа и других вирусных респираторных заболеваний. Применяется путем распыления или закапывания водного раствора в каждый носовой ход 2 раза в сутки при профилактике и не менее 5 раз в сутки — при лечении.

Комплемент

Комплемент представляет собой сыворотку морской свинки, в которой наиболее интенсивно выражена комплементарная функция.

В настоящее время выпускается сухой комплемент, перед употреблением растворяемый в изотоническом растворе хлорида натрия. Комплемент применяется в реакции связывания комплемента (РСК) и в реакции бактериолиза.

Перед постановкой каждого опыта проводят титрование комплемента и определяют его рабочую дозу. Титром комплемента является то его наименьшее количество, которое вызывает гемолиз 3%-ной взвеси эритроцитов барана в присутствии гемолитической сыворотки (в тройном титре) в течение 30 минут при 37°C. В реакции связывания комплемента применяют рабочую дозу комплемента, увеличенную в сравнении с титром на 20—25%. Практически в качестве рабочей дозы берется то количество комплемента, которое находится во второй (Пробирке, в которой произошел гемолиз.