

МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА УКРАЇНИ

ПОЛТАВСЬКА ДЕРЖАВНА АГРАРНА АКАДЕМІЯ

**ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
КАФЕДРА ПАТОЛОГІЧНОЇ АНАТОМІЇ ТА ПАТОФІЗІОЛОГІЇ**

БІОЦЕНОЛОГІЯ

РОБОЧИЙ ЗОШИТ

до лабораторних занять

**для студентів за напрямом підготовки – 6.110101 «Ветеринарна медицина»
освітньо-кваліфікаційного рівня – «Бакалавр»**

Студента ___ курсу ___ групи

(ПІБ)

Викладач _____

(посада, прізвище)

Полтава 2012

УДК 619:616.018

Укладач:

Панікар І.І., кандидат ветеринарних наук, доцент

Рецензент:

Замазій А.А., доктор ветеринарних наук, доцент

Робочий зошит для лабораторних занять з курсу «Біоценологія та ензоотичні хвороби».

Призначення: для лабораторних занять студентів факультету ветеринарної медицини.

Полтавська державна аграрна академія. Напрямок підготовки 6.110101 – «Ветеринарна медицина», ОКР – «Бакалавр».

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри патологічної анатомії та патофізіології,

(протокол № ... від 20... року.)

Робочий зошит рекомендовано до використання в навчальному процесі на засіданні ради факультету ветеринарної медицини,

(протокол № ... від 20... року.)

© кафедра патологічної анатомії та патофізіології

Техніка безпеки і правила особистого захисту при роботі з інфікованими тваринами та патологічним матеріалом

Мета заняття: ознайомитися з призначенням і задачами, а також правилами роботи у діагностичній лабораторії, обладнанням, інструментами і матеріалами, які використовуються в лабораторії.

Методичні рекомендації:

Основна задача імунологічної лабораторії – проведення імунологічних та інших досліджень в залежності від специфіки лабораторії.

Лабораторію необхідно розміщувати в окремому приміщенні. Необхідною умовою є дотримання чистоти, так як забруднення може стати причиною хибних результатів, сприяти розповсюдженню збудників хвороб.

До складу лабораторії входять приміщення для імунохімічних та біохімічних досліджень, серологічних досліджень, мікробіологічних досліджень, термостатування, центрифугування, автоклавування, зберігання матеріалів, мийки посуду, препаратознавська, віварій.

Правила роботи в лабораторії:

1. Працювати в лабораторії тільки в спецодязі.
2. В приміщенні лабораторії заборонено їсти та палити.
3. Після роботи в лабораторії необхідно вимити руки (при необхідності обробляти дезінфікуючим розчином).
4. Робоче місце тримати в чистоті і по закінченні роботи приводити в порядок.
5. Обережно ставитися до приладів та обладнання, економно витрачати реактиви і матеріали.
6. Використаний посуд знезаражувати дезінфікуючим розчином.

Для імунологічних дослідів використовують лабораторних тварин, враховуючи їх вид і лінію, генетичні та анатомічні особливості, а також задачі досліджень.

Чистолінійними (лінійними, інбредними) тваринами вважають таких, котрі отримані в результаті близькоспорідненого схрещування (інбридингу) протягом 20 і більше поколінь. Гомозиготність (генетична однорідність) таких тварин сягає 100%. Для них характерна знижена життєздатність, висока сприйнятливність до інфекційних хвороб, факторів зовнішнього середовища. Тому вони потребують особливих умов утримання.

До генетично контрольованих тварин відносяться гібридні, кріогенні, миші-мутанти та інші тварини.

Безпородні тварини з невідомим генотипом призначені для експериментів, які не потребують генетично однорідних або генетично контрольованих тварин.

Правила відбору та зараження тварин будуть вивчені в курсах ветеринарної мікробіології і вірусології.

У імунологічній лабораторії досліджують імунологічний статус людини. Ці методи можна об'єднати в кілька груп:

- Оцінка системи фагоцитів (нейтрофілів):
- Оцінка показників системи комплементу:
- Оцінка Т-клітинної системи імунітету (клітинного імунітету):
- Оцінка В-клітинної системи імунітету (гуморального імунітету):

На сучасному етапі ветеринарних імунологічних лабораторій поки немає. Окремі дослідження проводять в обласних та науково-дослідних лабораторіях. На сучасному етапі ветеринарних імунологічних лабораторій поки немає.

Контрольні питання:

1. Основні функції (завдання) імунологічної лабораторії?
2. Які приміщення входять до складу лабораторії?
3. Якими приладами та обладнанням повинна бути оснащена імунологічна лабораторія?
4. Який посуд використовують в лабораторії і як її обробляють?
5. Яких тварин використовують для імунологічних досліджень?
6. Що таке генетично контрольована тварина?

Самостійна робота: вивчити основні етапи історії імунології, в т.ч. вчених лауреатів Нобелівської премії з імунології.

Робота прийнята « » __ 201 _ р. Підпис викладача.

Епізоотичний процес та основні закономірності його розвитку

Мета заняття: ознайомитися і вивчити гістологічні та імунологічні методи дослідження імунокомпетентних клітин.

Методичні рекомендації

Імунна система представлена лімфоїдною тканиною, розосередженою по всьому організму у вигляді різних лімфоїдних утворень або окремих органів.

Препарат 1. Мазок крові великої рогатої худоби.

Моноцити - найбільші з лімфоцитів, вони не мають гранул; їх 6-8% від числа лімфоцитів. Ядро велике, світле, бобовидної форми, цитоплазма базофільна.

Нейтрофіли (нейтрофільні гранулоцити) - найчисленніші клітини (65-75% від числа всіх лейкоцитів). Найбільш зрілі нейтрофіли - це сегментоядерні (Сянг), їх 60-65%, молодші - паличкоядерних (ПЯНГ; юні нейтрофільні гранулоцити (метаміелоцитів) складають 0,5% загальної кількості лейкоцитів.

Еозинофіли (еозинофільні гранулоцити) - в крові їх 2-5% від загального числа лейкоцитів, а в тканинах - у 100-300 разів більше. Вони фагоцитують мікроорганізми, нефагоцитарні механізмами знищують простіших та гельмінтів; обмежують область алергічної реакції і нейтралізують метаболіти запалення.

Базофіли (базофільні гранулоцити) - найменша група (0,5-1% від загального числа лейкоцитів); виконують регуляторну функцію завдяки виділенню медіаторів запалення і хемотаксичних факторів.

Лейкоцитарна формула - це диференційний підрахунок відносного вмісту лейкоцитів окремих видів. Його виконують при проведенні клінічного аналізу крові. Для цього готують мазок, підсушують його, фарбують (найчастіше за Романовським) та підраховують 100 лейкоцитів, враховуючи окремо базофіли (Б), еозинофіли (Е), нейтрофіли трьох або чотирьох видів (міелоцити, юні, паличкоядерних, сегментоядерні), лімфоцити (Л), моноцити (М).

Лейкоцити в мазку розподіляються нерівномірно: нейтрофіли, базофіли і еозинофіли - по периферії мазка, моноцити і лімфоцити - ближче до середини. Для більш швидкого підрахунку застосовують 11-клавішний лічильник (лічильник Адамса).

Лейкоцитарна формула різних тварин и людини

Людина, вид тварин	Б	Е	Нейтрофіли			Л	М
			Ю	П	С		
Людина	0,5-1	2-5	0,5	3-5	60-65	20-35	6-8
ВРХ	0-2,0	3-20	0-1,0	2-5	20-35	40-75	2-7
Кінь	0-1	2-6	0-0,5	3-6	45-62	25-44	2-4
Вівця	0,3-0,8	4-12	0-2	3-6	35-45	40-50	2-5
Собака	0-1	2,5-9,5	-	1-6	43-71	21-40	1-5
Свиня	0-1	1-4	0-2	2-4	40-48	40-50	2-6

Препарат 2. Лімфатичний вузол складається з коркової та мозкової речовини, зверху покритий капсулою. Коркова речовина утворена округлими лімфатичними фолікулами, що представляють скупчення лімфоцитів. Мозкова і кіркова речовини - це В-залежна зона лімфовузла. Між ними розташована паракортикальна зона - Т-залежна.

Препарат 3. Тимус. В препараті видно часточкову структуру органу. У часточках розрізняють коркову і мозкову речовину, які містять велику кількість дозріваючих Т-лімфоцитів.

Препарат 4. Селезінка. На червоному тлі препарату видно фіолетові скупчення лімфоцитів - лімфатичні фолікули селезінки. Між фолікулами розташована червона пульпа селезінки.

Завдання для самостійної роботи:

- 1) мікроскопіювати гістологічні зрізи різних органів і тканин, знайти в них лімфоїдні клітини і замалювати їх.

Контрольні питання:

1. Функції центральних и периферичних органів імунної системи тварин и людини.
2. Роль лімфоїдних клітин в організмі тварин.
3. Лейкоцитарна формула: поняття и методи визначення.
4. Різновиди лейкоцитів, їх роль в імунних реакціях.
5. Морфологія органів и тканин імунної системи.

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

ВИВЧЕННЯ ФАКТОРІВ ПРИРОДНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ НА ПРИКЛАДІ АКТИВНОСТІ ЛІЗОЦИМУ

Мета заняття: вивчити методи оцінки активності лізоциму

Методичні рекомендації

З імунітетом пов'язане поняття резистентності (стійкості, опірності). Під резистентністю розуміють всі неспецифічні фактори захисту організму в цілому від різних впливів, що не пов'язані з конкретною чужорідною речовиною. Всі ці фактори являють собою першу лінію захисту проти збудників інфекційних захворювань. До факторів природної резистентності відносяться фізичні чинники (шкіра та слизові оболонки), клітинні (неспецифічний фагоцитоз) і гуморальні (лізоцим, комплемент, інтерферон, наявність органічних і неорганічних кислот і т.д. .).

Кількісне визначення лізоциму в сироватці крові. Лізоцим - гідролітичний фермент, що розщеплює полісахариди (пептидоглікан) оболонок багатьох бактерій. Він міститься в білку яєць, у всіх секретах і екскретах організму (крім поту і сечі). Присутність і активність лізоциму визначають за його здатності викликати лізис бактерій. Найчастіше для цього використовують бактерії (*Micrococcus lysodeicticus*) як тест-культури так як цей мікроорганізм має високу чутливість до лізоциму. Готують 1%- ний агаровий гель на фосфатно-сольовому буферному розчині (ФСБР). У розплавлений агар вносять порошок біомаси *Micrococcus lysodeicticus* з розрахунку 10 мг на 100 мл гелю. Компоненти перемішують і розливають у чашки Петрі товщиною 4 мм. У застиглому агарі роблять лунки діаметром 5 мм. Кристалізований лізоцим з яєчного білка дворазово послідовно розводять у ФСБР від 1:2 до 1: 8 і вносять у лунки по 0,03 мл. Чашки Петрі витримують 48 годин у вологій камері при 37^oC і вимірюють діаметр зони лізису бактерії навколо лунок. За отриманими даними будують калібрувальну криву, відкладаючи на осях координат значення концентрації лізоциму і діаметр зони лізису. При визначенні лізоциму в сироватці крові роблять теж саме, але сироватку розводять 1:5. Вимірявши діаметр зони лізису, по калібрувальній кривій обчислюють вміст лізоциму в досліджуваній пробі сироватки крові.

Завдання для самостійної роботи:

1) визначити кількість лізоциму в сироватці крові морської свинки або білку курячого яйця.

Контрольні питання:

1. Роль лізоциму і комплементу в неспецифічній резистентності організму тварин і людини.
2. Методи визначення кількості лізоциму в білку яйця або сироватці крові.

ВИВЧЕННЯ ФАГОЦИТАРНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН

Мета заняття: ознайомитися і вивчити гістологічні та імунологічні методи дослідження імунокомпетентних клітин.

Фагоцити

Макрофаги - довгоживучі клітини, формують в органах і тканинах систему мононуклеарних фагоцитів (раніше називалася РЕС). Утворюються з промоноцитів кісткового мозку, в крові циркулюють як моноцити, а потім осідають в тканинах у вигляді макрофагів, які в окремих органах отримали різні найменування. Поліморфно-ядерні лейкоцити (гранулоцити, ПЯЛ) - це мікрофаги, мають дольчасте ядро і безліч дрібних цитоплазматичних гранул. З фарбування гранул виділяють три типи клітин:

- Нейтрофіли (нейтрофільні гранулоцити) - найчисленніші клітини (65-75% від числа всіх лейкоцитів). Зниження їх числа до 500 клітин / мкл (нейтропенія) спостерігається при пригніченні кісткового мозку внаслідок аутоімунного, токсичного, променевого або інфекційного ураження; нейтрофілія спостерігається при запаленні інфекційного характеру (поєднується з лейкоцитозом).

- Еозинофіли (еозинофільні гранулоцити) - в крові їх 2 - 5% від загального числа лейкоцитів, а в тканинах - у 100-300 разів більше, куди вони залучаються лімфокінами, пухлинними і тучними клітинами, базофілами і продуктами, які виділяються паразитами. Вони знищують найпростіших і гельмінтів.

- Базофіли (базофільні гранулоцити) - найменша група (0,5-1% від загального числа лейкоцитів); виконують регуляторну функцію завдяки виділенню медіаторів запалення і хемотаксичних факторів; базофілія спостерігається при ГНТ і ГЗТ, після опромінення, при гіпотиреозі, базопенія - при інфекціях, пухлинах, тиреотоксикозі. Оцінка активності фагоцитуючих клітин периферичної крові

Фагоцитарний показник - це відсоток фагоцитуючих клітин від загального числа нейтрофільних лейкоцитів.

Його визначають так: кров стабілізують цитратом натрію, вносять до неї суспензію вбитих бактерій, витримують суміш при +370°С 30 хвилин, центрифугують її 15-20 хвилин (утворюється три шари: верхній прозорий - плазма крові, середній сіруватий - лімфоцити і нижній щільний червоний - еритроцити), піпеткою відсмоктують плазму крові, з середнього сіруватого шару лейкоцитів роблять 3-5 мазків, забарвлюють за Романовським-Гімзою, мікроскопують, підраховують не менше 100 нейтрофільних лейкоцитів і визначають серед них % фагоцитуючих. фагоцитарне число - це середня кількість мікробних клітин, поглинених одним лейкоцитів. Цей показник доповнює фагоцитарний показник, так як підраховують не тільки кількість фагоцитуючих клітин, але й кількість поглинених ними бактерій, а потім визначають середнє число фагоцитованих бактеріальних клітин. Визначення опсонофагоцитарного індексу - це порівняння активності фагоцитів в нормальній та імунної сироватці, він дозволяє оцінити дію антитіл опсоніном. Для визначення цього показника порівнюють активність фагоцитів в нормальній і досліджуваній сироватці. Пастерівською піпеткою набирають на висоту капіляра близько 2 см спочатку

суспензію бактеріальних клітин ($0,5 \times 10^9$ млн), потім лейкоцитів і, нарешті, досліджувану сироватку. На предметному склі компоненти перемішують за допомогою піпетки, потім знову набирають у капіляр, кінець якого запаюють. Капіляр поміщають у термостат при $+37^{\circ}\text{C}$ на 30 хвилин. Після інкубування суміш виливають на предметне скло, готують мазок і забарвлюють його метиленовим синім. Аналогічним чином готують препарат з нормальною (контрольною) сироваткою.

Обидва препарати мікроскопують, переглядаючи 100 нейтрофільних лейкоцитів, визначають кількість фагоцитованих бактерій, розраховують фагоцитарне число в кожній сироватці і потім опсонофагоцитарний індекс досліджуваної сироватки. Наприклад: 100 нейтрофілів нормальної сироватки фагоцитувати 200 бактерій (фагоцитарне число $200:100 = 2$), а 100 нейтрофілів досліджуваної - 500 (фагоцитарний індекс $500:100 = 5$). Опсонофагоцитарний індекс дорівнює $5:2 = 2,5$. це означає, у скільки разів інтенсивніше йде фагоцитоз в імунній сироватці, ніж у неімунній.

Завдання для самостійної роботи: вивчити фагоцитарну активність периферичної крові курки, миші або морської свинки.

Контрольні питання:

1. Різноманітність фагоцитуючих клітин, макрофаги і мікрофаги.
2. Методи визначення фагоцитарної активності периферичної крові тварин.

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

**РЕАКЦІЯ РОЗЕТКОУТВОРЕННЯ. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ Т-ЛИМФОЦИТІВ.
ПІДСУМКОВЕ ЗАНЯТТЯ (МОДУЛЬ №1)**

Мета заняття: Визначити кількість лімфоцитів в крові; визначити кількість Т-лімфоцитів в периферичній крові людини методом спонтанного розеткоутворення; визначити кількість В-лімфоцитів у периферичній крові методом ЕАС-розеткоутворення.

Методичні рекомендації

Клітини, що беруть участь в імунній відповіді (ІКК), відрізняються тільки поверхневими маркерами. Це ускладнює вивчення імунної відповіді в організмі. Тому структуру і функціональну активність ІКК доцільно вивчати в системах *in vitro*, виділивши попередньо окремі популяції лімфоцитів. Виділення лімфоцитів. Джерелом лімфоїдних клітин можуть бути органи імунної системи, лімфа і кров. Отриманню лімфоцитів з органів передують гомогенізація тканин. Кров більш придатна для виділення лімфоцитів: доступна в достатній кількості і легко піддається обробці. У крові і суспензіях клітин органів імунітету знаходиться велика кількість еритроцитів. Їх можна видалити відстоюванням, яке прискорюють центрифугуванням. Еритроцити осідають швидше, а при додаванні деяких речовин (декстрану, желатину, полівінілпіролідону) їх осадження прискорюється. При центрифугуванні кров розділяється на три шари: верхній - плазма, середній - безбарвний містить лейкоцити, нижній - червоний містить еритроцити. Головними вимогами до препаратів лімфоцитів є збереження життєздатності клітин і стерильність. Суспензії лімфоцитів в процесі отримання зберігають на крижаній бані, але не більше 1 години. Пізніше готові суспензії зберігаються в культуральному середовищі 24-48 годин при +4°C або клітини заморожують. Найчастіше Т- і В-лімфоцити ідентифікують за допомогою методів, в основу яких покладено наявність відмінних маркерів на їх поверхні. Методи клітинної імунології застосовуються в клініці з діагностичною метою, для підбору пар донор-реципієнт, діагностики криз відторгнення при трансплантації, для оцінки імунного статусу при патологічних станах, отримання лікувальних препаратів.

Метод розеткоутворення.

Розеткоутворення - це процес взаємодії лімфоцитів і ксеногенних (чужорідних) еритроцитів з утворенням клітинних конгломератів, які складаються з лімфоцита і приєднаних до нього чужорідних еритроцитів. За зовнішнім виглядом освічені конгломерати нагадують розетки, тому лімфоцити називають розеткоутворюючими клітинами (РОК). Еритроцити можуть розташовуватися на одному з полюсів лімфоцита (полярні розетки), оточувати його у вигляді розірваного або повного віночка, повністю покривати клітину (розетки у формі морули), іноді навіть у кілька шарів. Розетки, утворені інтактними еритроцитами (без попередньої імунізації), називають спонтанними. Таке розеткоутворення спостерігається між еритроцитами і лімфоцитами певних видів тварин. Т-лімфоцити морської свинки формують розетки з еритроцитами

кролика, Т-лімфоцити людини - з еритроцитами барана. Освіта розеток з еритроцитами барана називається Е-розеткоутворення (E-erythrocyte) і служить для виявлення Т-клітин людини (їх позначають Е-РОК). Т-лімфоцити людини формують спонтанні розетки з еритроцитами миші. Оброблені специфічними антитілами або антитілами і комплементом еритроцити барана утворюють розетки, взаємодіючи з відповідними рецепторами на В-лімфоцитах, які називаються ЕА-і ЕАС-розеткоутворюючими клітинами (ЕА-РОК і ЕАС-РОК) , а тести їх виявлення - методами ЕА-і ЕАС-розеткоутворення (метод комплементарного розеткоутворення). У периферичній крові людини міститься 50-60% Е-РОК, приблизно однакову кількість (по 10-20%) ЕА-РОК і ЕАС-РОК. Близько 20-30% лімфоцитів не виявляють методом розеткоутворення, тому що на їх поверхні відсутні рецептори, властиві зрілим лімфоцитів.

Визначення кількості Т-лімфоцитів в периферичній крові людини методом спонтанного розеткоутворення (Е-РОК)

Визначення кількості лімфоцитів в крові. Досліджувану кров зібрати в пробірки, що містять гепарин (100ЕД/мл крові). Процентне кількість лімфоцитів визначити, використовуючи приготований мазок після фарбування його за Романовським-Гімза (кількість лімфоцитів на 100 лейкоцитарних клітин). Визначити кількість лейкоцитів у 1 мл крові. У лейкоцитарний меланжер набрати кров до позначки 0,5 і довести 3%-ним розчином оцтової кислоти до мітки 11, отримуючи 20-кратне розведення. Суміш перемішати, заповнити камеру Горяєва, підрахувати лейкоцити в 100 великих квадратах і обчислити їх кількість в 1 мл, помноживши отримане число на 50. Визначити кількість лімфоцитів в 1 мл крові: помножити кількість лейкоцитів в 1 мл крові на процентне співвідношення лімфоцитів в мазку крові і розділити на 100. Виділення лімфоцитів з крові. Кров з гепарином (2мл) розвести 1:2 середовищем 199, обережно нашарувати пастерівською піпеткою з тонко відтягнутим капіляром на розділяє розчин (2 мл фіколла або уротраст) у центрифужній пробірці (пробірку тримати під кутом 450) і відразу ж центрифугувати. При 1500 об / хв протягом 25 хвилин. Пастерівською піпеткою зняти плазму разом з дифузним мутнувтим шаром тромбоцитів, а потім відсмоктати мононуклеарні клітини (білуватий шар над розділяє розчином). Перенести клітини в центрифужну пробірку і двічі відмити в 5-10-кратному обсязі середовища 199, центрифугуючи при 1500 об / хв по 10 хвилин. Осад ресуспендували в 1 мл середовища 199, підрахувати кількість життєздатних клітин в камері Горяєва при фарбуванні трипановим синім і довести кількість клітин в суспензії до 3×10^6 на 1 мл середовища. Приготування суспензії еритроцитів. Дефібринованої кров барана (2 мл) тричі відмити середовищем 199, центрифугуючи при 1500-2000 об / хв. по 5 хвилин. З відмитих еритроцитів приготувати 0,5%-у суспензію в середовищі 199: до 0,5 мл осаду еритроцитів додати 4,5 мл середовища, ретельно перемішати і 5 мл 1%-ної суспензії розбавити 5 мл середовища.

Постановка реакції. У центрифужній пробірці змішати рівні об'єми (по 0,5 мл) суспензій лімфоцитів та еритроцитів. Інкубувати суміш при +370 С 10-15 хвилин, центрифугувати при 1000 об / хв. Протягом 1 хвилини і, не струшуючи, помістити пробірки в холодильник при +40 С на 1-2 години (або залишити на ніч).

Облік результатів реакції і приготування нативних препаратів. Ресуспендували осад обережним обертанням пробірки між долонями. Потім, уникаючи піпетування, внести краплю в камеру Горяєва, підрахувати під мікроскопом 100-200 лімфоцитів, що приєднали і не

приєдналися еритроцити, приймаючи за Е-РОК лімфоцит з трьома або більше приєднаними еритроцитами. Абсолютна кількість Е-РОК в 1мл розрахувати за формулою:

$$x = L a / 100,$$

де x – абсолютна кількість Е-РОК, L – кількість лімфоцитів в 1 мл крові, а - відносна кількість Е-РОК.

Приготування забарвлених препаратів. Залишок клітинної суспензії (після підрахунку клітин в камері Горяєва) вилити на знежирене предметне скло і висушити при кімнатній температурі. Мазок забарвити по Папергейму-Крюкову: на нефіксований мазок завдати 10-15 крапель фарби-фіксатора Мая-Грюнвальда, через 3 хвилини додати ще 10-15 крапель нейтральної дистильованої води, через 1 хвилину змити барвник водою і висушити мазок на повітрі. На мазок налити свіжоприготований розчин барвника Романовського-Гімза на 10-15 хвилин, змити фарбу водою і висушити. У пофарбованих препаратах еритроцити рожеві, лімфоцити - фіолетові.

Робота прийнята « » __ 201 __ р.

Підпис викладача.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ ДО МОДУЛЮ 1

1. Імунологія та її завдання.
2. Етапи розвитку імунології.
3. Основні завдання імунології.
4. Сутність імунітету.
5. Види імунітету
6. Структурна організація імунної системи
7. Центральні органи імунної системи
8. Периферичні органи імунної системи
9. Поняття про неспецифічних і специфічних чинниках імунітету.
10. Різноманітність неспецифічних факторів імунітету.
11. Роль окремих неспецифічних факторів.
12. Фагоцитоз.
13. Комплемент.
14. Взаємодія неспецифічних факторів імунітету.
15. Роль речовин і клітин в імунних реакціях.
16. Поняття про клітинних маркерах і медіатора.
17. Поняття про імунокомпетентних клітинах. Їх різновиди.
18. Поліпотентна стовбутова клітина - родоначальниця всіх клітин крові.
19. Онтогенез Т-лімфоцитів.
20. Онтогенез В-лімфоцитів.
21. Основні молекули, що беруть участь в імунній відповіді.
22. CD-маркери та їх роль у реалізації механізмів імунної відповіді.
23. Антигени головного комплексу гістосумісності (МНС, ГКГС).
24. Механізми передачі сигналів від однієї клітини до іншої.
25. Цитокіни та інші медіатори імунної відповіді.
26. Основні функції (завдання) імунологічної лабораторії?
27. Якими приладами та обладнанням повинна бути оснащена імунологічна лабораторія?
28. Яких тварин використовують для імунологічних досліджень?
29. Що таке генетично контрольоване тварина?
30. Лімфоцитарна формула: поняття та методи визначення.
31. Різновиди лейкоцитів, їх роль в імунних реакціях.
32. Методи дослідження лізоциму в біологічних рідинах.
33. Фагоцитоз: роль як неспецифічного фактора імунітету. Стадії і види фагоцитозу.
34. Методи вивчення фагоцитарної активності клітин (фагоцитарне число, фагоцитарний показник, опсонофагоцитарний індекс).

ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ В-ЛІМФОЦИТІВ У ПЕРИФЕРИЧНІЙ КРОВІ МЕТОДОМ ЕАС-РОЗЕТКОУТВОРЕННЯ

Мета заняття: Визначити кількість лімфоцитів в крові; визначити кількість В-лімфоцитів у периферичній крові методом ЕАС-розеткоутворення.

Методичні рекомендації

На першому етапі виділяють лімфоцити за методикою визначення Е-РОК і доводять їх кількість до 2×10^6 в 1мл середовища (див. попереднє заняття).

Сенсибілізація еритроцитів. З відмитих еритроцитів барана приготувати 50%-ну суспензію в середовищі 199, суспендуючи в 10 мл середовища 5 мл щільного осаду еритроцитів. Гемолітичну сироватку розвести по титру розчином хлориду натрію (0,15 моль / л). Змішати в пробірці рівні об'єми 50%-ної суспензії еритроцитів і розведеною гемолітичної сироватки. Інкубувати суміш у термостаті при $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хвилин для сенсибілізації еритроцитів. Після цього еритроцити двічі відмити середовищем 199, центрифугуючи при 1000 об / хв по 5 хвилин. Осад ресуспендували в середовищі 199 до отримання 5%-ної суспензії. Змішати рівні об'єми суспензії еритроцитів і мишачою сироватки (джерело комплементу), розведеної 1:10. інкубувати суміш при $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хвилин, потім відмити еритроцити і приготувати з них 0,5%-у суспензію в середовищі 199. Постановка реакції. У пробірці змішати 0,25 мл лімфоцитів (5×10^5 клітин) з 0,25 мл 0,5%-ної суспензії сенсибілізованих еритроцитів барана. Суміш центрифугувати при 1000 об / хв. Протягом 2 хвилин і інкубувати при $+37^{\circ}\text{C}$ у водяній бані або термостаті 30 хвилин. Облік результатів реакції. Підрахувати під мікроскопом у камері Горяєва 100-200 лімфоцитів, включаючи розеткоутворюючі. Визначити відносне, процентне та абсолютна кількість ЕАС-РОК.

Завдання для самостійної роботи: Визначити кількість Т- і В-лімфоцитів у периферичній крові людини методом Е-і ЕАС-розеткоутворення відповідно.

Контрольні питання:

1. Що таке розеткоутворення. Види розеткоутворення.
2. На чому засновані методи Е-, ЕА- і ЕАС-розеткоутворення.
3. Практичне застосування реакцій розеткоутворення.

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

РЕАКЦІЯ БЛАСТТРАНСФОРМАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ (РБТЛ)

Мета заняття: ознайомитися з методикою постановки РБТЛ, поставити реакцію і врахувати її результати.

Перехід лімфоцитів із спочиваючого стану в бластні форми, здатні до проліферації (поділу) та подальшої диференціювання, називається бласттрансформацією і супроводжується морфологічними змінами лімфоцитів: збільшенням розмірів клітин, збільшенням кількості мітохондрій, рибосом, укрупненням лізосом, скупченням їх навколо ядра. Цей процес відбувається в результаті імунної стимуляції, а утворені бластні клітини (бласти або імунобласти) надалі проліферують і диференціюються.

У ході трансформації в бласти у лімфоцитах індукуються біохімічні процеси, що призводять до інтенсифікації синтезу білка, РНК, ДНК, в результаті чого відбувається мітотичний поділ клітини. Одна із бластних клітин може дати клон з 16-32 і навіть 64 клітин, які мають такий же імунної компетентністю, як і початкова клітина. При бласттрансформації з малого лімфоцита (діаметр клітини 7-8 мкм) спочатку утворюються перехідні бластоподібні клітини, вони збільшені у порівнянні з вихідною клітиною (діаметр 14 мкм). Потім утворюються бласти - великі (діаметр 20-24 мкм, іноді до 42 мкм), округлої форми з чітко вираженими межами, ядро крупне, округле або бобовидної, розташоване в центрі клітини і займає більшу її частину.

Бласттрансформація лімфоцитів може бути викликана різними стимуляторами - мітогенами. Причому, одні з них активізують лімфоцити незалежно від їх імунологічної специфічності, а інші - тільки Т-або В-лімфоцити. На ранніх стадіях мітогенної стимуляції (через 1-2 години після контакту з мітогеном) відбуваються процеси активації лімфоцита, а через 24 години клітина приступає до мітозу. Т-клітини продукують різні лімфокіни, а В-лімфоцити - імуноглобуліни. Бласттрансформації лімфоцитів вивчають у культурі лімфоцитів *in vitro* (поза організму) за методикою, Розроблені О. новелою. В умовах культури клітин вдається спостерігати бласттрансформації і поділ лімфоцитів, отриманих тільки від імунізованих донорів. Ця реакція відображає функціональну активність імунокомпетентних клітин і свідчить про потенційну здатність імунної системи до реакціям на антигени.

Методичні рекомендації

Виділення лімфоїдних клітин крові. 1.Гепаринізовану кров (25 одиниць гепарину на 1 мл крові) змішати в пробірках з 6%- ним декстраном у співвідношенні 5:1 і помістити на 1 годину в термостат при +37⁰ С на 30 хвилин під кутом 45⁰ і 30 хвилин на вертикальному положенні. Пастерівською піпеткою зняти розташований над еритроцитами шар плазми разом з клітинами, перенести в центрифужну пробірку і двічі відмити клітини середовищем 199 центрифугуванням при 1000 хв-1 протягом 10 хвилин. Клітини ресуспендували в невеликому обсязі (2-3 мл) середовища культивування, визначити їх кількість в 1 мл суспензії в камері Горяєва, довести кількість клітин, додавши середу, до 10⁶ в 1 мл.

2. Культивування клітин. Розлити приготовлену клітинну суспензію по 1 мл в пробірки, додати в кожен по 1 мл середовища культивування та внести в дослідні пробірки стимулятори бластогенезу в мітогенних дозах (100 мкг / мл ЛПС), в контрольні проби мітоген не додавати. Культивувати клітини при +37⁰ С протягом 72 годин.

3. Облік і оцінка результатів реакції. Після культивування зняти пастерівською піпеткою надосадову рідину в кожній пробірці, осад ретельно піпетувати, додати 7 мл 10%-ний оцтової кислоти, центрифугувати при 1500 хв-1 протягом 20 хвилин. Надосадову рідину зняти, клітини ресуспендували в рештою краплі середовища, додати 5-7 крапель 96%-ного етанолу і відразу ж вилити вміст пробірки на сухе предметне скло для приготування мазка. Висушити мазок на повітрі, забарвити барвником Романовського-Гімза 30 хвилин і змити його дистильованою водою. Для обліку результатів реакції мікроскопіювати препарати. Переглянути 250 лімфоїдних клітин, підраховуючи кількість бластів, включаючи мітози, перехідних бластоподібних форм і малих лімфоцитів. Розрахувати відношення кількості трансформованих клітин (бластів і перехідних форм) до загальної кількості підрахованих в кожному мазку і визначити середні показники для дослідних і контрольних проб кожного зразка крові. Встановити кількість (%) бластів у досліджуваних зразках крові з різниці в досвіді і контролі. Замалювати лімфоцити і форми, що характеризують процес бласттрансформації лімфоцитів.

Завдання для самостійної роботи: вивчити бласттрансформації Т- і В-лімфоцитів у периферичній крові людини.

Контрольні питання:

1. У чому сутність процесу бласттрансформації лімфоцитів.
2. Морфологічні особливості бластних клітин.
3. Стимулятори бластогенезу, Т- і В-клітинні мітогени.
4. Для вирішення яких завдань використовується РБТЛ. Методи постановки та оцінки РБТЛ.

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

СИРОВАТКА КРОВІ ЯК ДЖЕРЕЛО ІМУНОГЛОБУЛІНІВ. МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ ОКРЕМИХ КЛАСІВ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

Мета заняття: вивчити техніку взяти крові у різних видів тварин, вивчити методику стабілізації крові та отримання плазми та сироватки крові

Методичні рекомендації:

Кров - особлива рідка тканина, що відноситься до тканин внутрішнього середовища, яка циркулює в судинах завдяки ритмічним скороченням серця. Жодна тканина організму не досліджується в діагностичних цілях так часто, як кров. Аналіз крові включає її цитологічне та біохімічне дослідження. Завдяки простоті одержання її проб у досліджуваних тварин і високої діагностичної цінності результатів аналіз крові отримав широке поширення в клінічній ветеринарії.

Компоненти крові - це формені елементи і плазма крові.

Плазма крові є середовищем, в якій зважені формені елементи крові. Вона містить ряд неорганічних іонів і органічних речовин, що забезпечують функції крові й зумовлюють її згортання. До складу плазми крові входить 90% води, 9% неорганічних речовин і 1% органічних речовин.

Головні органічні речовини плазми - білки (більше 200 видів).

Серед білків плазми розрізняють альбуміни, глобуліни, фібриноген і компоненти комплементу. Кількісно переважають альбуміни (їх у 1,3-2,2 рази більше, ніж глобулінів). Альбуміни переносять метаболіти, гормони, іони, підтримують осмотичний тиск крові. Глобуліни (α -і β -) переносять іони металів і ліпіди у формі ліпопротеїнів; γ -глобуліни представляють собою фракцію антитіл (імуноглобулінів). Фібриноген забезпечує згортання крові, перетворюючись на нерозчинний білок фібрин під дією тромбіну. Компоненти комплементу беруть участь в імунологічних реакціях. **Сироватка крові (serum)** - рідина, що залишається після згортання крові. За своїм складом вона подібна з плазмою, однак у ній відсутні фібриноген і фактори згортання.

Порядок фіксації тварини, обробки шкіри та взяття крові.

Перед взяттям крові тварину необхідно зафіксувати. Місце проколу шкіри вистригають або виголюють, обробляють дезінфікуючим речовиною (спирт, 5%-ний розчин йоду). Стерильною голкою проколюють шкіру і стінку посудини. Кров, що витікає з голки збирають у суху чисту пробірку. Якщо необхідно взяти невелику кількість крові, можна надрізати кінчик вуха, хвоста або гребінця. У великих тварин кров беруть частіше з лівої яремної вени на межі верхньої та середньої третини шиї. Для цього нижче підготовленого місця навколо шиї накладають гумовий джгут (або вену здавлюють великим пальцем лівої руки). Голку беруть у праву руку і швидким рухом вводять у посудину під кутом

450 проти течії крові. Після взяття крові до вилучення голки з посудини знімають джгут (або припиняють здавлювання вени пальцем). Місце проколу притримують ватою, змоченою спиртом, голку витягують, а шкіру протирають спиртом. Для взяття крові Розроблені голки-автомати. У свиней великий об'єм крові можна взяти при відрізанні кінчика хвоста стерильним скальпелем або ножицями або з вушної вени. У собак великий об'єм крові можна взяти з вени сафена. Для цього тварину кладуть на бік і фіксують. Джгут накладають в області верхньої третини гомілки, і після наповнення вени кров'ю, проколюють її голкою, набираючи кров у шприц. У кроликів і морських свинок кров беруть із серця, у птахів - з підкрильцевої (пахвової) вени.

Отримання плазми та сироватки крові

Посуд для взяття крові повинен бути чистим і сухим (стерильність необхідна тільки в окремих випадках). Для отримання плазми крові в градуйовану пробірку наливають антикоагулянт (5%-ний розчин натрію цитрату з розрахунку 1:10; 1%-ний розчину гепарину - по 2 -3 краплі на 5 мл крові). Відокремити формені елементи крові від плазми можна відстоюванням (кілька годин при кімнатній температурі) або центрифугуванням (20 хвилин при 1000-3000 об / хв). Для отримання сироватки крові кров беруть у пробірку без антикоагулянту, стерильною дротом або скляною паличкою обводять кров по стінці пробірки, після цього поміщають пробірку в термостат (+37⁰ С на 30 хвилин). Кров згортається з утворенням вишнево-червоного згустку: спочатку пухкого, а потім він ущільнюється (ретракція згустку), і з нього виходить сироватка. Щоб отримати більшу кількість сироватки, пробірки поміщають у холодильник на кілька годин. Сироватка має такий же вигляд, як і плазма - світло-жовта опалесцююча рідина. Сироватку крові можна отримати і з дефібрированої крові. Для цього свіжу кров помішують скляною паличкою для намотування на неї ниток утворюється фібрину або кров набирають у склянку зі скляними намистинами, на які при погойдуванні склянки збирається фібрин. Таку дефібрировану кров можна відстоювати чи центрифугувати. Сироватка без домішки еритроцитів у стерильних умовах може зберігатися при +4 +10⁰ С до 1 місяця. Якщо зберігати необхідно довше, сироватку заморожують і зберігають при -20-70⁰С 2-3 місяці (уникати відтавання).

Плазма і сироватка як досліджуваний матеріал і діагностикум

Плазму крові частіше використовують для біохімічних досліджень, сироватку - в основному для імунологічних. Імунологічні Дослідження спрямовані на виявлення феноменів (зовнішніх видимих проявів) реакцій між антигенами і антитілами. Це означає, що якщо в компонентах реакції є антигени і специфічні антитіла до них, то повинна відбутися імунологічна реакція між антигеном і антитілами, в результаті якої з'являться видимі зміни (випадання осаду, лізис клітин, утворення смуг в середовищі для постановки реакції). У більшості реакцій, що застосовуються в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб, обов'язково беруть участь два компоненти - сироватка крові (рідко цільна кров) і інший матеріал. Причому, сироватка крові використовується як субстрат, що містить антитіла, а інший матеріал як субстрат, що містить антиген. Іноді використовують і інші компоненти, що полегшують облік реакції або прискорюють її постановку. Всі реакції, в ході яких використовують сироватку крові або цільну кров, називаються серологічними реакціями. Той матеріал, в якому встановлюють наявність

якого-небудь компонента, називається досліджуваним матеріалом, а той, в якому є відомий компонент, - діагностикумом. Якщо необхідно встановити, чи був контакт організму з конкретним збудником, то в цьому випадку сироватка крові буде досліджуваним матеріалом, так як у неї в ході лабораторного Дослідження будуть виявляти специфічні імуноглобуліни. Якщо тварина спеціально інфікувати певним ослабленим або убитим збудником, то в його крові з'являться специфічні антитіла до цього збудника. Використовуючи сироватку крові такої тварини, можна виявити збудники в будь-якому досліджуваному матеріалі (тканини або органи хворої тварини, вирощена культура мікроорганізмів і т.д.). У цьому випадку сироватка крові буде виступати в ролі діагностикуму.

Методика осадження гемоглобулінової фракції білків сироватки крові

Сироватку або плазму крові (10 мл, рН 7,0) внести градуйованою піпеткою в склянку (50 мл) невеликими порціями, постійно перемішуючи склянкою паличкою або магнітною мішалкою. Додати до зразка 10 мл насиченого розчину (100%) сульфату амонію (рН 6,8-7,0), ретельно перемішати і інкубувати при кімнатній температурі 25-30 хвилин. Вміст склянки перенести в центрифужну пробірку, врівноважити її і піддати центрифугуванню при 5000-7000 хв-1 протягом 20 хвилин. Надосадову рідину видалити піпеткою. Ротор центрифуги ретельно витерти щоб уникнути корозії (сульфат амонію має високу корозійну активність). Осад розчинити в 3 мл дистильованої води і знову перенести в хімічний стакан. Стінки центрифужної пробірки промити 2 мл дистильованої води і розчин перенести до основного зразком у хімічний стакан. Невеликими порціями, при постійному перемішуванні, додати до 5 мл розчиненого осаду 5 мл насиченого розчину сульфату амонію, інкубувати 25 хвилин, потім центрифугувати. Надосадову рідину видалити, осад розчинити в 5 мл дистильованої води. Видалення сульфату амонію провести методом діалізу в три етапи: перший - діаліз проти дистильованої води (1000 мл) протягом 4-5 годин, другий і третій - діаліз проти двох змін натрій-фосфатного буферного розчину (по 500 мл 0,005 моль / л, рН 6,0) на холоді. Повне видалення сульфату амонію визначають якісними аналітичними пробами на іон SO_4^{2-} , який визначають в розчині, використовуючи хлорид барію (10%) або реактив Несслера.

Завдання для самостійної роботи: взяти у лабораторної тварини кров і отримати з неї сироватку і плазму крові.

Контрольні питання:

- 1.Порядок взяття крові у тварин різних видів.
- 2.Методика отримання стабілізованої і дефібринованої крові.
- 3.Методика отримання плазми та сироватки крові.
- 4.Применение сироватки та плазми крові в імунологічних дослідженнях.
- 5.Поняття про серологічних реакціях. 6.Исследуемый матеріал і діагностикум.

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

ОТРИМАННЯ АНТИГЕНІВ (АНТИГЕННИХ ДІАГНОСТИКУМІВ)

Мета заняття: вивчити методи отримання антигенів

Методичні рекомендації

У природних умовах антигени знаходяться в клітинах (клітини організму людини і тварин, бактерії, гриби, найпростіші), в макромолекулах (віруси) і можуть бути представлені різноманітними складними речовинами (нуклеїновими кислотами, білками, вуглеводами, ліпідами). Для вивчення антигенів їх необхідно отримувати в чистому вигляді (без домішок інших антигенів).

У ветеринарній медицині використовують антигени для наукових досліджень, для активної імунізації і для постановки різних реакцій у ході лабораторної діагностики. Збудники інфекційних захворювань містять безліч складних речовин, кожне з яких є самостійним антигеном. Антигенною структурою конкретного збудника називають його антигенний склад. Для отримання ефективних вакцин необхідно вивчити антигенну структуру збудника і виявити найголовніші антигени, здатні викликати повноцінний і напружений імунну відповідь. Такі антигени називають протективними. Виявлення та отримання протективних антигенів - основне завдання творців вакцин. У діагностиці інфекційних захворювань антигени використовують для постановки діагностичних реакцій, наприклад, алергічних і серологічних. Всі антигени ділять на корпускулярні і розчинні. Корпускулярні антигени - це суспензії окремих клітин (бактеріальні клітини, еритроцити, ділянки зруйнованих клітин). Розчинні антигени - розчинні речовини, отримані при руйнуванні клітин (ендотоксини, білки, нуклеїнові кислоти), віруси або речовини, які збудники виділяють у зовнішнє середовище (екзотоксини).

Отримання корпускулярних антигенів

В залежності від мети використання корпускулярні антигени необхідно отримати або живими, або інактивованими (не здатними розмножуватися). На першому етапі мікроорганізми культивують таким способом, при якому можна отримати найбільшу кількість антигену. Бактерії культивують на звичайних, спеціальних або елективних поживних середовищах. З щільних поживних середовищ мікроорганізми отримують шляхом змивання стерильним фізіологічним розчином, на рідких поживних середовищах відразу отримують завчасу мікроорганізмів. Для отримання стандартного антигену необхідно визначити кількість клітин у суспензії. Для цього використовують різні способи. Еритроцити і лейкоцити підраховують у лічильній камері Горяєва. Кількість бактеріальних клітин у суспензії найчастіше визначають спектрофотометричним методом (по оптичній щільності) мул більш простим методом - за допомогою стандартів мутності з відомою кількістю клітин в одиниці об'єму. Стандарт складається з запаяних пробірок-еталонів, що містять суспензію бактерій в дистильованій воді найдрібніших частинок скла пірекс з різним ступенем мутності. Числові позначення на етикетці кожної пробірки-еталона (5, 9, 10, 11, 20) вказують, якій кількості одиниць каламутності відповідає даний еталон. За одиницю каламутності умовно прийнята мутність суспензії живих тифозних

бактерій, що містить 108 мікробних тіл в 1 см³. каламутність стандарту на 10 одиниць відповідає кількості клітин в см³ суспензії, яке залежить від розмірів бактерій. Наприклад: 8,5 x10⁸ бактерій кишкової групи, 10⁹ бактерій сальмонел, 1,5 x10⁹ бруцельозного бактерій, 2x10⁹ холерних вібріонів, 4,5 x10⁹ туляремійних бактерій, 10¹⁰ кашлюкових бактерій. З метою інактивації бактерій користуються методами, які не викликають зниження їх імунотипових властивостей і не призводять до підвищення токсичності мікроорганізмів. Інактивовані мікроорганізми використовують в якості вакцин або антигенних діагностикумів для постановки серологічних реакцій. Для інактивації клітин використовують кілька способів:

- Висока температура (від +56 до +700 С);
- Хімічні речовини (формалін, спирт, ацетон, фенол);
- Опромінення (ультрафіолетовими або рентгенівськими променями);
- Вплив ультразвуком.

Живі збудники з ослабленою патогенністю (аттенуйовані) використовують в якості живих вакцин. Суспензії еритроцитів і лімфоцитів використовують для визначення груп крові, підбору донорів для трансплантації.

Принципи отримання розчинних антигенів

Розчинні антигени - це окремі речовини або макромолекули (наприклад, віруси). Для вивчення властивостей речовин, що входять до складу клітин, треба отримувати їх у чистому вигляді. Це багатоступінчастий та складний процес, що складається часто з різних методів. Найбільш часто використовують такі методи отримання розчинних антигенів прокариотів і еукаріотів:

- Механічне руйнування (дезінтеграція, гомогенізація, руйнування ультразвуком);
- Екстрагування;
- Обробка ферментами;
- Використання детергентів;
- Центрифугування.

Механічне руйнування (дезінтеграцію) бактеріальних клітин проводять у спеціальних приладах (дезінтеграторах або пресах).

Мікробну суспензію струшують з дрібними скляними бусами 3-5 хвилин (температура +40 С при 2-4 тисячах коливань в 1 хвилину). Екстрагування - це вилучення розчинних речовин з цілих або дезінтегрованих клітин за допомогою розчинників. Так, з бактеріальних клітин екстрагують білки і ліпополісахариди (ЛПС) їх оболонки. Для екстракції речовин, що знаходяться всередині клітин, необхідно спочатку провести дезінтеграцію бактерій. Екстрагування проводять дистильованою водою, ізотонічним розчином (фізрозчин), буферними розчинами

або іншими речовинами. Екстракти (нативні антигени) - складні суміші антигену і баластних (додаткових) речовин. З екстрактів чисті антигени виділяють з допомогою інших методів. За допомогою ферментів руйнують ковалентні зв'язки між молекулами, наприклад: руйнують клітинні стінки бактерій, розщеплюють великі молекули на дрібні фрагменти. Найбільш часто для руйнування бактеріальних клітин використовують папаїн і мурамідазу. Детергенти не руйнують ковалентні зв'язки, а пов'язують білки або утворюють з білками міцел з ліпідами, наприклад, додецилсульфат викликає необоротну денатурацію білків і не змінює антигени іншої хімічної структури.

Для перетворення нерозчинних білків в розчинні (солюбілізації) використовують тритон X-100. Після дезінтеграції окремі клітинні компоненти можна виділити центрифугуванням. Існують різні його види: диференціальне, зональне, рівноважний, в градієнті щільності. Так, бактеріальні клітини осаджуються при 20-30-хвилинному центрифугуванні за режиму 4000-5000 хв-1 (обороту в хвилину), фрагменти клітинної стінки - за 20 хвилин при 15000-20000 хв-1, мембрани - за 60 хвилин при 25000-30000 хв-1.

Методика отримання антигенів кишкової палички:

1. Приготування бактеріальної суспензії. У пробірку з добовою культурою, отриманої на скошеному агарі, налити 5 мл стерильного фізрозчину, обережно покрутити її між долонями до повного змивання бактеріальної маси. Пастерівської піпеткою перенести суспензію бактерій в стерильну пробірку і тричі відмити клітини фізіологічним розчином шляхом центрифугування при 5000 хв-1 по 30 хвилин.

2. Інактивацію антигену провести за допомогою прогрівання суспензії на водяній бані при +1000 С протягом 1 години. Повноту інактивації перевірити шляхом посіву 1-2 крапель антигену на МПБ з інкубування в термостаті 1 добу при +370 С. Відсутність росту свідчить про інактивації антигену.

Завдання для самостійної роботи: приготувати корпускулярний антиген кишкової палички.

Контрольні питання:

1. Корпускулярні і розчинні антигени.
2. Методика отримання корпускулярних антигенів.
3. Методика отримання розчинних антигенів.
4. Використання бактеріальних і вірусних антигенів в імунології.

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

ОТРИМАННЯ ГІПЕРІМУННИХ СИРОВАТОК. ПОНЯТТЯ ПРО МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА

Мета заняття: ознайомитися з методикою одержання гіперімунних сироваток та моноклональних антитіл, а також їх використанням у ветеринарної медицини.

Методичні рекомендації: Імунна сироватка (антисироватка) представляє собою сироватку крові, що містить антитіла до даного антигену. До них пред'являють ряд вимог: специфічність, чутливість в імунологічних реакціях, відтворюваність результатів досліджень (точність при діагностиці) і достатній вміст (титр) антитіл. При отриманні сироваток необхідно враховувати як властивості збудники, так і властивості тварини, від якого будуть отримувати сироватку. При імунізації складними антигенами (наприклад, бактеріями) кролики синтезують антитіла переважно до білкових антигенів, а миші - до полісахаридних. Якщо потрібні великі кількості сироваток, донорами служать великі тварини: кози, вівці, коні, ВРХ.

Сироватки, які містять велику кількість антитіл і отримані після декількох повторних імунізацій, називаються гіперімунних сироватками. Отримання таких сироваток засноване на використанні феномена імунологічної пам'яті. Повторне введення антигену призводить до більш інтенсивного і швидкого відповіді, а значить кількість антитіл в сироватці буде вище. Введення антигену проводять за спеціально проведеними схемами, що враховує вид донора і властивості антигену. За специфічності розрізняють полівалентні (поліспецифічні) і моновалентні (моноспецифічні) сироватки. Перші містять антитіла до багатьох клітинним компонентів, другі - тільки до одного конкретного антигену (речовині). Полівалентні сироватки отримують при імунізації корпускулярними антигенами (цілими бактеріальними клітинами або вірусами), моновалентні - при імунізації високоочищеними антигенами (наприклад, сироватки до капсульної антигенів бактерій або окремими класами імуноглобулінів).

Етапи отримання імунних сироваток: 1). Приготування антигену, 2). Імунізація (гіперімунізація) тварини, 3). Оцінка отриманої сироватки.

При імунізації необхідно визначити дозу антигену, що робить найбільш сильне імуногенні вплив. Для дрібних тварин це 10⁸-10¹⁰ бактеріальних клітин. Способи введення різні. Найбільш високі титри антитіл отримують при внутрішньовенному введенні антигену, тому що в імунну відповідь відразу включається селезінка. При підшкірному або внутрішньом'язовому введенні забезпечується повільне всмоктування антигену і більш тривала стимуляція імунної відповіді. Зазвичай, комбінують внутрішньовенне і місцеве введення антигену, поєднуючи з введенням ад'юванту (імуностимулятору). Оцінка отриманих сироваток (тестування) проводять в серологічних реакціях і виражають у титрах. Титр сироватки - це її найбільша розведення, що дає позитивну реакцію. Зберігання гіперімунних сироваток. Після тотального знекровлення

тваринного сироватки фасують невеликими порціями і зберігають при температурі +40 С, у замороженому або ліофільно висушеному вигляді. Останній спосіб дозволяє зберегти активність сироватки кілька місяців. У практиці ветеринарної медицини досить широко використовуються сироватки тварин, що перехворіли якими-небудь захворюваннями. Вони називаються сироватками реконвалесцентів. Наприклад, від корів беруть кров, отримують з неї сироватку і використовують її для профілактики або лікування телят цього ж господарства. Оскільки в сироватці крові дорослої тварини циркулює значна кількість антитіл до тих збудників, які є в конкретному господарстві, використання таких сироваток забезпечує ефективну пасивну імунізацію молодняку без застосування сильних і дорогих протимікробних препаратів.

Моноклональні антитіла ідентичні за всіма характеристиками до однієї антигенної детермінанти, які продукуються одним клітинним клоном, що походить з одного лімфоцита. Можливість отримання моноклональних антитіл з'явилася після розробки гібридомної технології. Гібридоми - клітини, одержувані при злитті імунних В-лімфоцитів (плазмоцитів) і мієломних (пухлинних) клітин. Завдяки своїм властивостям гібридомної клітини синтезують величезна кількість ідентичних антитіл, які використовуються в лабораторній практиці і наукових дослідженнях.

Завдання для самостійної роботи: провести імунізацію мишки або кролика приготованим раніше антигеном.

Контрольні питання:

1. Поняття про імунну (гіперімунну) сироватку крові.
2. Полівалентні і моновалентні сироватки, сироватки реконвалесцентів.
3. Методи отримання імунних сироваток.
4. Поняття про моноклональних антитіла.

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

МОДУЛЬ №2

Контрольні питання

1. Що таке розеткоутворення. Види розеткоутворення.
2. На чому засновані методи Е-, ЕА- і ЕАС-розеткоутворення.
3. Практичне застосування реакцій розеткоутворення.
4. У чому сутність процесу бласттрансформації лімфоцитів.
5. Морфологічні особливості бластних клітин.
6. Стимулятори бластогенезу, Т- і В-клітинні мітогени.
7. Для вирішення яких завдань використовується РБТЛ. Методи постановки та оцінки РБТЛ.
8. Корпускулярні і розчинні антигени.
9. Методика отримання корпускулярних антигенів.
10. Методика отримання розчинних антигенів.
11. Використання бактеріальних і вірусних антигенів в імунології.
12. Порядок взяття крові у тварин різних видів.
13. Методика отримання стабілізованої і дефібринованої крові.
14. Методика отримання плазми та сироватки крові.
15. Застосування сироватки та плазми крові в імунологічних дослідженнях.
16. Поняття про серологічних реакціях. Досліджуваний матеріал і діагностикум.
17. Поняття про запальної реакції як факторі неспецифічного імунітету.
18. Основні ознаки запалення. Роль клітинних та гуморальних факторів в запальної реакції.
19. Запалення як механізм поєднання факторів вродженого імунітету та їх зв'язок з придбаним імунітетом.
20. Визначення поняття антиген.
21. Властивості антигенів.
22. Структура антигену
23. Види антигенів.
24. Антигенна структура збудників інфекційних захворювань
25. Антигенна структура організму тварин і людини
26. Молекули імуноглобулінів: антитіла і рецептори ВКК.
27. Структура та функції антитіл.
28. Властивості антитіл: валентність, специфічність, афінність, авідність.
29. Класи імуноглобулінів.
30. Суперсімейство імуноглобулінів.
31. Мета і основний підсумок імунної відповіді.
32. Етапи і ланки імунної відповіді.
33. Антигенпредставляючі клітині та їх роль в імунній відповіді.
34. Механізм активації лімфоцитів.
35. Роль Т-хелперів в імунній відповіді.
36. Форми клітинної імунної відповіді.
37. Клітинна цитотоксичність.
38. Кооперація клітин в імунній відповіді.
39. Схема гуморальної імунної відповіді на антиген
40. Т-залежний і Т-незалежний гуморальну імунну відповідь.
41. Дозрівання афінності антитіл.
42. Первинний і вторинний імунну відповідь.
43. Взаємодія клітин і речовин, у ході імунної відповіді.

СЕРОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ. РЕАКЦІЯ ПРЕЦИПІТАЦІЇ (РП, РДП, ЗІЕФ)

Мета заняття: ознайомитися з сутністю серологічних реакцій, вивчити постановку реакції преципітації з метою визначення видової приналежності крові в реакції кільцевої преципітації для діагностики сибірки.

Матеріали та обладнання: досліджувана кров, набір діагностичних сироваток, преципітуючі білки людини, ВРХ, свині, курки; стандартний сибірковий антиген, сибіркова преципітуюча сироватка, фізіологічний розчин; пробірки Уленгута, пастерівські піпетки, штатив для пробірок.

Серологічними називають реакції, в яких обов'язковими компонентами є антиген і сироватка крові (від лат. serum) або імуноглобуліни, отримані із сироватки (гамаглобуліни). Залежно від характеру взаємодії антигену і антитіл до нього розрізняють реакції преципітації (осадження), аглютинації (склеювання), адсорбції (приклеювання), зв'язування комплементу і нейтралізації.

Методичні рекомендації

В основі реакції преципітації лежить агрегація і випадання в осад комплексів антиген-антитіло. Антитіла (преципітини) реагують з розчинними антигенами (преципітиногенами) і викликають їх агрегацію, що викликає зміна оптичної щільності середовища (помутніння рідини) і випадання осаду (преципітату). Антиген використовується розчинна, отриманий під час добування тканин або органів тварин або людини, екстракти мікроорганізмів, складні молекулярні суміші або хімічно чисті речовини. Антиген отримують шляхом екстрагування різними методами. Вибір способу обробки матеріалу залежить від його хімічної природи, а головна вимога - ефективно витяг антигену без його денатурації. У лабораторній практиці для постановки РП використовують специфічні сироватки та екстракт (розчин) антигену або використовують здатність антигенів і антитіл дифундувати в агаровому гелі. На основі феномена преципітації Розроблені такі реакції: кільце преципітації (РКП), реакція дифузійної преципітації (РДП), зустрічний імуноелектрофорез (ЗІЕФ).

У ветеринарній медицині РДП використовують для діагностики сибірської виразки (реакція Асколі), деяких вірусних хвороб (лейкозу ВРХ, сказу, чуми м'ясоїдних), в судово-медичної та судово-ветеринарної експертизи при встановленні видової належності тканин і органів людини і тварин.

Перевагами РП є її простота, можливість використання будь-яких розчинних компонентів при мінімальному їх кількості, можливість документування результату (фотографування), відсутність вимог стерильності. Недоліком реакції є невисока її чутливість в порівнянні з іншими серологічними реакціями. Реакція кільце преципітації (РКП, реакція Асколі) Запропоновано Асколі для діагностики сибірської виразки в 1911 році. Найчастіше РП використовують для виявлення мікробних антигенів у тканинному матеріалі. Обов'язкова умова - прозорість компонентів реакції (при необхідності їх фільтрують через азбестову вату).

Існує три варіанти постановки РП: методи нашарування антигену або підшарування антитіл і мікробаріант РКП.

Метод «нашарування» антигену

В Уленгутівській пробірці (діаметр 2-3 мм) вносять пастерівською піпеткою з тонким капіляром, не змочуючи стінок пробірки, 0,3-0,5 мл імунної преципітуючої сироватки. Потім по стінці пробірки обережно нашаровуються на поверхню сироватки 0,1-0,2 мл досліджуваного антигену (преципітиногену), не допускаючи змішування компонентів. Облік результатів проводять на тлі темної папери через 1-2 хвилини. При позитивній реакції на межі контакту компонентів відбувається помутніння середовища, видиме збоку як сіро-білий диск або кільце (преципітат). Паралельно ставлять контролю: 1) імунна сироватка + стандартний антиген; 2) імунна сироватка + фізіологічний розчин, 3) імунна сироватка + екстракт з тканин здорової тварини. Реакцію вважають достовірною, якщо в першому контролі реакція позитивна (утворюється кільце преципітату), а в другому і третьому контролях - реакція негативна (на кордоні рідин кільце преципітації не утворюється).

Метод «підшарування» антитіл

Компоненти використовують ті ж, але спочатку в пробірку вносять антиген, потім обережно, опустивши піпетку на дно пробірки, під антиген нашаровують імунну сироватку. Мікроваріант реакції кільцепреципітації проведено для економії компонентів. У цьому випадку використовують скляні капіляри або тонко відтягнуті кінчики пастерівських піпеток діаметром 0,5-1,0 мм. Спочатку в капіляр набирають преципітуючу сироватку на висоту 1-1,5 см, надлишок сироватки видаляють ватним тампоном, занурюють його в розчин антигену і набирають однакову кількість антигену. Капіляр перевертають так, щоб суміш сироватки та антигену опинилася в середині капіляра, і закріплюють його вертикально в пластилінової платівці. Результат враховують так само.

Реакція дифузійної преципітації (РДП)

РДП заснована на здатності розчинних антигенів і антитіл дифундувати в агаровому гелі. При зустрічі гомологічних антитіл і антигенів утворюється не здатний до дифузії нерозчинний преципітат, який формує в прозорому шарі гелю непрозору білувату смужку, добре помітну неозброєним оком.

Методика постановки РДП методом подвійної імунодифузії (за Оухтерлони)

Існує два основних варіанти постановки РДП: у чашках Петрі (тривалість реакції 5-7 діб), на предметних стеклах (1-2 доби).

1. **Постановка РДП в чашках Петрі.** У шарі 1-1,5%-ного агарового гелю (товщина 3-5 мм) за допомогою штампа або металеві трубочки діаметром 5мм роблять кілька поглиблень (лунок) на відстані 2-2,5 см один від одного. У сусідні лунки наливають антигени і сироватки. Антигени і антитіла сироватки поступово дифундують з лунок в шар гелю в усі сторони від лунок. У сусідніх лунках дифузія компонентів відбувається назустріч один одному (подвійна дифузія). Якщо вони гомологічних, відбувається утворення комплексу Аг + Ат. Цей комплекс має більші розміри, він не розчиняється і тому не здатний дифундувати. Він осідає (преципітує), утворюючи смугу преципітації (білувату лінію в товщі агару). Реакцію враховують через 5-7 доби.

2. Постановка РДП на предметних стеклах.

На знежирені предметні скла наливають шар агару товщиною 1,5-2 мм. Після затвердіння агару в ньому штампом вирізують лунки близько 5мм діаметром на відстані 3-4 мм одна від одної. У підготовлені лунки заливають компоненти реакції так, щоб рідина не вилілася з них, а тільки заповнювала обсяг лунки. Після цього скла поміщають у вологу камеру (ексикатор, чашка Петрі) і залишають при кімнатній температурі або ставлять у термостат. Результат враховують за освітою смуг преципітації. Попередній облік результатів проводять через 24 години, остаточний - через 48 годин.

Зустрічний імуноелектрофорез (ЗІЕФ)

У цьому методі поєднуються метод електрофоретичного розділення антигенних сумішей в агаровому гелі і подальшим виявленням окремих антигенів за допомогою реакції дифузійної преципітації. Агарові гель готують на буферних розчинах (веронал-медіоловий, трис-буфер). Отриманий гель наливають на скляні пластини (розмір 13-18x18-24 см) або на предметні скла товщиною 2-4 мм. Вирізають в агарі лунки для розчинів і заповнюють їх досліджуваною рідиною. Підготовлену пластину поміщають у камеру для електрофорезу на певний час. Потім пластину з гелем виймають з камери, в агарі по довжині пластини прорізають траншею (канавку), яку заповнюють імунною сироваткою. Пластини поміщають у вологу камеру, де за кілька діб утворюються дуги преципітації. Електрофореграма можна використовувати для вивчення хімічної природи тих речовин, які прореагували.

Завдання для самостійної роботи: вивчити техніку постановки та обліку результатів кільцевої РП.

Контрольні питання:

1. У чому сутність феномену преципітації?
2. Техніка постановки кільцевої РП і РДП.
3. Для яких цілей застосовують реакції преципітації?

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

МОДИФИКАЦІЇ РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ (ВИЗНАЧЕННЯ ОКРЕМИХ КЛАСІВ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ В РЕАКЦІЇ РАДІАЛЬНОЇ ІМУНОДИФУЗІЇ ПО МАНЧІНІ)

Мета заняття: ознайомитися з сутністю реакції Манчіні, вивчити методику постановки реакції.

Матеріали та обладнання: сироватка крові великої рогатої худоби, досліджувана кров, діагностична сироватка, преципітуючі білки ВРХ; піпетки очні, піпетки мірні на 2,0 мл, пробірки, штативи, фізіологічний розчин, чашки Петрі (діаметр 50 мм), агар 1,5%-ний, штамп для вирізування лунок в агаровому гелі, термостат.

Найбільш придатним для кількісного аналізу антигенів є метод простий радіальної імунодифузії, запропонований Г. Манчіні в 1963 році.

Цей метод передбачає використання моноспецифічних антисироваток та еталона з відомим вмістом антигену. Тест-антиген і розведення досліджуваних розчинів поміщають в лунки, вирізані рядами в пластині гелю з попередньо внесеними до нього моноспецифічними сироватками. Антиген дифундує в гель і, з'єднавшись зі специфічними антитілами, формує кільця преципітації, діаметри яких залежать від концентрації антигену в лунках. Реакція Манчіні придатна для кількісного визначення будь-якого антигену при наявності відповідної моноспецифічної сироватки і стандартного антигену. Найчастіше за допомогою цього методу визначають білкові антигени: білки сироватки крові, спинномозкової рідини, секретів залоз, кількість імуноглобулінів різних класів в сироватці крові. Проводять цю реакцію при кімнатній температурі (коливання не більше 50), а тривалість залежить від антигену: альбуміни, трансферин, IgA і IgG формують максимальні преципітати за 48 годин, а IgM та інші крупномолекулярні білки - через 5-7 доби. Метод імунодифузії має високу чутливість і специфічність: можна виявити 10 нг антигену. Помилка методу складає 3-7%.

Практичне застосування реакції преципітації:

- Для вивчення антигенної структури мікроорганізмів, тканин тварин і людини, антигенного складу складних білкових рідин;
- У діагностиці інфекційних захворювань (сибірської виразки, чуми людини, туляремії, віспи, поліомієліту, лейкозу ВРХ);
- Для встановлення ступеня спорідненості видів мікроорганізмів, рослин або тварин (по загальним видовим антигенів);
- Для визначення видової приналежності білків (наприклад, білків крові в судово-ветеринарної експертизи);
- Для виявлення домішок у м'ясних, рибних, борошняних виробках у ветеринарно-санітарної експертизи.

Принцип радіальної імунодифузії покладено в основу методу, що застосовується для вивчення токсигенності (здатності виробляти токсин) бактеріальних культур і відбору з них найбільш або найменш токсигенних. Наприклад, досліджувані культури стафілококів висівають в агар з антитоксичною сироваткою і відбирають колонії з найбільшим діаметром кілець преципітації (найвища токсигенність) або без кілець преципітації (найменша токсигенність).

Методичні рекомендації

Визначення видової належності сироватки крові в реакції Манчіні.

Приготування агарового гелю. Гель готують на веронал-ацетатному буферному розчині рН 8,6, додавши до нього 1,5% агар-агару. Готовий агар розливають у кілька колб, охолоджують до 48°C і окремо змішують з підігрітими до тієї ж температури моноспецифічними діагностичними сироватками проти білків ВРХ у співвідношенні 3:1. Готову суміш до загусання наносять на предметні скла або розливають в чашки Петрі (товщина 1 мм). Скло (чашки Петрі) залишають при кімнатній температурі до загусання гелю.

Постановка реакції. У застиглому агаровому гелі за допомогою штампа роблять ряди лунок (по 4 лунки в ряду) - для еталонної та досліджуваних сироваток. У першу лунку вносять еталонну сироватку ВРХ, в інші - досліджувані сироватки в розведенні 1:2, 1:4 і 1:8. Предметні скла поміщають у вологу камеру при кімнатній температурі на 48 годин.

Облік реакції. Якщо досліджувані сироватки отримані від великої рогатої худоби, то навколо лунок утворюються кільця преципітації: реакція позитивна. Для обліку реакції вимірюють діаметр кілець преципітації. При недостатній чіткості кілець преципітації можна забарвити препарат амідом чорним. Для цього пластинки з гелем двічі відмивають розчином хлориду натрію по 12 годин, потім у дистильованій воді 6-8 годин, висушують препарат фільтрувальним папером і забарвлюють амідом чорним 15 хвилин. Після цього промивають препарат у проточній воді 3-5 хвилин і висушують. Лінії преципітації набувають темне забарвлення на тлі незабарвленого гелю.

Завдання для самостійної роботи: вивчити техніку постановки та обліку результатів реакції радіальної імунодифузії за методом Манчіні.

Контрольні питання:

1. Техніка постановки реакції Манчіні.
2. Для яких цілей застосовують реакції преципітації?

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

ФЕНОМЕН АГЛЮТИНАЦІЇ. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ АГЛЮТИНАЦІЇ

Мета заняття: ознайомитися з сутністю реакції аглютинації, вивчити постановку реакції пластинчастої та кільцевої аглютинації. Феномен (явище) аглютинації (від лат. Agglutinatio - склеювання) полягає в здатності аглютинуючих антитіл зв'язуватися з корпускулярними антигенами, склеює їх в агрегати, які випадають в осад. Корпускулярними антигенами виступають мікробні клітини або клітині тканин тварини (людини). Антитіла, що беруть участь в реакції аглютинації, називаються аглютинінами, антигени - аглютиніногенами, а утворений осад - аглютинатом. Аглютинат може бути грубозернистим (еритроцити при визначенні групи крові), дрібнозернистим (бруцели, збудники туляремії), пухкі (кишкова паличка, сальмонели) або видимим тільки під мікроскопом (лептоспіри). Аглютинат утворюється повільно (кілька хвилин), при легкому струшуванні зернистий аглютинат не розбивається, а сиплеться - розбивається на більш дрібні пластівці. При осіданні на дно пробірки або лунки планшета аглютинат утворює осад у вигляді перевернутої парасольки.

Методичні рекомендації:

Модифікації реакції аглютинації

Існує кілька різновидів реакції аглютинації: 1) за характером і кількістю компонентів реакції - прямий і непрямий аглютинації (аглютинації еритроцитів або частинок латексу), 2) за методикою постановки - пластинчаста, пробіркових (розгорнута, класична), кільцева, мікроаглютинації і лізису.

У реакціях прямої аглютинації взаємодіють безпосередньо антигени (мікробні або тварини клітині) і антитіла (імуноглобуліни сироватки крові). Наприклад, реакції аглютинації для діагностики бруцельозу, ідентифікації штамів кишкової палички і сальмонел.

Стандартні антигенні діагностикуми є суспензією убитих формаліном чи нагріванням мікробів, їх використовують у тому випадку, якщо досліджуваним матеріалом виступає сироватка крові, взята у тварин (хворих, що перехворіли, вакцинованих або клінічно здорових).

Діагностичні сироватки містять антитіла певної специфічності. Їх отримують шляхом гіперімунізації тварин-продуцентів певним видом (штамом) мікроорганізму і використовують для ідентифікації виділених мікробних культур.

Постановка роз-Бенгал проби (РБП) при діагностиці бруцельозу

Для її постановки необхідні наступні компоненти: випробувані сироватки крові, бруцельозний антиген для РБП, позитивна бруцельозного і негативна сироватки, 0,5% фенолізований фізіологічний розчин. Реакцію ставлять на чистих, сухих емальованих пластинках з лунками при +18 +2 О ° С. На бортах пластини проти кожної лунки записують номер досліджуваної сироватки, які вносять на дно лунки в дозі

0,03 мл за допомогою шприца-напівавтомата (піпетки). Потім в кожен лунку поруч з сироваткою вносять 0,03 мл антигену і далі ретельно змішують з сироваткою до отримання однорідної суміші, а потім похитують протягом 4 хвилин. При позитивній реакції з'являються дрібні або великі пластівці аглютинату рожевого кольору, що виділяються на білому тлі лунки. Реакцію вважають негативною при відсутності аглютинації: суміш гомогенна, рівномірно забарвлена.

Постановка кільцевої проби (КР) з молоком при діагностиці бруцельозу

Цю реакцію застосовують з метою перевірки благополуччя стад по бруцельозу ВРХ і для перевірки молока при продажу його на ринках. Компоненти реакції: досліджуване молоко, антиген кольоровий бруцельозний для КР з молоком, сироватка позитивна бруцельозного. У пробірки наливають по 0,1 мл антигену і додають по 2 мл молока, пробірки струшують для перемішування молока з антигеном. Одночасно ставлять контролю: з молоком завідомо здорової корови; з сумішшю молока здорової корови і позитивною бруцельозного сироваткою. Штативи з випробуваними і контрольними пробами молока вміщують у водяну баню або термостат при 37 ° С на 1 годину.

Облік реакції:

- +++ чітко виражене синє кільце у верхній частині стовпчика молока в шарі вершків (інша частина молока залишається білою);
- ++ достатньо виражене синє кільце в шарі вершків (інша частина молока має синюватий колір);
- + синє кільце в шарі вершків виражено слабо, весь стовпчик молока має синій колір;
- стовпчик молока залишився рівномірно забарвленим в такій же синій колір, який був отриманий відразу після додавання до нього антигену, а шар вершків - білого або злегка жовтуватого кольору.

Реакція аглютинації на склі (пластинчаста РА) для ідентифікації мікроорганізмів

На знежирене предметне скло наносять роздільно краплю відомої аглютинаційної діагностичної сироватки (сальмонельозної або колібактеріозної) і краплю фізіологічного розчину (контроль). Бактеріологічною петлею двічі беруть бактеріальну масу досліджуваної культури з колони в чашці Петрі або пробірки з МПА і суспендують (перемішують) роздільно перший раз у фізіологічному розчині, а другий раз - у сироватці до отримання гомогенної суспензії. Результат враховують через 2-4 хвилини. У контролі (у краплі з фізіологічним розчином) зміни повинні бути відсутні: суміш залишається рівномірно каламутною. При позитивній реакції (відповідно виду бактерії і сироватки) у краплі з сироваткою з'являються пластівці аглютинату. Якщо аглютинат не утворюється, значить, досліджувана культура належить до іншого штаму мікроорганізмів.

Реакція мікроаглютинації і лізису (РМАіЛ) при діагностиці лептоспірозу

Компоненти реакції: досліджувана сироватка крові тварини; антигени (культури діагностичних сероваріантів лептоспір); фізіологічний розчин.

Постановка реакції. Кожну сироватку розливають в окрему лунку, що складається з 5-13 лунок, в залежності від кількості антигенів, які використовуються в реакції. Кожну культуру вносять по 0,8 мл в 3 лунки з різним розведенням сироватки. Після додавання антигенів пластини струшують і витримують у термостаті при 30 ° С протягом години. Реакцію враховують шляхом мікроскопії крапель з кожної лунки в темному полі мікроскопа при збільшенні 20x10. Аглютинація проявляється у склеюванні лептоспір та появі "павучків", які включають від 3 -5 до декількох десятків лептоспір. Вільні кінці лептоспір зберігають рухливість. У початкових розведеннях сироватки може спостерігатися лізис лептоспір, який проявляється набуханням і знерухомленням, появі зернистості і повного розпаду мікробних клітин. Позитивною вважають реакцію, оцінену не менше ніж на два хрести за відсутності аглютинації в контролі.

Завдання для самостійної роботи: вивчити техніку постановки та обліку результатів реакції аглютинації (пластинчастої РА, КР, РБП).

Контрольні питання:

1. У чому сутність феномену аглютинації?
2. Техніка постановки КР, РБП пластинчастої РА.

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

КІЛЬКІСНІ РЕАКЦІЇ АГЛЮТИНАЦІЇ

(Пробіркова реакція аглютинації для діагностики бруцельозу (реакція Райта))

Мета заняття: ознайомитися з сутністю пробіркових реакції аглютинації і вивчити її постановку.

Для постановки реакції необхідно 5 пробірок, встановлених в штатив. Загальний обсяг компонентів реакції - 1 мл. Схема проведення реакції представлена в таблиці.

Схема постановки реакції Райта

Компонент реакції	Номер пробірки, кількість компонентів в пробірці, мл				
	1	2	3	4	5 (контроль антигену)
Фізіологічний розчин	-	1,0	1,0	1,0	1,0
Досліджувана сироватка в розведенні 1:50	2,0	Послідовні перенесення по 1,0 мл з попередньої пробірки в наступну			-
Отримане розведення сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	-
Антиген, кількість крапель	1	1	1	1	1

Одночасно за аналогічною схемою досліджують позитивну і негативну сироватки (позитивний і негативний контроль). Облік результатів починають з контрольних пробірок: у 5-й пробірці (контроль антигену) і в ряді з негативною сироваткою аглютинації бути не повинно; в ряду з позитивною сироваткою повинна бути аглютинація в 3-4 плюса згідно візуальної оцінки:

- ++++ повна аглютинація - добре виражений осад і повне прояснення рідини;
- +++ неповна аглютинація з добре вираженим осадом і зі слабкою опалесценцією рідини;
- ++ часткова аглютинація з невеликим осадом, надосадова рідина каламутна;
- + дуже невеликий осад, рідина сильно опалесцентну, непрозора; - відсутність аглютинації, осаду немає, рідина каламутна.

За позитивний результат приймають аглютинацію не менше, ніж на два хрести у розведенні досліджуваної сироватки 1:200.

Практичне застосування РА. Завдяки високій специфічності і простоті постановки РА широко використовується в лабораторній діагностиці, наприклад: визначення групових антигенів на еритроцитах людини і HLA-антигенів лейкоцитів; для вивчення антигенної структури мікробів та їх ідентифікації, у серологічна діагностика (виявлення протимікробних і аутоантитіл, Оцінка донорської крові та т.д.).

Завдання для самостійної роботи: вивчити техніку постановки та обліку результатів пробіркових реакції аглютинації.

Контрольні питання:

1. У чому відмінність якісних і кількісних реакцій аглютинації?
2. Техніка постановки пробіркових РА (реакції Райта).
3. Учету її результатів.
4. Для яких цілей застосовують реакції аглютинації?

Робота прийнята « » __ 201 __ р.

Підпис викладача.

РЕАКЦІЇ ГЕМАГГЛЮТИНАЦІЇ (РГА, РЗГА, РНГА)

Мета заняття: ознайомитися з сутністю реакції гемаглютинації, вивчити постановку реакції гемаглютинації.

Методичні рекомендації

Реакція гемаглютинації (РГА)

Це неспецифічна несерологічна імунологічна реакція, заснована на здатності деяких бактерій і вірусів аглютинувати (склеювати) еритроцити різних видів тварин. Антигени адсорбуються на поверхні еритроцитів, утворюючи між ними містки, в результаті чого еритроцити склеюються і осідають на дно пробірки або лунки планшета у вигляді "парасольки", а неаглютиновані еритроцити осідають у вигляді "гудзички". Для постановки РДА використовують плексигласовий панелі або планшети, в лунках яких готують дворазові послідовне розведення вірусу (вірусоутримуючого матеріалу) на фізіологічному розчині в однаковому обсязі (наприклад, 0,5 мл, 0,2 мл, 0,1 мл, 0,05 мл або 0,025 мл). У останню лунку вірус не додають, туди наливають такий же обсяг фізіологічного розчину для контролю самоаглютинації еритроцитів. До кожного розведення вірусу додають рівний об'єм 1%-ної (іноді 0,5%-ної) суспензії еритроцитів певного виду тварини, струшують і витримують якийсь час при необхідній температурі в залежності від виду вірусу (частіше всього експозиція складає 60 хвилин).

Результат реакції оцінюють після повного осадження еритроцитів за інтенсивністю гемаглютинації в плюсах:

- + + + всі еритроцити аглютинували і утворили суцільний осад у вигляді "парасольки";
- + + більшість еритроцитів аглютинували, утворили "парасольки", по краях якого або в його центрі накопичується невелика кількість неаглютинованих еритроцитів;
- + більшість еритроцитів не аглютинувало і осіли у вигляді "гудзички", по краях якої утворюється незначна "парасолька", що надає нерівність краях "гудзички";
- всі еритроцити не аглютинували і осіли у вигляді "гудзиків" з рівними краями. Титром вірусу називають його найбільше розведення, при якому відбувається гемаглютинація не менше, ніж у 2 плюса.

Реакція затримки (гальмування) гемаглютинації (РЗГА або РГГА)

РЗГА - це специфічна, серологічна, імунологічна реакція. Сутність РЗГА в тому, що аглютинація еритроцитів затримується (гальмується) антитілами, що знаходяться в сироватці крові. Реєструється реакція візуально за характером осаду.

Основний дослід РЗГА для визначення кількості антитіл (титрування) сироватки крові

У всі лунки одного ряду панелі вносять по 0,5 см³ фізрозчину, а потім тільки в першу лунку - 0,5 см³ досліджуваної сироватки. В інших лунках методом «перекочування» готують послідовні дворазові розведення досліджуваної сироватки (зазвичай, до 1:1024). В усі лунки вносять

по 0,5 робочої дози вірусу, панелі струшують і залишають при кімнатній температурі 30-60 хвилин. Потім в усі лунки додають по 0,5 мл 1%-ної суспензії еритроцитів і витримують ще 30-60 хвилин. Облік реакції: реакція вважається позитивною, якщо в перших лунках еритроцити осіли у вигляді гудзички (їх аглютинація затримана антитілами), при негативній реакції у всіх панелях утворюється осад у вигляді парасольки. Титр сироватки - це найбільше її розведення, при якому реакція позитивна.

Реакція непрямой (пасивної) гемаглютинації (РНГА або РПГА)

РНГА - це специфічна, серологічна, імунологічна реакція. Сутність РНГА в тому, що відбувається аглютинація антитілами еритроцитів, на поверхні яких адсорбовані антигени (віруси). Реєструється реакція візуально за характером осаду. РНГА запропонована для виявлення бактеріальних та вірусних інфекцій. Зараз в РНГА використовують еритроцити, оброблені таніном і сенсibilізовані антитілами (еритроцитарний антитільний діагностикум) або антигенами (еритроцитарний антигенний діагностикум). Методика постановки РНГА

Компоненти реакції:

- Розріджувач (0,15 М фосфатно-буферний розчин);
- інактивована прогріванням досліджувана сироватка;
- еритроцитарний діагностикум (антигенний).

Постановка головного дослідження

Реакцію ставлять мікрометодом у плексигласових планшетах (плашках) з лунками об'ємом 1 мл. Досліджувані сироватки прогривають при 56оС 30 хвилин. У лунки (використовують від 8 до 12 лунок) наливають по 0,025 мл розчинника і готують послідовне дворазове розведення сироватки. Потім в усі лунки додають по 0,025 мл сенсibilізованих еритроцитів, суміш струшують і витримують при кімнатній температурі. Облік реакції: позитивної вважається реакція при утворенні осаду у вигляді парасольки, негативною - осаду у вигляді гудзички. За титр антитіл у сироватці приймають найбільше її розведення, що дає аглютинацію сенсibilізованих еритроцитів.

Контрольні питання:

1. РДА та використання в діагностиці хвороб тварин.
2. РЗГА та використання в діагностиці хвороб тварин.
3. РНГА та використання в діагностиці хвороб тварин.
4. Переваги реакцій гемаглютинації.

Самостійна робота: вивчити постановку реакції гемаглютинації.

Робота прийнята « » __ 201 __ р.

Підпис викладача.

**ФЕНОМЕН МІТКИ (РЕАКЦІЇ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ, ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ)
ПІДСУМКОВЕ ЗАНЯТТЯ. МОДУЛЬ № 3.**

Методичні рекомендації

Метод флуоресціюючих антитіл (МФА) або реакція імунофлуоресценції (РІФ)

МФА відноситься до експрес-методів діагностики, тому що дозволяє за кілька годин виявити навіть малі дози вірусу в патматеріалі. Принцип МФА полягає в тому, що антитіла, пофарбовані (з'єднані) з флуорохромами, зберігають здатність вступати у специфічний зв'язок з гомологічними антигенами. Утворений комплекс Аг + Ат можна виявити за характерним світінням при дослідженні під люмінесцентним мікроскопом. Причому специфічність методу поєднується з високою чутливістю.

Для отримання антитіл використовують гіперімунні сироватки. З них виділяють гомогенні фракції, що містять антитіла, які мітять флуорохромами. Найбільш часто використовують флуоресцентний ізотіоціанат (ФІТЦ), що дає зелене світіння, і РСХ-родаміну сульфохлорид, що дає червоне світіння. Такі мічені антитіла називають кон'югатом. В даний час реакцію імунофлуоресценції (РІФ) застосовують для діагностики більшості вірусних інфекцій. У лабораторній практиці люмінесцентну мікроскопію використовують у двох основних методах: методі флуорохроміювання і методі флуоресцентних антитіл (МФА).

Методика постановки РІФ (МФА) Використовують мазки, мазки-відбитки, гістологічні зрізи і культури клітин (на покривних скельцях). Написи роблять простим олівцем на матовому майданчику біля краю скла. Мазки підсушують на повітрі і фіксують 10-20 хвилин (при роботі з вірусом сказу - не менше 4 годин; фіксовані препарати можна зберігати при мінус 4-70 градусах). Найкращий фіксатор - чистий ацетон, охолоджений до мінус 10-15 градусів, можна використовувати метиловий спирт. Для контролю так само готують препарати з органів здорових тварин. Розрізняють два методи МФА: прямий і непрямий.

Пряма (одноступінчата) РІФ

Для індикації різних вірусів застосовують відповідні кожному антигену флуоресціюючі антитіла. На фіксований препарат наносять кон'югат і витримують 20-60 хвилин (+37 градусів) у вологій камері. Потім препарати відмивають фізіологічним розчином, підсушують на повітрі і досліджують під мікроскопом. Результат враховують по інтенсивності і специфічності флюоресценції в плюсах:

- ++++ яскрава, що виблискує флюоресценція смарагдово-зеленого кольору;
- +++ яскрава флюоресценція зеленого кольору;
- ++ слабка флюоресценція жовтувато-зеленого кольору;
- + дуже слабка флюоресценція невизначеного кольору;
- - об'єкт не флуоресціює.

Непряма (двоступінчаста) РІФ

Препарат спочатку обробляють гомологічними нефлуоресціюючими антитілами (перший ступінь), а потім антивидовими флуоресціюючими антитілами (другий ступінь). Антивидові сироватка повинна відповідати виду тварини-продуцента гомологічних антитіл. Найбільш часто використовують сироватки проти глобулінів кролика, коні або морської свинки. Розроблені модифікація непрямого методу з використанням комплементу. При цьому на препарат наносять нефлуоресціюючу специфічну сироватку і комплемент морської свинки, а потім - флуоресціюючу антикомплемтарну сироватку. Такий варіант набагато чутливіший першого і має більшу універсальність, так як потрібно тільки одна флуоресціююча сироватка для виявлення будь-якого вірусу. МФА істотно спрощує і прискорює серологічну діагностику інфекційних захворювань. Особливо велике значення МФА має при вивченні змішаних і хронічних інфекцій.

ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ (ІФА)

В останній час в лабораторній практиці застосовують методи, засновані на використанні ферментів як міток антигенів або антитіл. Такі методи називають методами імуноферментного аналізу (ІФА). Основні напрямки використання ІФА - це рання діагностика інфекційних і онкологічних захворювань, проведення масових епізоотичних досліджень, контроль якості продукції та дотримання санітарних норм на підприємствах медичної, біологічної та харчової промисловості. ІФА використовується для виявлення та ідентифікації збудника в патологічному матеріалі або антитіл до збудника в сироватці крові. Імуноферментний метод застосовують у двох варіантах: гістохімічному і твердофазному.

Гістохімічний метод ІФА (імунопероксидазна реакція) Для постановки реакції використовують антитіла, мічені ферментом, і облік результатів реакції проводять під світловим мікроскопом. У цьому випадку використовують антитіла, мічені пероксидазою, яка проникає крізь клітинну мембрану і стійкіша при гістологічній обробці. Матеріалом для Дослідження можуть служити мазки-відбитки органів, парафінові зрізи, мазки крові. Препарати висушують, фіксують охолодженим ацетоном, обробляють імунопероксидазним кон'югатом, потім субстратом і після промивання мікроскопіюють. У позитивних випадках (за наявності збудника в препараті) субстрат під дією ферменту розкладається, утворюючи кольоровий продукт ферментативної реакції, добре видний у світловому мікроскопі (спочатку з'являється блакитний колір, який швидко переходить у коричневий). У препараті видно або дифузне жовто-коричнє забарвлення, або гранули коричнево-чорного кольору. У контрольних препаратах фарбування не виявляють.

Методи твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA-метод - від англ. Enzyme-linked immunosorbent assay).

Методи твердофазного ІФА засновані на застосуванні антитіл (антигенів), фіксованих на нерозчинних носіях. В якості носіїв використовують скляні або нейлонові кульки, полістиролові або керамічні пробірки і мікропанелі. Зараз найбільш часто використовують полістиролові мікропанелі. Метод ІФА використовують як для виявлення антигену, так і специфічних антитіл у сироватці крові тварин. Для твердофазного ІФА використовують пероксидазні та лужно-фосфатазні кон'югати. Реакцію враховують візуально з різниці в забарвленні

дослідних і контрольних зразків або колориметрично при довжині хвилі 490 нм (для пероксидази) або 405 нм (для лужної фосфатази). За позитивний результат приймають підвищення оптичної щільності дослідних зразків над контрольними в 5-10 разів. Автоматизація імуноферментного тесту Для прискорення постановки реакції створені прилади, що виконують ряд маніпуляцій, наприклад: для промивання планшетів використовують йорш, а для читання реакції - спектрофотометри або рідери. Автоматичні спектрофотометри вимірюють ферментативну активність в 120-2000 зразках на годину, а комп'ютер перераховує величину ферментативної активності в концентрацію визначається з'єднання і виводить результати на екран монітора. Зчитування 96 результатів в одній мікропанелі займає 1 хвилину. Причому аналіз можна проводити як в лабораторії, так і в польових умовах.

Контрольні питання:

1. Методика постановки і використання в лабораторній діагностиці імуноферментного аналізу. Модифікації ІФА (ELISA-тест).
3. Переваги методів РІФ та ІФА.

Самостійна робота: вивчити методику постановки реакцій мітки (РИФ и ИФА).

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача.

Контрольні питання для модуля № 3

1. Поняття про серологічні реакції.
2. Види серологічних реакцій в залежності від характеру взаємодії між антигеном і антитілом.
3. У чому сутність феномену преципітації?
4. Техніка постановки кільцевої РП і РДП.
5. Для яких цілей застосовують реакції преципітації?
6. У чому сутність феномену аглютинації?
7. Техніка постановки КР, РБП пластинчастої РА.
8. У чому відмінність якісних і кількісних реакцій аглютинації?
9. Техніка постановки пробіркових РА (реакції Райта).
10. Облік результатів пробіркових РА.
11. Для яких цілей застосовують реакції аглютинації?
12. Різноманітність і біологічні особливості збудників інфекційних захворювань.
13. Особливості бактерій як антигенів.
14. Імунна відповідь на бактерії.
15. Біологічні особливості бактерій, що знижують ефективність імунної відповіді
16. Імунна відповідь при мікозах і мікотоксикозах.
17. Основні особливості вірусів як антигенів.
18. Імунна відповідь на віруси: неспецифічні і специфічні фактори.
19. Способи ухилення вірусів від імунної відповіді.
20. Імунна відповідь при інфекційних захворюваннях, викликаних найпростішими і гельмінтами.
21. Серологічні методи - основа діагностики інфекційних захворювань.
22. Характер і умови взаємодії антигенів і антитіл
23. Феномени взаємодії антигенів і антитіл.
24. Поняття про імунізацію.
25. Вакцинація як спосіб створення активного штучного імунітету. Види вакцин.
26. Характеристика живих вакцин.
27. Характеристика інактивованих вакцин.
28. Характеристика інших груп вакцин (синтетичних, генно-інженерних).
29. Методика використання вакцин.
30. Недоліки вакцинопрофілактики.
31. Поняття про лікувально-профілактичних та діагностичних сироватках.
32. Серопротекція як спосіб створення пасивного штучного імунітету.
33. Антиген - основний фактор регуляції імунної відповіді.
34. Регуляторний вплив антитіл
35. Ідіотипічна модуляція
36. Костимулюючі молекули і регуляція взаємодії клітин в ході запалення
37. Цитокинової регуляції імунної відповіді
38. Нейроендокринні регуляція імунної відповіді
39. Інші фактори, що впливають на імунну відповідь
40. Форми імунного реагування: антитілоутворення, кілінг, опосередкований клітинами, імунний фагоцитоз, імунологічна пам'ять, імунологічна толерантність і реакції гіперчутливості.

ФЕНОМЕН ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ. РЕАКЦІЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ (РЗК)

Мета заняття: ознайомитися методикою постановки РСК і її використанням у імунологічній лабораторії.

Методичні рекомендації

Реакція зв'язування комплементу (РСК) - це специфічна серологічна, імунологічна реакція, заснована на взаємодії антигену та антитіла тільки в присутності комплементу, в результаті реакції відбувається лізис антигену.

РСК широко використовують в діагностиці бактеріальних (сап, бруцельоз, туберкульоз) і вірусних інфекцій (ящур) тварин. У реакції зв'язування комплементу беруть участь дві системи: бактеріолітична (головна, діагностична) і гемолітична (допоміжна, індикаторна). До бактеріолітичної входять такі компоненти: досліджувана сироватка крові, антиген і комплемент.

До гемолітичної – гемолізін і еритроцити барана. Взаємодія між компонентами реакції відбувається в фізіологічному розчині.

Суть реакції: лізис антигену антитілами в присутності комплементу. Якщо в досліджуваній сироватці є специфічні антитіла (вона отримана від хворої тварини), та комплемент залежні, лізис відбувається в базову систему, а еритроцити гемолітичної системи осідають на дно пробірки. Це позитивна реакція. Якщо у досліджуваній сироватці специфічних антитіл немає (тварина здорова), то комплемент зв'язується з гемолізином і руйнує (лізує) еритроцити. У результаті суміш компонентів стає схожою на гемолізовану кров - прозора червона без осаду. Це негативна реакція.

Реакцію починають із встановлення активності гемолізину і комплементу, і тільки потім ставлять основний досвід. Реакцію найчастіше ставлять в обсязі 2,5 мл, тому кожен компонент беруть в кількості 0,5 мл.

Постановка основного дослідження

Сироватку розводять 1:5 і 1:10, прогрівають на водяній бані (температура +560 С, 30 хвилин). Крім двох пробірок з досліджуваною сироваткою необхідно ще 5 для контролю гемолізину, комплементу, еритроцитів, фізрозчину та антигену. Для постановки реакції у навчальній лабораторії використовують спрощену модель (див. таблицю).

Постановка основного дослідження РСК

Пробірка	Досліджувана сироватка	Антиген	Фізіологічний розчин	Комплемент	Гемолізін	Еритроцити барана	Результат реакції
Опит	0,5	0,5	-	0,5	0,5	0,5	?
Контроль	0,5	-	0,5	0,5	0,5	0,5	ПГ

Облік реакції проводять візуально, починаючи з контрольних пробірок. Позитивною вважають реакцію, якщо відбулася затримка гемолізу, негативною - повний гемоліз.

Результати реакції враховують по оцінюють в плюсах згідно схеми:

++++ (4 плюса)	повна затримка гемолізу, на дні пробірки осад у вигляді червоної краплі; надосадова рідина прозора і безбарвна
+++ (3 плюса)	затримка гемолізу: після осідання еритроцитів надосадова рідина прозора блідо-рожевого кольору
++ (2 плюса)	часткова затримка гемолізу: після осідання еритроцитів надосадова рідина прозора, рожевого кольору
+ (1 плюс)	слабка затримка гемолізу: незначний осад з еритроцитів, рідина червоного кольору
- (мінус)	Повний гемоліз еритроцитів: осад відсутній, рідина інтенсивно червона (лакова кров)

У імунологічній лабораторії досліджують імунологічний статус людини. Ці методи можна об'єднати в кілька груп:

▪ **Оцінка Т- клітинної системи імунітету (клітинного імунітету):**

1. визначення загального числа лімфоцитів,
2. числа зрілих Т-лімфоцитів та їх популяцій (хелперів і цитотоксичних);
3. реакція бласттрансформації лімфоцитів на Т-клітинний мітоген;
4. визначення співвідношення CD4 + / CD8 +,
5. постановка шкірних проб гіперчутливості уповільненого типу;
6. додаткові методи дослідження: дослідження продукції цитокінів; визначення проліферативної відповіді на специфічний антиген в РБТЛ;
7. визначення готовності клітин до апоптозу.

▪ **Оцінка В-клітинної системи імунітету (гуморального імунітету):**

1. визначення числа В-лімфоцитів (CD20 +, CD19 +),
2. визначення загальної кількості білка в сироватці крові і окремих його фракцій (альбуміни і глобуліни);

3. визначення кількості імуноглобулінів різних класів (IgA, IgM, IgG, IgE),
4. визначення циркулюючих в крові імунних комплексів;
5. визначення функціональної активності лімфоцитів за допомогою РБТЛ на В-клітинний мітоген;
6. додаткові методи: визначення кількості специфічних імуноглобулінів різних класів (IgA, IgM, IgG, IgE); визначення продукції інтерлейкіну-6; визначення секреторного;

▪ **Оцінка показників системи комплементу:**

1. визначення компонентів комплементу (C1, C2, C3, C4, C5 і ін.) в сироватці крові;
2. визначення функціональної активності комплементу;

▪ **Оцінка системи фагоцитів (нейтрофілів):**

1. визначення числа нейтрофілів;
2. визначення фагоцитарного числа;
3. визначення індексу фагоцитозу;
4. визначення бактерицидності фагоцитів;
5. додатковий методи: визначення активності хемотаксису фагоцитів; визначення здатності нейтрофілів до адгезії до пластика і наявності клітин з адгезивними молекулами CD11/CD18.

На сучасному етапі ветеринарних імунологічних лабораторій поки немає. Окремі дослідження проводять в обласних та науково-дослідних лабораторіях.

Контрольні питання:

1. Сутність реакції зв'язування комплементу.
2. Методика постановки РСК. Модифікації РСК.
3. Використання РСК в лабораторній діагностиці.
4. Поняття про імунний статус організму.
5. Основні методи дослідження неспецифічних факторів імунітету.
6. Основні методи дослідження гуморальних факторів імунітету.
7. Основні методи дослідження клітинних факторів імунітету.

Самостійна робота: вивчити постановку основного досвіду РСК і врахувати його результат.

Робота прийнята « » __ 201 __ р. Підпис викладача

ПІДСУМКОВЕ ЗАНЯТТЯ. МОДУЛЬ № 4

Контрольні питання:

1. Відторгнення трансплантата як імунологічний феномен. Механізм відторгнення трансплантата. Плід як потенційний трансплантат.
2. Імунологічні зміни клітинної поверхні при пухлинах. Імунна відповідь на пухлину.
3. Підходи до імунотерапії пухлин.
4. Поняття про імунодефіцитах (ВД). Первинні та вторинні імунодефіцити.
5. Аутоімунні феномени і аутоімунні захворювання (АІЗ).
6. Загальні принципи імунотерапії при імунодефіцитах і аутоімунних захворюваннях.
7. Методика постановки і використання в лабораторній діагностиці реакції імунофлуоресценції. Модифікації РІФ.
8. Методика постановки і використання в лабораторній діагностиці імуноферментного аналізу. Модифікації ІФА (ELISA-тест).
9. Переваги методів РІФ та ІФА.
10. Сутність реакції зв'язування комплементу.
11. Методика постановки РСК. Модифікації РСК.
12. Використання РСК в лабораторній діагностиці.
13. Поняття про імунний статус організму.
14. Основні методи Дослідження неспецифічних, гуморальних і клітинних чинників імунітету.

Список літератури

1. Апатенко В.М. Ветеринарна імунологія та імунопатологія: Навч. посібник для студ. вет. вузів - К.: Урожай, 1994.– 126 С.
2. Атлас по медицинской мікробіології, вірусології и иммунологии / Под ред. А.А.Воробьева, А.С.Быкова.– М.:, 2003.– 232 С.
3. Вершигора А.Е. Общая иммунология: Учеб. пособие для студ. биол. спец. вузов.– К.: Вища школа, 1990.– 735 С.
4. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология.– М.:, 2003.– 603 С.
5. Коляков Я.Е. Ветеринарная иммунология.– М.: Агропромиздат, 1986.– 270 С.
6. Маслянюк Р.П. Основи імунобіології.– Львів.: Вертикаль, 1999.– 471 С.
7. Медицинская микробиология: Учебник для вузов / Под ред В.И.Покровского/ М.:, 2001.– 765 С.
8. Панікар І.І., Скибіцький В.Г., Калініна О.С. Ветеринарна вірусологія: Підручник. К.: Вища освіта, 2004.– 432 С.
9. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для вузов / Под ред. А.А.Воробьева.– М.:, 2006.– 704 С.
10. Петров Р.В. Иммунология: Учебник для студ. мед. ин-тов.– Изд. 2-е.– М.: Медицина, 1987.– 414 С.
11. Рабсон А., Ройт А., Делвз П. Основы медицинской иммунологии: Пер.с англ. Л.А.Певницкого.– М.: Мир, 2002.– 319 С.
12. Ройт А. Основы иммунологии / Пер. с англ. Т.В.Великодворской, Т.Н.Власик, А.А.Нейфаха; Под ред. Р.Г.Василова, А.Ф.Киркина.- М.: Мир, 1991.– 327 С.
13. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология: Пер.с англ.- М.: Мир, 2006.– 592 С.
14. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: Учебник для студ. мед. вузов.– М.:, 2000.– 432 С.

ЗМІСТ

Заняття № 1	Правила роботи в імунологічній лабораторії	3
Заняття № 2	Вивчення імунокомпетентних клітин, що знаходяться в лімфоїдних органах	5
Заняття № 3	Вивчення факторів природної резистентності (на прикладі лізоциму)	7
Заняття № 4	Вивчення фагоцитарної активності клітин	8
Заняття № 5	Реакція розеткоутворення. Визначення кількості Т-лімфоцитів. Підсумкове заняття. Модуль № 1	10
Заняття № 6	Реакція розеткоутворення. Визначення кількості В-лімфоцитів	13
Заняття № 7	Реакція бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ)	14
Заняття № 8	Сироватка крові як джерело імуноглобулінів. Методи виділення окремих класів імуноглобулінів	16
Заняття № 9	Отримання антигенів (антигенних діагностикумів)	19
Заняття № 10	Отримання гіперімунних сироваток. Поняття про моноклональні антитіла	22
Заняття № 11	Підсумкове заняття. Модуль № 2	24
Заняття № 12	Серологічні реакції. Реакція преципітації (РП)	25
Заняття № 13	Модифікації реакції преципітації (реакція Асколі, РДП, реакція радіальної імунодиффузії по Манчіні)	28
Заняття № 14	Феномен аглютинації. Якісні реакції аглютинації (пластинчаста РА, РБП, кільцева проба з молоком)	30
Заняття № 15	Кількісні реакції аглютинації (пробіркових РА)	33
Заняття № 16	Реакції гемаглютинації (РГА, РЗГА, РНГА)	34
Заняття № 17	Підсумкове заняття. Модуль № 3. Феномен мітки – реакції імунофлюоресценції (РІФ), імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA)	36
Заняття № 18	Феномен зв'язування комплементу (РСК, РДСК)	39
Заняття № 19	Підсумкове заняття. Модуль № 4	42
Список рекомендованої літератури		43