

ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
“ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ”
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ

О. К. Фролов, В. В. Копійка, Є. Р. Федотов

**ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ ПО ІМУНОЛОГІЇ
«МЕТОДОЛОГІЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ССАВЦІВ»**

Рекомендовано
Міністерством освіти
і науки, молоді та спорту України
як навчально-методичний посібник
для студентів
вищих навчальних закладів

Запоріжжя
2012

УДК: 575 (076)

ББК 28.074 я 73

Рецензенти:

Доктор біологічних наук, професор, академік Академії наук Вищої школи України, завідувач кафедри мікробіології та загальної імунології Київського національного університету ім. Тараса Шевченка

В. К. Позур

Доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри клінічної імунології, алергології та ендокринології Донецького національного медичного університету,

О. С. Прилуцький

Рекомендовано Міністерством освіти і науки,
молоді та спорту України як навчально-методичний посібник
для студентів вищих навчальних закладів
Лист № 1/11-15015 від 26.09.2012 р.

Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р.

Великий практикум по імунології «Методологія імунної системи ссавців»: Навчально-методичний посібник. – Запоріжжя: Сору Art, 2012. – 152 с. – Дод.

ISBN

У навчально-методичному посібнику представлені методи загального аналізу лейкоцитів, отримання лейко- та лімфо концентратів, кров'яної плазми та сироватки для подальшого аналізу клітинного та гуморального імунітету. Наводяться методи вивчення вродженого (активність фагоцитозу, комплементу, концентрації С-реактивного білка) та адаптивного імунітету – його гуморальної та клітинної ланок. Серед новітніх методів представлені методи фенотипування лімфоцитів із застосуванням моноклональних антитіл, методи визначення цитокінів, антигенів і антитіл за допомогою імуоферментних, імунолюмінесцентних методів та методом полімеразної ланцюгової реакції.

Приведені у Додатку документи МОЗ України пояснюють права і обов'язки випускників біологічних факультетів університетів, які планують працювати у системі лабораторної служби системи охорони здоров'я.

Навчально-методичний посібник з великого практикуму по імунології «Методологія імунної системи ссавців» рекомендується для студентів біологічних і ветеринарних спеціальностей університетів та педінститутів, а також студентів медичних вузів. Може бути корисний для наукових та практичних працівників медико-біологічного профілю.

УДК: 575 (076)

ББК 28.074 я 73

Запорізький національний
університет, 2012

ISBN

Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р., 2012

ЗМІСТ

ВСТУП	5
ТЕМА 1. Вступне заняття. Методологічні аспекти імунної системи ссавців	8
ТЕМА 2. Загальний клінічний аналіз білої крові. Цитоморфометричний метод оцінки стадій гістогенезу лімфоцитів	11
ТЕМА 3. Методи отримання лейко- та лімфоконцентрату для вивчення імунокомпетентних клітин	19
ТЕМА 4. Визначення кількості і функціональної активності основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів методом спонтанного та моноклонал-антитіло-до-CD-залежного розеткоутворення з еритроцитами барана	25
ТЕМА 5. Реакція бластної трансформації лімфоцитів на мітогени та антигени. Постановка культури лімфоцитів. Метод змішаної культури лімфоцитів.....	37
ТЕМА 6. Реакція бластної трансформації лімфоцитів. Метод змішаної культури лімфоцитів. Оцінка результатів	43
ТЕМА 7. Люмінесцентний метод аналізу функціональної активності лімфоцитів із застосуванням двохвильового люмінофору акридинового оранжевого	48
ТЕМА 8. Фагоцитарна активність нейтрофілів: фагоцитарний показник, фагоцитарне число. НСТ-тест (нітросиній тетразолій): спонтанний і стимульований	52
ТЕМА 9. Методи отримання та зберігання кров'яної плазми, сироватки для серологічних імунологічних реакцій. Виявлення гетерофільних антитіл в реакції прямої гемаглютинації. Визначення специфічних інфекційних антитіл в реакції непрямой гемаглютинації (принцип методу) і в реакції зв'язування комплекменту (принцип методу)	69
ТЕМА 10. Визначення титру комплекменту за 50 %-вим гемолізом. Визначення С-реактивного білка	77
ТЕМА 11. Кількісне визначення сироваткових імуноглобулінів шляхом простої радіальної імунодифузії по Манчїні та мікротурбїдиметричним методом. Метод	

виявлення циркулюючих імунних комплексів за допомогою поліетиленгліколю 6000	88
ТЕМА 12. Сучасні методи визначення імунологічних факторів у клінічній імунології: імунолюмінесцентний, імуноферментний, метод полімеразної ланцюгової реакції	101
ДОДАТОК А Примірне положення про лікаря-лаборанта-імунолога та про лабораторію імунології.....	116
ДОДАТОК Б Інструкції до експлуатації приладів	127
ДОДАТОК В Про атестацію професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я.....	130
ДОДАТОК Д Цитоморфометричне дослідження лімфоцитів периферичної крові людини	143
ДОДАТОК Е Визначення функціонального стану лімфоцитів периферичної крові людини авідним розетковим методом	147
ДОДАТОК Ж Визначення функціональної активності лімфоцитів периферичної крові людини люмінесцентним методом із застосуванням двохвильового флуорохрому акридинового оранжевого.....	149
Список рекомендованої літератури	151

ВСТУП

Імунологія є однією з наук, яка інтенсивно розвивається. Вона з початкового знання про стійкість проти інфекцій та інвазій за останні десятиріччя перетворилася у вчення про гомеостаз. Безперечно встановлено, що основною функцією імунітету є збереження структурного гомеостазу людини згідно його генотипу на різних етапах онтогенезу. У цьому полягає його основна морфогенетична функція, тоді як цитотоксична дія проти інфекційних та неінфекційних антигенів вже є наслідком контролю і підтримки генетично обумовлених структур організму. Ці основні властивості імунітету проявляються з філогенетичним прогресом специфічності розпізнання «свого» та «чужого» від одноклітинних організмів до плацентарних ссавців. Ці фундаментальні висновки зроблені на ієрархічно упорядкованих за структурою та функцією клітинних і гуморальних імунних факторів, відкриття різноманіття яких поповнюється щорічно. Крім фундаментальних досягнень імунологія як наука з моменту свого виникнення характеризується високою ефективністю практичного використання її наукових досягнень у вакцинації, гемотрансфузії, трансплантації, у онкогенезі, соматичній патології.

Однак успіхи будь якої науки, у тому числі й імунології, тісним чином пов'язані з розвитком та засвоєнням методів її аналізу. Тому проходження великого практикуму з імунології є обов'язковим навчальним курсом при підготовці фахівців на біологічному факультеті.

Навчально-методичний посібник з великого практикуму по імунології «Методологія імунної системи ссавців» призначений для студентів вищих навчальних закладів IV рівня акредитації зі спеціальності 6.040102 «Біологія» з відповідною спеціалізацією.

Основна мета посібника полягає у закріпленні теоретичних знань з фундаментальної дисципліни «Загальна імунологія» та відповідних спецкурсів з імунології шляхом засвоєння основних методологічних напрямків аналізу стану імунної системи ссавців та оволодіння найбільш значимими з них. Серед

основних завдань є ознайомлення з емпіричними та патогенезними підходами дослідження імунного статусу. Останній підхід передбачає методологічний аналіз основних стадій імуногенезу лімфоцитів, як основних клітин імунної системи: розпізнавання відповідної структури, активацію, бластну трансформацію, проліферацію, диференцію, міграцію, ефекторні реакції зі зворотною регуляцією на всіх стадіях. До основних завдань також відноситься засвоєння лабораторних регламентів основних методів дослідження клітинного і гуморального імунітету, які застосовуються у клінічній та експериментальній лабораторній імунології. До завдань відноситься також набуття студентом вміння дати біологічну та клінічну оцінку отриманих результатів.

За підсумками вивчення курсу студент повинен знати: основні напрямки методологічних підходів аналізу стану імунної системи ссавців; принцип методу, етапи постановки, розрішальну здатність та клінічну значимість основних методів дослідження клітинного та гуморального імунітету. За підсумками вивчення дисципліни студенти повинні вміти: провести постановку основних методів дослідження клітинного та гуморального імунітету; дати біологічну та клінічну оцінку отриманих результатів.

Структура навчально-методичного посібника побудована за оптимальною педагогічною схемою: цільові установки, перелік питань для обговорення, навчальні завдання, питання до самостійної роботи. У ході виконання практичних завдань студенти повинні зробити протокольні записи у формі основного алгоритму виконаної роботи, аналітичних висновків, які зараховуються викладачем у кінці заняття. Повнота засвоєння матеріалу лабораторного заняття великого практикуму перевіряється відповіддю на аналітичні завдання/питання у кінці конкретної теми.

У перших лабораторних заняттях практикуму представлені методи загального аналізу лейкоцитів, отримання лейко- та лімфоконцентратів для подальшого аналізу клітинного імунітету. Наводяться методи отримання і зберігання плазми та сироватки крові до серологічних досліджень. Далі у посібнику приводяться методи вивчення вродженого (активність фагоцитозу,

комплементу, концентрації С-реактивного білка) та адаптивного імунітету – його гуморальної та клітинної ланок. Серед новітніх методів представлені методи фенотипування лімфоцитів із застосуванням моноклональних антитіл, методи визначення цитокінів, антигенів і антитіл за допомогою імуноферментних, імунолюмінесцентних методів та методом полімеразної ланцюгової реакції. У додатку посібника приведені приклади клінічних та експериментальних даних для наближення лабораторного заняття до виробничих потреб.

Приведені у Додатку документи МОЗ України пояснюють права і обов'язки випускників біологічних факультетів університетів, які планують працювати у системі лабораторної служби системи охорони здоров'я.

ТЕМА 1
ВСТУПНЕ ЗАНЯТТЯ. МЕТОДОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ
ІМУННОЇ СИСТЕМИ ССАВЦІВ

МЕТА: засвоїти основні напрямки аналізу імунної системи ссавців.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Методологія як метод пізнання в імунології.
2. Історичні та перспективні етапи методології імунної системи: елементарний, емпіричний, патогенезний, етіологічний, генно-інженерний.
3. Класифікація рівнів імуноаналізу: дворівневий за Р. В. Петровим (1984р.) та трьохрівневий за Чоп'як В. В. (2005 р.), коротка характеристика принципів груп методів цих рівнів.
4. Основні відділи імунологічної лабораторії з короткою характеристикою відповідного до них обладнання, матеріалів.

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Скласти структурно-логічну схему аналізу ланок клітинного та гуморального імунітету.

ЗАВДАННЯ 2. Визначити методи первинного, вторинного і третинного рівнів патогенезного підходу до аналізу імунітету.

Згідно Всеукраїнської науково-практичної конференції «Протоколи надання медичної допомоги в клінічній імунології» (7-9 вересня 2005 р., м. Львів) були розглянуті і стверджені пропозиції Головного імунолога МОЗ України проф. Чоп'як В. В. про підходи до стандартів у лабораторній імунології скринінгового та загального рівнів. Згідно цієї пропозиції передбачається трьохрівневий підхід до оцінки стану імунітету відповідно категорій клінічних та імунологічних лабораторій.

1 -й рівень - це скринінгові імунологічні дослідження, які виконуються у

всіх клініко-діагностичних лабораторіях медичних закладів районного та міського підпорядкування. Він включає:

- аналіз лейкограми з визначенням абсолютної кількості імунокомпетентних клітин;

- визначення протеїнограми електрофоретичним методом;

- визначення С-реактивного протеїну.

2-й рівень імунологічних досліджень виконується в імунологічних лабораторіях, в тому числі в складі клініко-діагностичних лабораторій:

- визначення комплементної активності сироватки за СН50;

- фагоцитарна активність (фагоцитарний показник, фагоцитарне число);

- НСТ-тест (спонтанний і стимульований);

- рівень Ig класів Ig M, Ig G, Ig A, Ig E;

- визначення рівня ЦК;

- фенотипування лімфоцитів з використанням МКАТ;

- постановка спонтанної реакції розеткоутворення з еритроцитами вівці.

3-й рівень імунологічних досліджень проводиться на базі обласних/регіональних медичних центрів клінічної імунології та алергології:

- катіонно-білковий та мієлопероксидазний тести;

- активаційні маркери (CD71, CD25, CD HLA DR);

- С3-, С4-компоненти комплементу;

- визначення активності апоптозу;

- РБТЛ на специфічні АГ та загальноклональні мітогени ФГА, КонА, МЛ;

- визначення специфічних інфекційних АТ, онкомаркерів;

- визначення рівня кріоглобулінів;

- молекулярно-генетичні методи (полімеразна ланцюгова реакція);

- визначення рівня ІФ, концентрації ІЛ, ФНП, ростових факторів;

- функціональна активність НК лімфоцитів.

Згідно резолюції даної конференції проф. каф. імунології та біохімії ЗНУ, д. м. н. Фроловим О. К. із співавторами підготовлені інформаційні листи по МОЗ України на два імунологічні методи, розроблені у відповідній

імунологічній лабораторії: «Виявлення активованих лімфоцитів крові по їх авідності до еритроцитів барана» та «Виявлення активованих лімфоцитів крові цитоморфометричним методом».

ЗАВДАННЯ 3. Отримання загального інструктажу з техніки безпеки у імунологічній лабораторії.

ЗАВДАННЯ 4. Загальна будова та інструкції роботи на основних приладах у імунологічній лабораторії (Додаток Б).

ЗАВДАННЯ 5. Організація імунологічної лабораторії і положення про лікаря-лаборанта-імунолога згідно наказу МОЗ України від 19.11.2002 р. №422 (витяги з наказу, екскурсія) (Додаток А, В).

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Які фактори визначають клітинний та гуморальний імунітет?
2. Що вивчають за допомогою методів імунохімічного аналізу?
3. Які переваги імуноферментного, імунофлуоресцентного, радіоімунного методів над іншими серологічними методами?
4. Назвати кількісні та функціональні методи оцінки імунокомпетентних клітин.
5. Яка суть емпіричного та патогенетичного підходів до оцінки імунного статусу.
6. Перелічити методи першого (скринінгові), другого та третього загальних рівнів імунологічних досліджень.

ТЕМА 2

ЗАГАЛЬНИЙ КЛІНІЧНИЙ АНАЛІЗ БІЛОЇ КРОВІ.

ЦИТОМОРФОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ОЦІНКИ СТАДІЙ ОНТОГЕНЕЗУ

ЛІМФОЦИТІВ

МЕТА: засвоїти метод аналізу відносної та абсолютної кількості лейкоцитів – першого етапу імунологічного дослідження.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Техніка взяття крові з пальця на дослідження.
2. Будова камери Горяєва.
3. Метод підрахунку лейкоцитів у камері Горяєва.
4. Техніка приготування мазка крові для аналізу формули крові.
5. Фарбування мазків крові за Гімза, Паппенгеймом.
6. Морфологічна та функціональна характеристика формених елементів крові.
7. Облік видів лейкоцитів у мазках. Складання формули крові. Медико-біологічні висновки.
8. Принцип цитоморфометричного методу. Етапи проведення цитоморфометричних досліджень лімфоцитів. Значення методу в клінічній імунології.
9. Перелік реактивів, матеріалів та обладнання, їх приготування.

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Підготовка реактивів та обладнання для постановки реакції.

1.1. Реактиви:

- 1) 2% розчин гепарина;
- 2) 3% розчин крижаної оцтової кислоти, підфарбований метиловим синім;
- 3) етиловий спирт (100⁰);

4) 96⁰ етиловий спирт;

5) 15% розчин азур-еозина за Романовським-Гімза;

6) підкислена дистильована вода (1 крапля конц. соляної кислоти на 300 мл дистильованої води).

1.2. Матеріали та обладнання:

1) капіляри на 0,1 або 0,2 мл, попередньо змочені 2% розчином гепарина та висушені в термостаті при +37⁰С;

2) одноразові стерильні списи-скарифікатори;

3) хімічно чисті знежирені предметні стекла. Для отримання такої якості предметні стекла замочують на добу в оптимальному розчині прального порошку. Миють ватяним тампоном з двох сторін і кип'ятять у новій порції миючого розчину 30 хв. Після цього стекла виполіскують у кип'яченій воді, занурюють на добу в 1% розчині соляної кислоти, виполіскують від кислоти в проточній воді, 2-х порціях дистильованої води і в новій порції дистильованої води кип'ятять 30 хв. Після чого стекла сушать і складають у закриті від пилу ємності;

4) камера Горєва;

5) пластмасові планшети для сірологічних досліджень;

6) дозовані мікропіпетки;

7) мікроскоп бінокулярний;

8) вата, бинт, фільтрувальний папір.

Техніка забору крові на дослідження.

Кров для дослідження у дорослих береться з м'якоті безіменного пальця; у дітей до 1-2 років можна брати кров з м'якоті великого пальця ноги. Безпосередньо перед проколом палець дезинфікують 96% етиловим спиртом і дають йому висохнути. Потім палець злегка стискають і роблять прокол списом до упору паралельно шкірним лініям Геда (для кращого загоєння ран). Першу краплю стирають стерильним фільтрувальним папером, а не ватою, від якої залишаються волокна. Другу і подальші краплі беруть для дослідження, заповнюють капіляр і видують на предметне скло.

ЗАВДАННЯ 2. Визначення кількості лейкоцитів у запропонованому зразку крові.

Визначення кількості лейкоцитів пробірковим способом за П'ятницьким.

У лунці планшета для сірологічних досліджень дозованою варіпіпеткою відміряють 0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти. Узятую для дослідження кров видувають з капіляра на чисті знежирені стекла і відміряють дозованою мікропіпеткою 0,02 мл (20 мкл) крові, яку вносять в лунку з 0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти. В цьому випадку розведення крові виходить 1:20. Порцію крові перемішують піпетуванням тією ж піпеткою і залишають на 1-2 хв. до повного лізису еритроцитів. Підрахунок лейкоцитів проводять в рахунковій камері Горяєва. Рахункова камера є скляною пластинкою, що має невелике поглиблення в центрі, куди поміщається розведена кров. На дні поглиблення вигравійовано дві сітки, розділені одна від одної подовжнім і двома поперечними жолобами. Перед підрахунком формених елементів крові на камеру обережно кладуть знежирене покривне скло і притирають його до країв камери шляхом притиснення великими пальцями обох рук і легкими зсувами покривного скла вгору і вниз. Доказом щільності прилягання покривного скла є поява веселкових ліній, так званих кілець Ньютона, по притертим його краям. Оскільки покривне скло накладають на бічні пластинки рахункової камери, цим створюється поглиблення, яке закрито з двох сторін (притертих) і відкрите з двох зовнішніх сторін у вигляді щілин. Через ці щілини рахункова камера заповнюється суспензією лейкоцитів. Для заповнення камери суспензію лейкоцитів в лунці з кислотою ретельно перемішують мікропіпеткою і невелику порцію суспензії піпеткою доставляють до щілини камери. Суспензія клітин, витікаючи з мікропіпетки заповнює камеру, надлишок рідини стече в жолоби. Іншу частину камери можна заповнити суспензією клітин наступного зразка лейкоцитів.

Після того, як рахункова камера заповниться суспензією клітин, приступають до підрахунку лейкоцитів. Експозиція в камері Горяєва суспензії

клітин складає близько 1 хвилини для їх рівномірного осідання на поверхні камери. Для підрахунку лейкоцитів камеру розглядають під мікроскопом і рахують формені елементи, що лежать в сітці Горяєва.

Сітка Горяєва складається з 225 великих квадратів (по 15 в кожному з рядів), 25 з них розділені на 15 маленьких квадратів (для підрахунку еритроцитів) і 100 великих порожніх квадратів зібрано в групи по 4 квадрати кожна (для підрахунку лейкоцитів). Сторони малого квадрата рівні 0,05 мм; отже площа його рівна $0,0025 \text{ мм}^2$; глибина рахункової камери рівна 0,1 мм, тому об'єм малого квадрата рівний $0,00025 \text{ мм}^3$. Великий квадрат сітки Горяєва складається з 16 малих квадратів, отже має $S=0,04 \text{ мм}^2$, а $V=0,004 \text{ мм}^3$.

Лейкоцити підраховують у 100 великих порожніх квадратах (20 х 5) площа яких рівна 4 мм^2 (площа одного великого квадрата дорівнює $0,04 \text{ мм}^2$). Кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих порожніх квадратах, ділять на 4 і перемножують на 200, одержують кількість лейкоцитів в 1 мм^3 крові. Ділять на 4 з розрахунку загальної площі 100 великих порожніх квадратів, рівної 4 мм^2 . Перемножують з розрахунку, що ступінь розведення крові дорівнює 20 (0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти і 0,02 мл крові), а глибина камери 0,1 мм. Замість вище приведених розрахунків можна кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих квадратах, помножити на 50 (якщо врахувати попередні розрахунки: $200:4=50$). Для того, щоб повторно не підраховувати один і той же лейкоцит, потрібно суворо дотримуватися певного порядку :

- рахувати ряди великих порожніх квадратів зліва направо і справа наліво, переміщуючи камеру на один ряд зверху вниз;

- у кожному квадраті потрібно рахувати елементи, що лежать в середині, а також на лівому та верхньому боці камери.

ЗАВДАННЯ 3. Визначення формули крові (приготування мазка крові, фіксація, аналіз препарату під мікроскопом, статистичний аналіз даних та медико-біологічні висновки).

3.1. Оцінка якості забарвлення препарату.

При фарбуванні за Романовським-Гімза ядра клітин мають колір від темно-синього до фіолетового, цитоплазма зрілих гранулоцитів забарвлюється у рожевий колір, а цитоплазма лімфоцитів, моноцитів і бластних клітин - у синій. Еритроцити забарвлюються в солом'яно-жовтий колір. Якщо еритроцити забарвлені в відтінки синього кольору, то препарат перефарбований і його треба повторно диференціювати в підкисляючому середовищі. Якщо еритроцити забарвлені в червоний або оранжевий колір, значить фарба роз'їдена кислотою дистильованою водою.

3.2. Мікроскопія мазків крові. Складання лейкоцитарної формули.

Для приготування мазка крові на сухе знежирене предметне скло, ближче до короткого боку, наносять піпеткою невелику краплю крові. Предметне скло слід держати на столі або у лівій руці за вузькі краї. Правою рукою приставляють шліфоване скло вузьким краєм до скла з кров'ю зліва від краплі під кутом 45° та продвинути його вправо до з'єднання з краплею крові. Почекати до тих пір, поки кров розподілиться по всьому ребру шліфованого скла, а потім легким швидким рухом провести його зправа наліво до тих пір, поки не буде вичерпана вся крапля. Крапля крові повинна бути невеликою (5-10 мкл), щоб весь мазок поміщався на склі, не доходячи 1,0-1,5 см до його краю. Не можна сильно нажимати на скло, так як більшість клітин крові можуть бути ушкодженими. Добре зроблений мазок тонкий, має жовтуватий колір та закінчується «щіточкою».

Після приготування мазки слід швидко висушити на повітрі до зникнення вологого блиску. При повільному висушуванні може змінюватися морфологія клітин крові.

Після правильного приготування мазка крові й якісного забарвлення приступають до його вивчення. Огляд мазка починають з малого збільшення,

при якому оцінюють якість мазка, але аналіз його проводять під імерсією. Слід мати на увазі, що не зважаючи на достатньо правильне технічне виконання мазка, клітини крові розподіляються не рівномірно по всьому препарату. Тому для отримання достовірних даних при підрахунку лейкоцитарної формули прийнято рахувати лейкоцити в різних ділянках мазка крові. Щоб уникнути повторного підрахунку одних і тих же лейкоцитів рекомендується рухатися по мазку крові зигзагами - лінією Меандра. Прийнято рахувати 200 лейкоцитів, відступаючи 0,3-0,5 см від основи "вусиків", рухаючись зигзагами на всю ширину мазка через 2-3 поля зору. Необхідно прагнути набрати дану кількість клітин на 1/2 мазка, де клітини розподілені найбільш оптимально без накладень. Різні види лейкоцитів, що зустрічаються при аналізі препарату, заносять в таблицю або враховують за допомогою спеціалізованого десятиклавішного лейкоцитарного лічильника. Після закінчення перегляду 200 лейкоцитів, визначають процентний вміст кожного з видів лейкоцитів. Це і є лейкоцитарна формула. Окрім процентного вмісту лейкоцитів велике значення має абсолютна кількість окремих видів лейкоцитів. Воно визначається з урахуванням загальної кількості лейкоцитів. Абсолютна кількість будь-якого виду лейкоцитів характеризує їх реальну участь в імунних реакціях. Відносну і абсолютну кількість лейкоцитів враховують у клінічній практиці. Особливо важливим для діагнозу і прогнозу є спостережувані зсуви в лейкоцитарній формулі. Названий Шилінгом "індекс зсуву ядра" виражає відношення незрілих клітин периферичної крові - юних (ю), миєлоцитів (м), метамієлоцитів паличкоядерних (п) до зрілих клітин – сегментоядерних лейкоцитів (с). Індекс зсуву лейкоцитів обчислюється за формулою: $\frac{ю + п}{с}$.

ЗАВДАННЯ 4. Проведення цитоморфометричного дослідження лімфоцитів, клініко-біологічна оцінка результатів.

Цитоморфометричні дослідження проводять у мазках паралельно з визначенням лейкоцитарної формули крові шляхом виміру діаметра 200 лімфоцитів на площі половини мазка, приготовленого з відповідного зразка крові. Виміри лімфоцитів при цитоморфометричному аналізі проводять при збільшенні об. 100х; ок. 7х за допомогою окуляр-мікрометра, ціну розподілу якого в мікрометрах (мкм) встановлюють за об'єкт-мікрометром. Визначають два діаметри лімфоцита – максимальний і мінімальний, потім встановлюють його середнє значення. Складають варіаційний ряд з інтервалом у 1 мкм. Лімфоцити об'єднують в групи: малі лімфоцити, із діаметром до 6,5 мкм (КЛ \leq 6,0 мкм); середні, з діаметром від 7 до 9 мкм (КЛ 7-9 мкм); великі – 10 мкм і більше (КЛ \geq 10 мкм). Крім варіації частот розмірних класів при цитоморфометричному аналізі обчислюють середній діаметр лімфоцитів у препараті та введений для зручності інтепретації даних, отриманих у різних лабораторіях й уніфікації цитоморфометричного методу індекс розмірності відносний (ІРв) і в абсолютних одиницях (ІРа).

$$\text{ІРв} = \frac{1 \cdot a + 2 \cdot b + 4 \cdot c}{a + b + c},$$

де a – частота КЛ \leq 6,5 мкм; b – КЛ 7-9 мкм; c – КЛ \geq 10 мкм, виражені у відсотках.

Різні множники частот КЛ у чисельнику відбивають геометричну прогресію розмірів лімфоцитів при бласттрансформації при імуногенезі після їх стимуляції. З урахуванням важливості в імунитеті кількісних зрушень клітин обчислюють ІРа за формулою:

$$\text{ІРа} = \text{ІРв} \times \text{кількість лімфоцитів у Г/л.}$$

У донорів крові молодого і середнього віку в периферичній крові кількість КЛ \leq 6,0 мкм складає 21,2 \pm 1,9%; 0,35 \pm 0,03 x 10⁹/л; КЛ 7-9 мкм - 64,5 \pm 4,5%; 1,08 \pm 0,05 x 10⁹/л; КЛ \geq 10 мкм - 14,3 \pm 1,3 %; 0,24 \pm 0,02 x 10⁹/л; середній діаметр лімфоцитів - 7,82 \pm 0,18 мкм.

ЗАВДАННЯ 5. Медико-біологічна інтерпретація клінічного прикладу (кількість лейкоцитів, лейкоформула, дані цитоморфометричного дослідження).

Згідно Додатка Д занести до лабораторного журналу клінічний приклад цитоморфометричного дослідження лімфоцитів периферичної крові людини та дати йому імунологічну інтерпретацію.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Механізм дії гепарину в антизгортаючій системі крові.
2. Склад фарбника Гімза і якості кожного компоненту.
3. Склад камери Горяєва. Чому визначену кількість лейкоцитів в 100 великих квадратах треба множити на 50?
4. Який ефект диференціювання перпаратів у підкисленій воді.
5. Дати визначення формули крові.
6. Який гістологічний механізм зсуву формули крові вліво?
7. Фізіологічні показники кількості лейкоцитів, формули крові у людей молодого віку.
8. Характеристика клітин ВЕПВ.
9. Характеристика нового патогенетичного напрямку оцінки стану імунної системи – аналіз динаміки новоутворення та міграції активованих лімфоцитів у внутрішньому середовищі організму.
10. Пристосування для цитоморфометричних вимірів.
11. Будова сітки, що використовується в цитоморфометричному аналізі.
12. Переведення вимірних діаметрів лімфоцитів з умовних одиниць у мікрометри (мкм).
13. Патогноматичне значення цитоморфометричного методу при оцінці стану імунітету.

ТЕМА 3

МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ЛЕЙКО- ТА ЛІМФОКОНЦЕНТРАТУ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН

МЕТА: вивчити фізико-хімічні та біологічні аспекти одержання лейко- та лімфоконцентратів обов'язкової умови аналізу імунокомпетентних клітин.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Стовбурова кровотворна клітина та напрямки її диференціювання.
2. Мітотичний цикл. Характеристика періодів G_1 , S, G_2 , M.
3. Гістогенез Т- і В-лімфоцитів.
4. Циркуляція лімфоцитів у організмі.
5. Принцип методів виділення лейкоцитів (шляхом гемолізу еритроцитів цільної крові, спонтанного осадження еритроцитів, склеювання еритроцитів розчином желатину) та лімфоцитів (на градієнті щільності) з цільної крові.
6. Перелік обладнання, матеріалів та реактивів, їх приготування.
7. Метод визначення життєздатності клітин.
8. Імунологічні методи вивчення кількості та функцій імунокомпетентних клітин з лейкоконцентрату.

Способи отримання лейко- та лімфоконцентрата залежать від мети дослідження та об'єму зразка крові для дослідження.

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Підготувати реактиви та обладнання для постановки реакції.

ЗАВДАННЯ 2. Отримання лейкоконцентрату шляхом гемолізу еритроцитів цільної крові (мікрометод).

Даний спосіб використовують у випадку отримання малого об'єму крові на аналіз, наприклад, з пальця в об'ємі до 0,5 мл (мікрометод).

2.1. Реактиви та обладнання.

2.1.1. Середовище 199, Ігла.

2.1.2. Гепарин без консервантів (0,25 мг/мл або 25 од./мл крові).

2.1.3. Фосфатно-сольовий буфер (рН 7,2-7,4) (ФСБ).

2.1.4. 2%-й розчин силіконового масла в ефірі.

2.1.5. Гемолітична рідина: трилон Б - 0,04 г, дистильована вода до 1 л, рН 7,2-7,4 доводять сухим гідрокарбонатом натрію.

2.1.6. 2%-й розчин трипанового синього.

2.1.7. 3%-й розчин оцтової кислоти, підфарбованої метиленовим синім.

2.1.8. Холодильник, центрифуга, камера Горяєва, піпетки, пробірки.

2.2. Одержання суспензії лейкоцитів.

Кров центрифугують при 1000 об./хв. протягом 5 хвилин. Плазму ампулюють і зберігають при -20°C для серологічних досліджень (визначення титрів антитіл, кількості сироваткових імуноглобулінів). Осад формених елементів використовують для виділення лейкоцитарної суспензії шляхом гіпотонічного шоку. З метою усунення еритроцитів до осаду додають 9 мл гемолітичної рідини. Гемоліз проводять 60 секунд при постійному перемішуванні. Потім додають 1 мл десятикратного концентрату середовища 199 або десятикратного ФСБ для припинення дії гемолітичної рідини на клітини. Існують варіанти гемолітичного шоку з дистильованою водою. Після припинення гемолізу суспензію клітин центрифугують при 1500 об./хв. 10 хвилин, піпеткою вилучають надосадову рідину, осад обережно струшують.

При наявності значного залишку еритроцитів гемолітичний шок повторюють. Після останнього центрифугування вилучають всю надосадову рідину, а її залишок - фільтрувальним папером. До одержаного осаду лейкоцитів додають середовище 199 (або культуральну суміш) в кількості вихідного об'єму крові - 0,5 мл. Підраховують кількість лейкоцитів в камері Горяєва. При необхідності концентрацію клітин збільшують центрифугуванням і видаленням надлишку рідини або зменшують додаванням потрібної кількості рідини.

Вихід лейкоцитів після гемолітичного шоку і відмивання клітин повинен складати не менше 70-80%.

ЗАВДАННЯ 3. Отримання лейкоконцентрату шляхом спонтанного осадження еритроцитів або склеювання їх розчином желатина (макрометод).

Даний метод використовують при достатній (3-5 мл) кількості крові на аналіз.

3.1. Реактиви та обладнання

10%-й розчин желатину. Інші реактиви та обладнання як у завданні 2.

Кров беруть з ліктьової вени в об'ємі 3-5 мл і більше в пробірці з гепарином (25 од./мл) або трилоном Б (1 мл 2,7%-го розчину трилона Б на 10 мл крові).

3.2. Одержання лейкоконцентрата.

Для одержання лейкоконцентрата до взятої крові додають 10% розчин желатину так, щоб його кінцева концентрація складала 1%. Кров переміщують і витримують у водяній лазні при +37°C 15-20 хвилин. Під дією желатину еритроцити склеюються у "монетні стовпці" і швидко осідають. Еритроцити аглютинують і осідають також спонтанно, але для цього треба у 1,5-2 рази більше часу, ніж при використанні желатину.

Після осідання еритроцитів плазму з лейкоцитами переносять у силіконовані пробірки і центрифугують 10 хвилин при 1500 об./хв., плазму ампулюють і зберігають при -20 С для серологічних досліджень. Надлишкову домішку еритроцитів у осаді лізують гіпотонічним шоком. Для цього до осаду

додають 2-3 мл гемолітичної рідини на 30 секунд при постійному перемішуванні. Гемоліз припиняють додаванням 5-6 мл середовища 199 або ФСБ. Центрифугують 5 хвилин при 1500 об./хв., надосадову рідину вилучають, осад розбавляють 0,5-1,0 мл середовища 199, підраховують лейкоцити в камері Горяєва і доводять до необхідної концентрації.

Для більшого виходу лейкоцитів осадження з желатиною проводять ще -2 рази. Для цього до осаду додають ФСБ до вихідного об'єму, додають 10% розчин желатину так, щоб його кінцева концентрація складала 1%. Далі проводять вилучення лейкоцитів за вказаною вище методикою.

ЗАВДАННЯ 4. Отримання лімфоконцентрату за допомогою градієнту щільності - розчину фікол-верографіну.

Відділення чистої популяції лімфоцитів від інших формених елементів крові проводять різними способами: на колонках з різними заповнювачами (вата, скло, нейлон) або кульками з різних матеріалів, вкритих імуноадсорбентами, електрофоретичним, гравітаційним методами. Останній спосіб є найбільш простим і частіше застосовується у імунологічних дослідженнях. При цьому часто використовується ізопікнічне центрифугування у середовищах, неоднорідних за щільністю. Під час центрифугування клітини розподіляються у середовищі відповідно своїй щільності. Із клітин крові найбільшу щільність мають еритроцити і в порядку зменшення - поліморфноядерні клітини, моноцити, лімфоцити. При центрифугуванні в градієнті щільності (1,077-1,078 г/мл), розробленому А. Беюмом (1974), клітини, які мають більшу щільність (еритроцити, гранулоцити), проникають в середину розчину під дією центробіжної сили і утворюють осад. Клітини (моноцити, лімфоцити), які мають ту ж або меншу щільність, ніж щільність розчину, не можуть проникнути в щільний градієнтний розчин і залишаються у верхньому його шарі (в інтерфазі).

Одержаний зразок крові розводять у співвідношенні 1:3 розчином Хенкса без Ca^{2+} і Mg^{2+} або ФСБ. Розведену кров обережно нашаровують на 3

мл розчину фікол-урографінового градієнта з щільністю 1,077-1,078 г/мл. При цьому межа розділу фаз кров/градієнт не повинна бути порушена. Відношення розведеної крові та розчину фікол-урографіну 3:1. Розчин фікол-урографіну готують наступним чином. Змішують 24 частини 9%-го розчину фіколу і 10 частин 34%-го розчину урографіну. Необхідну щільність розчину (1,077-1,078 г/мл) контролюють за допомогою денситометра. Розчин стерилізують через мембранний фільтр з діаметром пор 0,23 мкм. Врівноважені пробірки центрифугують у горизонтальному роторі протягом 35-40 хвилин при прискоренні 400 g (1500 об./хв.). Центробіжне прискорення g вираховують за формулою:

$$g=1,1 \times N^2 \times R \times 10^{-5},$$

де N - число обертів, R - радіус ротора у см, g - центробіжна сила.

Вилучають 2/3 (по висоті над фазою) рідини, а залишену 1/3 збирають разом з кільцем мононуклеарних клітин у інтерфазі. Зібрану суспензію переносять до силіконованої центрифужної пробірки, додають надлишок (6-8 мл) розчину Хенкса без Ca^{2+} і Mg^{2+} або ФСБ і проводять два послідовних центрифугування (10 хвилин при 1500 об./хв.) із зміною відмиваючого розчину. Після суспендують у 0,5 мл середовища 199 і підраховують кількість мононуклеарних клітин. Підраховують процент виходу мононуклеарів (оптимальний 75-90%). Використовують суспензії виділених клітин з 95-98% життєздатності. Потім доводять концентрацію виділених клітин до потрібної для конкретного дослідження.

ЗАВДАННЯ 5. Визначення життєздатності виділених в суспензії клітин.

Життєздатність клітин оцінюють 0,2%-м розчином трипанового синього.

ЗАВДАННЯ 6. Приведення суспензії клітин до певної концентрації після їх виділення з цільної крові.

Ознайомитись з формулою розрахунку для отримання суспензії клітин певної концентрації:

$$V1 = (V2 \times C2) / C1,$$

де V1 – об'єм, у якому буде знаходитись концентрація мононуклеарів C1;

C1 - концентрація мононуклеарів, яку необхідно отримати;

V2 – об'єм суспензії мононуклеарів у пробірці;

C2 – концентрація мононуклеарів у V2 (підраховують кількість виділених мононуклеарних клітин у камері Горяєва).

Наприклад, у 0,5 мл суспензії мононуклеарів отримали 5 млн/мл клітин. Необхідно отримати суспензію з концентрацією клітин 2 млн/мл.

Дано: V1 – X; C1 – 2 млн/мл; V2 – 0,5 мл; C2 – 5 млн/мл.

$$V1 = (0,5 \times 5) / 2 = 1,25 \text{ мл}$$

1,25 мл – 0,5 мл = 0,75 мл необхідно додати до суспензії клітин в пробірці, щоб отримати концентрацію клітин в ній 2 млн/мл.

Підготувати отримані суспензії (концентрати) клітин для постановки імунологічних методів:

- для суміші лейкоцитів довести концентрацію клітин у отриманих суспензіях до 4 млн/мл;
- для сепарованих на градієнті щільності лімфоцитів довести концентрацію клітин у отриманих суспензіях до 2 млн/мл.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Яка різниця осмотичної стійкості в гіпотонічних розчинах еритроцитів та лейкоцитів? Який їх клітинний механізм?
2. Які правила обліку лейкоцитів у камері Горяєва, коли вони лежать на гранях великих квадратів?
3. Який механізм дії розчину желатини на еритроцити?
4. Чому при центрифугуванні еритроцити та гранулоцити

проходять через фікол-верографін, а лімфоцити залишаються в інтерфазі?

5. Як визначити життєздатність лейкоцитів?

6. На яких етапах методів відбуваються втрати лейкоцитів?

7. Який склад поживної суміші для підтримання оптимальної життєдіяльності лейкоцитів?

8. Як обробити лабораторне скло для усунення адгезії лейкоцитів при постановці реакції?

ТЕМА 4

ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ І ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ОСНОВНИХ ПОПУЛЯЦІЙ ТА СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ МЕТОДОМ СПОНТАННОГО ТА МОНОКЛОНАЛ-АНТИТІЛО-ДО-CD-ЗАЛЕЖНОГО РОЗЕТКОУТВОРЕННЯ З ЕРИТРОЦИТАМИ БАРАНА

МЕТА: вивчити біологічні особливості методів та їх лабораторний регламент.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Характеристика популяцій лімфоцитів крові: Т-, В-лімфоцитів, НК.

2. Онтогенез Т-лімфоцитів, їх мембранні рецептори та CD-структури.

3. Онтогенез натуральних кілерів, характеристика їх мембранних структур.

4. Будова, функції CD2-структури та її представленість на клітинах крові людини та лабораторних тварин .

5. Структура та функції популяційних CD-структур лімфоцитів: CD3, CD20/22, CD16.

6. Структура та функції субпопуляційних CD-структур лімфоцитів: CD4, CD8.

7. Структура та функції стадіоспецифічних активаційних структур лімфоцитів: CD25, CD71, CD95, HLA-DR на Т-лімфоцитах.

8. Принцип постановки методу спонтанного Е-РУК, значення методу для лабораторної імунології.

9. Авідність CD⁺-клітин до еритроцитарного діагностикуму як відображення їх попередньої активації.

10. Перелік обладнання, матеріалів та реактивів, їх приготування.

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Ознайомитись з принципом методу спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана.

Метод заснований на здатності Т-лімфоцитів людини за допомогою відповідних рецепторів CD2-антигена спонтанно приєднувати еритроцити барана (Е-РУК) з утворенням фігур, названих розетками: в центрі лімфоцит, кругом нього – еритроцити барана (ЕБ). CD2-структура представляє собою трансмембранний білок-рецептор з дводоменною надмембранною частиною, яка за третинною структурою відноситься до гіперродини імуноглобулінів. Її N-кінцевий домен виконує роль рецептора, лігандом якого є CD58 – структура, яка міститься на всіх ядровмісних клітинах всіх тканин. Мімікринним гомологом останньої на еритроцитах барана є gp 42 кД.

За допомогою моноклональних антитіл в CD2 виявлено 3 епітопи: один з них T 11₁ зв'язує ЕБ, 2 інші (T 11₂, T 11₃) не комплементарні до ЕБ. Епітопи розрізняються за експресією (щільністю), розподілу на Т-лімфоцитах і функцією. Так, щільність в CD2 T 11₁, найбільша, а T 11₃ експресується на незрілих і активованих лімфоцитах. Така гетерогенність епітопів CD2 визначає її біологічне значення - взаємозв'язок двох функцій: адгезію і активацію. CD2 структура обумовлює адгезію Т-лімфоцитів до клітин внутрішньотимічного оточення, периферичних лімфоїдних органів, до клітин високого ендотелію посткапілярних венул, останні через відповідні ліганди забезпечують переважну міграцію активованих лімфоцитів в органи при виконанні ними імунологічних функцій. Окрім адгезії CD2 бере участь в антигеннезалежній (альтернативній) активації Т-лімфоцитів. Сумісна обробка Т-лімфоцитів

моноклональними антитілами до T 11₂ і T 11₃ епітопам приводить до їх проліферації і диференціювання у відсутності антигенної стимуляції. Така альтернативна активація доцільна для гістогенезу тимоцитів, на яких CD2 експресується рано, задовго до появи T-рецепторів. З експресією T-рецепторів у комплексі з CD3 через останній передається у клітини активуючий і мітогенний сигнал вже до антигензалежного диференціювання. Проте наявність CD2-структури різної щільності і на зрілих циркулюючих лімфоцитах свідчить про складні, по своїй суті, синергічні взаємини антигензалежної активації лімфоцитів. Виявлені функціональні зв'язки між CD2 і T-рецептором, опосередковані через CD3. Обробка CD2 відповідними моноклональними антитілами приводила до фосфориляції CD3, також як і при обробці анти-CD3 - антитілами. T-лімфоцити також активувалися комбінацією анти-CD2 і анти-CD3 - антитілами або анти - CD2 - антитілами і антитілами проти T-рецептора.

Однак потрібно мати на увазі, що комплементарність рецептора лімфоцитів до поверхневого антигену EB випадкова. У природі такої взаємодії не спостерігається. CD2-маркер бере участь в ліганд-зв'язуючих процесах регуляції бластної трансформації і проліферації лімфоцитів при імуногенезі. В-лімфоцити CD2-рецептора не мають. За розеткоутворюючий приймається T-лімфоцит, який приєднав 3 і більше EB. У людини даний рецептор низької щільності (3-5%) виявлений на фібробластах, гранулоцитах, натуральних кілерах (NK). Даний рецептор досить широко представлений на лімфоподібних клітинах безхребетних і хребетних тварин.

На користь функціонального значення CD2 при імуногенезі лімфоцитів одержані експериментальні дані *in vivo* та *in vitro* про те, що після антигенної або мітогенної стимуляції на T-лімфоцитах підвищується щільність CD2-структури, з'являються клітини з великим числом приєднаних EB, так звані "морули" або "мегарозетки". Причому ефект морул був видимим як на нефіксованих тимчасових препаратах, так і на фіксованих глутаровим альдегідом постійних препаратах. Отже, підвищена щільність і авідність до EB CD2 на циркулюючих в організмі T-лімфоцитах є залишковою ознакою їх

попередньої активації в периферичних лімфоїдних органах при імуногенезі. Експериментальні дослідження показали, що серед циркулюючих Т-лімфоцитів класи Т-лімфоцитів, які приєднали 8 і більше ЕБ (морули і мегарозетки), відносяться до активованих до вступу в мітотичний цикл лімфоцитів і за їх частотою можна оцінювати в динаміці стан Т-клітинної ланки імунітету.

ЗАВДАННЯ 2. Підготувати реактиви та обладнання для постановки реакції.

Реактиви:

1. Середовще 199 або Ігла.
2. 2%-й розчин кристалічного гепарину (0,25 мг/мл крові) або 2,7%-й розчин трилона Б, рН 7,2-7,4 (1 мл розчину на 10 мл крові).
3. Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), рН 7,2-7,4.
4. 2%-й розчин силіконового масла в ефірі.

Спосіб приготування даних реактивів приведений у методвказівці до 2-го заняття.

5. 3%-й розчин глутарового альдегіду. Готується з 26%-го розчину на ФСБ, рН 7,2-7,4 доводять сухою харчовою содою.

6. Розчин фікол-верографіна густиною 1,077-1,078 г/мл. Робочий розчин готують, змішуючи 24 частини 9%-го розчину фіколу і 10 частин 34%-го розчину урографіну. Потрібну щільність розчину контролюють денситометром.

7. Розчин Олсвера: хлористий натрій - 5,04 г, глюкоза - 24,63 г цитрат натрію - 9,6 г, дистильована вода - до 1200 мл.

8. 0,2%-й розчин трипанового синього. 20 мг трипанового синього розчиняють в 10,0 мл підігрітого до 60° ФСБ. Змішують 1:1 з суспензією лейкоцитів.

Після експозиції у 10 хвилин суспензію заправляють в камеру Горяєва. Визначають процент мертвих (зафарбованих) клітин. В подальший аналіз залишають зразки лімфоцитів з 95-98 % життєздатності клітин.

9. 15%-й розчин фарбника по Романовському-Гімза.

10. 0,5% суспензії еритроцитів барана (ЕБ) на поживному середовищі.

11. Ембріональна теляча сироватка інактивована при 56°C 30 хв абсорбована проти гетерофільних антитіл до ЕБ.

Обладнання:

1. Центрифуга з горизонтальним ротором. Центробіжна сила g за лежить від кількості оборотів ротора за одиницю часу і радіусу між центром тяжіння рідини у пробірці. Центробіжна сила виражається у вигляді формули $g = 1,1 \times N^2 \times R \times 10^{-5}$, де N - число обертів за хвилину, R - радіус ротора в см, g - центробіжна сила. Розрахунки необхідні для виділення лімфоцитів у градієнті щільності.

2. Холодильник побутовий і низькотемпературний.

3. Термостат 37°C.

4. Сухоповітряна стерилізаційна шафа.

5. Дозатори піпеточні.

6. Мікроскоп бінокулярний.

7. Інактиватор сироваток.

8. Лабораторний посуд.

9. Шприци.

ЗАВДАННЯ 3. Приготувати суспензію ЕБ.

Дефибринізовану кров барана зміщують 1:1 з розчином Олсвера, ділять на дрібні порції по 0,5-1 мл, зберігають до використання не більше 15 діб. Безпосередньо перед постановкою реакції РУК, ЕБ двічі відмивають ФСБ до зникнення слідів гемолізу, центрифугують кожний раз при 1500 об./хв. 5 хв. Надосадову рідину вилучають як можна повніше. Одержаний осад приймають за 100 %. З нього готують 1-2 мл 0,5% суспензії на культуральному середовищі (середовище 199, 20% ЕТС). Суспензію можна зберігати до 1 доби в холодильнику при 4°C. Перед використанням колотять. Оптимальне співвідношення лімфоцит-еритроцит для постановки РОК є 1:50.

ЗАВДАННЯ 4. Приготувати ембріональну телячу сироватку (ЕТС).

ЕТС одержують через аптекоуправління або на м'ясокомбінатах. Всі роботи по обробці сироватки проводять в стерильних умовах. Для інактивації комплексу ЕТС прогрівають при 56°C 30 хв. Далі адсорбують гетерофільні антитіла до ЕБ. Для цього до ЕТС додають відмиті ЕБ у співвідношенні 10:1. Суміш ретельно переміщують і інкубують при 37°C 2 год., після цього суспензію центрифугують при 1500 об./хв. 10 хв. Сироватку відбирають, розфасовують по 1 мл в ампули і зберігають при -20°C. Перед постановкою РОК одну із порцій ЕТС розморожують.

ЗАВДАННЯ 5. Виділити концентрат лімфоцитів на градієнті щільності фікол-верографіна.

2-3 мл венозної крові, взятої на антикоагулянті, розводять середовищем 199 або ФСБ. Розведену кров обережно нашаровують на 2,5-3 мл підігрітого до кімнатної температури розчину фікол-урографіна з густиною 1,077-1,078 г/мл, добиваючись, щоб межа розрізнення фаз кров/градієнт була непорушена.

Співвідношення розчиненої крові і розчину фікол-верографіну 3:1. Врівноваженні пробірки центрифугують в горизонтальному роторі 35-40 хв. при прискоренні 400 g (1500 об./хв). Після цього вилучають 2/3 (по висоті над інтерфазою) рідини, а залишок (1/3) збирають разом з кільцем мононуклеарних клітин в інтерфазі. Зібрану суспензію переносять в силіконовані центрифужні пробірки, додають надлишок (6-8 мл) ФСБ і проводять два послідовних центрифугування (10 хв., 1500 об./хв. із зміною ФСБ). Після останнього центрифугування супернатант відкидають, а осадок клітин ресуспендують в 0,5-1,0 мл культуральної суміші (середовища 199+20% ЕТС). Підрахунок концентрації мононуклеарів проводять в камері Горяєва загальноприйнятим методом. Підраховують процент виходу лімфоцитів і їх життєздатність. Процент виходу мононуклеарних клітин (лімфоцитів і моноцитів) повинен бути не нижче 75-80 %. Життєздатність оцінюють 0,2%-м розчином трипанового

синього. В роботу беруть лімфоцити з 95-98 % життєздатності. Після підрахування лімфоцитів у камері Горяєва суспензію клітин розводять середовищем 199 до 2 млн/мл і використовують для постановки РОК. Лейкоконцентрат можна одержати також шляхом гемолізу цільної крові (мікрометод) або із плазми шляхом осадження еритроцитів (макрометод). У даному випадку лейкоконцентрат містить суміш моно- і полінуклеарів, тоді як вивчають розеткоподібну здатність лімфоцитів. Тому концентрацію клітин доводять до 4 млн/мл.

ЗАВДАННЯ 6. Постановка Е-РУК/авідного розеткового методу. Аналіз препаратів. Клінічна оцінка результатів.

За етапами постановки авідний розетковий метод співпадає з алгоритмом постановки метода спонтанного розеткоутворення Т-лімфоцитів з еритроцитами барана (Е-РУК).

Із одержаної суспензії лімфоцитів (або лейкоцитів), одержаних мікро- і макрометодами, беруть 0,1 мл суспензії і змішують в центри-фужних силіконових пробірках з 0,1 мл 0,5%-ю суспензією ЕБ. Пробірки закривають гумовими корками, центрифугують 5 хв. при 1000 об./хв. Суміш інкубують у термостаті при +37°C 10 хв. і не менше 1 год. (можна залишати на 10-12 год.) в холодильнику при +4°C.

Для фіксації розеток додають 0,05 мл 3%-го розчину глютарового альдегіду на ФСБ (рН 7,2-7,4), щоб остання його концентрація дорівнювала 0,6 %. Час фіксації складає 20 хв. при кімнатній температурі. Потім для вилучення фіксатора до клітин додають 5 мл дистильованої води і центрифугують 5 хв. при 1500 об/хв. Недостатню рідину вилучають, залишаючи 0,1-0,15 мл. У цю ємкість додають 1-2 краплі ЕТС для збільшення в'язкості розчину і покращення якості мазка. Осадок ретельно піпетують, слідкують, щоб не було грудок із клітин. Одержану суспензію клітин розмішують на обезжирені предметні скла, роблять мазок, акуратно розподіляючи клітини боковою поверхнею пастеровської піпетки на 1/3-1/2 скла. Мазку дають висохнути на рівній

горизонтальній поверхні при кімнатній температурі. Фіксують 10-15 хв. в етиловому спирті, висушують і фарбують 15%-м розчином на ФБС за Романовським-Гімза. Фарбування проводять в горизонтальному положенні наливаючи зверху фарбу. Після фарбування фарбу зливають. Мікропрепарати прополіскують дистильованою водою, диференціюють 1-2 сек. в підкисленій соляною кислотою воді, виполіскують в трьох порціях дистильованої води. Сушать на повітрі. Мікроскопують під імерсією (об.90х, ок. 10х). За розеткоутворюючі приймають лімфоцити з прикріпленими до них не менше трьох еритроцитів барана.

При постановці метода застосовується додавання до культурального середовища 20% ЕТС замість автоплазми або гетерогенної сироватки. Важливість такої модифікації полягає в наступному. По-перше, з автоплазмою і чужорідною сироваткою з системи елімінуються можливі інгібітори або стимулятори розеткоутворення. По-друге, що особливо важливе, білки ЕТС створюють в середовищі онкотичний тиск для оптимальної ліганд-рецепторної взаємодії між ЕБ і Т-лімфоцитами. Тому більш достовірно виявляється авідна до ЕБ різноманітність Т-лімфоцитів, а, отже, підвищується і чутливість методу. При постановці методу тільки на культуральних середовищах без додавання кров'яних сироваток, що часто має місце в клінічних і експериментальних лабораторіях, показники Е-РУК знижуються на 15-20 %.

Аналіз препаратів. В 5-ти різних місцях препарату вивчають 200 лімфоцитів, класифікуючи їх по здатності утворювати спонтанні розетки з ЕБ (Т-лімфоцити), а серед останніх враховують авідність по кількості ЕБ, що прикріплюються. Обчислюють відносну і абсолютну кількість Е-РУК як при загальноклінічному методі і додатково до нього абсолютну і відносну кількість високоавідних активованих Т-лімфоцитів, що відносяться до $КЛ \geq 8$ ЕБ.

Із застосуванням ЕТС показники Е-РУК у здорових донорів $62,2 \pm 3,6\%$ (55-75%); $1,04 \pm 0,17 \times 10^9$ ($0,8-1,25 \times 10^9$ од./л); високоавідних активованих Е-РУК $27,8 \pm 2,1\%$; $0,46 \pm 0,04 \times 10^9$ од./л ($0,3-0,52 \times 10^9$ од./л.).

Із застосуванням моноклональних антитіл (МКА) для визначення

кількості Т- і В-лімфоцитів та їх субпопуляцій, авідний розетковий метод з ЕБ та інші розеткові методи не повинні втратити своєї клінічної значущості, оскільки відображають функціональний стан типу "рецептор-ліганд" клітинної структури, що вивчається. МКА тестують клітини по одному з епітопів даної структури, часто не пов'язаного з її активним центром. Разом з тим, показано, що в процесі синтезу ферментних або рецепторних структур, у тому числі й антиген-розпізнаючих, в їх активних центрах виникають дефекти, перешкоджаючи скріпленню з їх специфічними лігандами. Наприклад, даний механізм лежить в основі синтезу неспецифічних імуноглобулінів, кількість яких значно перевершує утворення специфічних антитіл при гуморальній реакції на будь-який антиген. Тому в клінічній практиці часто має місце зміна функціональних показників лімфоцитів при незмінній їх кількості. Так, були виявлені (М. М. Літвінова і ін.) порушення CD3- і CD2-залежних шляхів активації Т-лімфоцитів при імунодефіцитних станах у дітей при нормальній частоті в крові CD3- і CD2-лімфоцитів: 73 і 60% відповідно. Отже, при оптимальній постановці розеткових методів аналізу лімфоцитів і за допомогою МКАТ, вони взаємно доповнюють один одного.

ЗАВДАННЯ 7. Медико-біологічна інтерпретація клінічного прикладу Е-РУК/авідного дослідження. Згідно Додатка Е занести до лабораторного журналу клінічний приклад Е-РУК/авідного дослідження та дати йому імунологічну інтерпретацію.

ЗАВДАННЯ 8. Визначення кількості основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, вкритими специфічними моноклональними антитілами проти CD-структур лімфоцитів.

Принцип методу. Принцип методу оснований на визначенні субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла проти рецепторів CD3 (Т-

лімфоцити), CD4 (маркер Т-хелперів), CD8 (маркер Т-супресорів і цитотоксичних лімфоцитів), CD19 або CD22 (В-лімфоцити), CD16 (НК-натуральні кілери).

Облік результатів дослідження проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою.

Склад набору:

1. Діагностикум еритроцитарний 1 фл.
2. Інструкція з використання.
3. Паспорт.

Перелік необхідного устаткування:

1. Центрифуга.
2. Пробірки (10 мл).
3. Термостат.
4. Холодильник.
5. Автоматичні дозатори (20-200 мкл).
6. Мікроскоп з імерсійною системою.
7. Предметне скло.

Додаткові реагенти.

1. Розчин градієнта густини $d = 1,077$.
2. Фізіологічний розчин або фосфатний буфер рН 7,2-7,4.
3. 0,12% розчин глютарового альдегіду.
4. Фарба Романовського-Гімза.

Одержання лейкосуспензії. Кров беруть з вени в пробірку з гепарином (концентрація гепаріна 200-250 Од/мл). Для даних реакцій досить 3 мл крові.

Мононуклеарну завесь (лімфоцити) одержують на градієнті густини $d = 1,077$. Відмити клітини 2-3 рази фізіологічним розчином або фосфатним буфером рН 7,2-7,4. Бажана концентрація клітин у зависі 2×10^6 /мл (20 клітин у великому квадраті камери Горяєва).

Підготовка діагностикума. Погойдуванням флакона осад еритроцитів ресуспендують без піноутворення. Можливе ресуспендування стерильним

шприцем ємністю 2 мл: голкою проколюють пробку, набирають завис і випускають у флакон кілька разів (без піноутворювання).

Набирають шприцем кількість, необхідну для роботи (на одну пробу 0,05 мл) та переносять у стерильні пробірки.

Проведення дослідження.

1. У пробірки вносять 0,05 мл (50 мкл) CD-діагностикума і додають 0,05 мл лімфозависі.

2. Інкують суміші 40 хвилин при $+37^{\circ}\text{C}$.

3. Центрифугують при 1000 об./хв. протягом 5 хвилин.

4. Залишають на 1 годину у холодильнику при $+4^{\circ}\text{C}$.

5. Відбирають надосадову рідину.

6. Додають до осаду 0,05 мл 0,12% розчину глютарового альдегіду й обережно ресуспендують (без утворювання піни!). Витримують 5-7 хвилин, знов обережно ресуспензують.

7. Розлять мазок приблизно на 1 см^2 площі знежиреного предметного скла.

8. Висушують, фіксують спиртом і фарбують за Романовським-Гімза.

9. За допомогою світлового мікроскопу з імерсійною системою підраховують відсоток розеткоутворюючих лімфоцитів, зв'язавших не менше 3-х еритроцитів із CD-діагностикумами на 200 клітин. Не враховувати гранулоцити, агрегати клітин, а також лімфоцити, що потрапили в агрегати. Примітка: можливо підраховувати розеткоутворюючі лімфоцити в нативному препараті в камері Горяєва.

Оцінка результатів дослідження.

1. Відсоток Т-лімфоцитів дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD3-діагностикумом. Норма дорослих 50-80% (середнє $60\pm 5\%$); у дітей – 47-76% (середнє $55\pm 4,8\%$).

Абсолютна кількість у 1 мкл крові = $A \times Y \times C : 10\ 000$,

де: А – кількість лейкоцитів у 1 мкл крові;

У – відсоток лімфоцитів у формулі крові;

C – відсоток розеткоутворюючих Т-лімфоцитів.

2. Відсоток Т-хелперів (Тх) дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD4-діагностикумом. Норма 33-46% (середнє 40±3%).

3. Відсоток Т-супресорів (Тс) дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD8-діагностикумом. Норма 17-30% (середнє 22±1%).

ІРІ: Тх/Тс=1,4-2,0. Де ІРІ – імунореактивний індекс.

4. Відсоток В-лімфоцитів дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD22-діагностикумом. Норма 17-31% (середнє 23±3,6%). Абсолютну кількість В-лімфоцитів визначають також, як і Т-лімфоцитів.

5. Відсоток натуральних кілерів дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD16-діагностикумом. Норма 12-23% (середнє 16±4,5%).

Примітка: отримані результати залежать від якості мазків. Мазки рекомендовано робити на добре знежиреному спирт-ефіром склі у вигляді моношара. Запобігати утворення нашарування клітин.

Вимоги безпеки.

1. Діагностикум призначений тільки для діагностики *in vitro*. Категорично забороняється піпетування ротом.

2. Засобами індивідуального захисту при роботі з наборами є марлеві пов'язки та гумові рукавички.

3. Знезараження сироваток проводити згідно з наказом МОЗ СРСР №408 від 29.12.98 р. «О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в стране».

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Яке маркування рецептора до еритроцитів барану за міжнародною номенклатурою? Його біологічна роль.

2. Яка кількість Т-лімфоцитів в крові людини за нормою?

3. Який вплив ембріональної телячої сироватки або кров'яної сироватки людини 4-ї групи Rh⁺ в реакції? Навіщо необхідно її інактивувати та адсорбувати проти еритроцитів барану?

4. Яка дія глютарового альдегіду?
5. Імуногенезне значення авідного розеткового методу при оцінці імунітету.
6. Виявлення активаційних маркерів за допомогою МКАТ. Місце авідного розеткового методу серед сучасних імунологічних тестів.
7. Захворювання, пов'язані з порушенням функції Т-х і Т-к/с.
8. Методи визначення кількості та функцій Т-х і Т-к/с.
9. Інші методи визначення кількості в крові Т-х і Т-к/с.
10. Які фізіологічні межі кількості Т-х і Т-с.
11. Як зсувається співвідношення Т-х і Т-с у хворих на СНІД, алергічними захворюваннями.
12. Яка кількість CD2⁺ натуральних кілерів у периферичній крові.

ТЕМА 5

РЕАКЦІЯ БЛАСТНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ НА МІТОГЕНИ ТА АНТИГЕНИ (РБТЛ). ПОСТАНОВКА КУЛЬТУРИ ЛІМФОЦИТІВ. МЕТОД ЗМІШАНОЇ КУЛЬТУРИ ЛІМФОЦИТІВ (ЗКЛ)

МЕТА: вивчити теоретичні основи і засвоїти лабораторний регламент РБТЛ - одного з основних функціональних тестів у експериментальній імунології; вивчити біологічні і методологічні принципи змішаної культури лімфоцитів для тестування HLA сумісності при аллотрансплантаціях клітин і тканин.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Кооперативні взаємодії клітин в імунних реакціях. Роль А-клітин.
2. Клітинні взаємодії при імунологічних реакціях клітинного та гуморального типу.
3. Поліклональні мітогени: фітогемаглютинін, конканавалін А, мітоген лаконосу, ліпополісахариди. Механізми активації лімфоцитів.

4. Загальні принципи постановки і оцінки РБТЛ.
5. Специфічна на антигени РБТЛ.
6. Загальна характеристика головного комплексу гістосумісності.
7. Будова і функції антигенів гістосумісності першого і другого класів.
8. Вивчення сумісності алогенних лімфоцитів при трансплантаціях, вагітності.
9. Принцип методу, етапи постановки, клінічне значення ЗКЛ.
10. Перелік обладнання, матеріалів та реактивів, їх приготування

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Ознайомитись з принципом методу РБТЛ.

Метод заснований на моделюванні в умовах ін вітро проліферативної реакції лімфоцитів при імуногенезі. Малий лімфоцит після стимуляції антигеном або мітогеном трансформується в бластну клітину з послідуною проліферацією. Облік реакції проводять цитоморфологічним і радіометричним способами. При допомозі РБТЛ знаходять потенціальну проліферативну, а значить і функціональну проліферативну активність лімфоцитів.

ЗАВДАННЯ 2. Підготувати реактиви і обладнання.

1. Середовище 199 або Ігла.
2. Гепарин без консервантів (0,25 мг/мл); 2,7%-й розчин трилона Б, рН 7,2-7,4 (1 мл 2,7%-го розчину на 10 мл крові).
3. Фосфатно-сольовий буфер, рН 7,2-7,4.
4. Розчин фікол-верографіна (щільність 1,077-1,078 г/мл).
5. 2%-й розчин силіконового масла в діетиловому ефірі.
6. 15%-й розчин фарбника Романовського-Гімза.
7. L -глутамін (0,1 мг/мл середовища 199, Ігла).
8. L -аспарагін (0,02 мг/мл середовища 199, Ігла).
9. Інактивована ембріональна теляча сировотка (ЕТС).
10. Суміш пеніциліну і стрептоміцину або канаміцину (100 од/мл

середовща 199).

11. Митогени: фітогемагглютинин (ФГА) - 20 мкг/мл; конканавалін А (Кон А) - 60 мкг/мл.

12. Етиловий спирт 96°.

Обладнання: холодильник побутовий і низькотемпературний, центрифуга з горизонтальним ротором, термостат, сухоповітряна стерилізаційна шафа, інактиватор сивороток, бінокулярний мікроскоп, камера Горяєва, прилад для зрівноваження пробірок, лабораторний посуд.

ЗАВДАННЯ 3. Виділити лімфоцити на градієнт щільності фіколурографін (1,077-1,078 г/мл).

При проведенні реакції необхідно додержуватися суворій стерильності (посуд, інструменти, реактиви). Всі маніпуляції проводити в умовах стерильного боксу, використовувати хімічно чистий посуд із нейтрального скла. Виділяють лімфоцити із 3-5 мл цільної крові на градієнт щільності фіколурографіна по методу Бююм (1968), що описаний у методичних вказівках №2.

ЗАВДАННЯ 4. Постановка культури.

Відмиті ФСБ і середовищем 199 лімфоцити розводять 1 мл культуральною сумішшю, що складається із середовища 199 (або Ігла), 20% ЕТС, 0,1 мг/мл L-глутаміна, 0,02 мг/мл L-аспарагіна, 100 од/мл суміші пеніциліна і стрептоміцину або канаміцину. Підрахунок мононуклеарних клітин проводять в камерах Горяєва. Розраховують процент виходу лімфоцитів (не нижче 75-80 %). Життєздатність лімфоцитів визначають 0,2% розчином трипанового синього на ФСБ не нижче 95-98 %. Виходячи з розрахункової кількості виділених лімфоцитів, суспензію розводять культуральною сумішшю до концентрації 0,7-1,0 млн. на мл, розливають по 3 мл в пеніцилінові флакони, щільно закривають гумовими корками. Культуру клітин ділять на три проби: перша проба - контроль, в другу додають ФГА - 20 мкг/мл, в третю - КонА 60 мкг/мл. В контрольних зразках культури вивчають спонтанну РБТЛ, в другій

пробі, стимульованій ФГА, - загальну проліферативну активність Т-лімфоцитів; в третій з Кон А - проліферативну активність неспецифічних Т-супресорів. ФГА - екстракт із бобів "Phaseolus vulgaris" являється неспецифічним мітогеном для більшості Т-лімфоцитів. КонА - екстракт із Conavalia ensiformis в супермітогенних концентраціях (60 мкг/мл) переважно активує до проліферації неспецифічні Т-супресори.

Дослідні і контрольні зразки культури лімфоцитів поміщають в термостат при +37°C і культивують протягом 72 год. У процесі культивування слідкують за змінами рН і прозорістю культурального середовища. Середовище 199 має в своєму складі індикатор рН - феноловий червоний. У межах рН 7 він має рожевий колір, в кислому середовищі він набуває жовтого кольору, колір в лужному - насичено-червоний і далі аж до фіолетового.

ЗАВДАННЯ 5. Ознайомитись з принципом методу ЗКЛ.

Метод заснований на проліферативній реакції "відповідаючих" лімфоцитів під впливом антигенів НЛА - системи D-регіона "стимулюючих" алогенних лімфоцитів. Сила реактивності "відповідаючих" лімфоцитів залежить від ступеня відмінності між антигенами НЛА-системи "стимулюючих" лімфоцитів. "Відповідаючі" клітини, як і у випадку методу РБТЛ на антигени вступають в мітотичний цикл, трансформуються в областні клітини і проліферують. Оцінка проліферативної реакції "відповідаючих" лімфоцитів проводиться цитоморфологічним і радіометричним способом.

ЗАВДАННЯ 6. Підготовка реактивів і обладнання для постановки ЗКЛ.

Набір реактивів і обладнання для ЗКЛ такий же як і для РБТЛ на мітогени. Замість стимуляції лімфоцитів мітогенами в даному вилажу використовують мітознегативні аллогенні лімфоцити, опрацьовані мітоміцином С або іонізуючою радіацією.

ЗАВДАННЯ 7. Постановка реакції ЗКЛ.

Постановку СКЛ як і РБТЛ можна проводити мікрометодом з використанням цільної крові, і макрометодом з виділеними лейкоцитами або сепарованими лімфоцитами. Більш точні результати можна одержати при роботі з чистою популяцією лімфоцитів, виділеною на градієнті густини фіколурографіна (1,077-1,078 г/мл).

Підготовка "стимулюючих" і "відповідаючих" клітин.

"Стимулюючі" клітини (А) - це лімфоцити донора (наприклад, чоловіка при вивченні реактивності лімфоцитів матері на батьківські аллоантигени плоду) опрацьовані мітоміцином С або опромінюванням. Вони самі вже не можуть реагувати на чужі лімфоцити, бо у них подавлена здатність до проліферації, але вони зберігають здібність стимулювати аллогенні лімфоцити. "Відповідаючі" клітини (Б) - це лімфоцити реципієнта, реактивність якого ми хочемо вивчити (наприклад, вагітної жінки). В одно направленій змішаній культурі лімфоцитів ці лімфоцити відповідають імунною реакцією на аллогенні лімфоцити.

Виділені на фікол-верографіновому градієнті лімфоцити донора А і Б після відмивання ресуспендують в 3 мл середовща 199 з 20% полірованої сыворотки людини або (краще) ембріональної телячої сыворотки (ЕТС) і підраховують кількість лімфоцитів в камері Горяєва.

"Стимулюючі" лімфоцити (А) і одну третину "відповідаючих" лімфоцитів (Б) доводять до концентрації 2×10^6 лімфоцитів на 1 мл, додають 16 мкг/мл мітоміцину С (наприклад, в об'ємі 0,2 мл) і інкубують 30 хв при 37°C . Потім мітоміцин С одноразово відмивають середовищем 199 з 20 % сыворотки, осад ресуспендують в 1 мл такого же середовища, підраховують кількість мононуклеарів і їх концентрацію доводять до 1×10^6 в 1 мл. Ті, що залишилися, - дві третини "відповідаючих" клітин доводять культуральним середовищем до концентрації 1×10^6 млн/мл.

Дослідні культури одержують змішуванням 2 мл "стимулюючих" лім-

фоцитів (А) в концентрації 1 млн/мл (блоковані мітоміцином С) і 2 мл суспензії "відповідаючих" лімфоцитів (Б) також з концентрацією клітин 1 млн/мл (інтактні лімфоцити). Загальний об'єм змішаної культури складає 4 мл. Кожна така культура дублюється.

Для контролю ставиться змішана культура лімфоцитів, що складається із 2 мл оброблених мітоміцином лімфоцитів реципієнта (Б) (концентрація 1 млн/мл) і 2 мл інтактних (неопрацьованих) лімфоцитів того ж реципієнта (концентрація 1 млн/мл). Цю культуру також дублюють.

Загальна схема культивування:

- 1) дослід - А (мітоміцин) + Б (інтактні);
- 2) контроль - Б (мітоміцин) + Б (інтактні).

Після герметизації гумовими корками над рівнем рідини у флаконах повинен залишатися прошарок повітря достатньої висоти, що відіграє роль газової фази. Для цієї мети найкраще підходять флакони об'ємом 20 мл. Флакони інкубуються на протязі 7 діб в термостаті при +37°C, кожний день їх обережно струшують.

Методика роботи

Студенти розподіляються на дві групи. Перша група працює з "стимулюючими" клітинами (А), друга - з "відповідаючими" клітинами (Б). Потім з підготованих суспензій лімфоцитів А і Б ставлять в двох повторях дослідні й контрольні культури. Облік реакції проводять на наступному занятті. Зрівнюють результати дублюючих культур, обчислюють середні показники, роблять висновки, які вносять до лабораторного зошита, про ступінь реактивності "відповідаючих" клітин.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Чи можна одержати позитивні результати РБТЛ з чистими концентраціями лімфоцитів: Т-лімфоцитами, В-лімфоцитами? Чому?
2. Для чого необхідна наявність сироватки крові в культуральному середовищі? Антибіотиків, глютаміну, аспарагіну?

3. Яка концентрація клітин оптимальна для культури лімфоцитів.
4. Яка тривалість культивування?
5. Як визначити рН середовища під час культивування і способи її корекції.
6. Який механізм дії мітоміцина С. Чим його можна замінити?
7. Що таке відповідаючі лімфоцити і стимулюючі?
8. Яка оптимальна концентрація клітин в ЗКЛ?

ТЕМА 6

РЕАКЦІЯ БЛАСТНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ. МЕТОД ЗМІШАНОЇ КУЛЬТУРИ ЛІМФОЦИТІВ. ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

МЕТА: вивчити теоретичні і практичні основи цитоморфологічного і радіометричного методів оцінки РБТЛ, ЗКЛ.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Етапи імунної відповіді в периферичних лімфоїдних органах.
2. Етапи імунної відповіді, які оцінюються за допомогою РБТЛ, ЗКЛ. Клінічні межі використання вказаних методів.
3. Імуноцитопоез: клітинні морфологічні форми.
4. Лабораторний регламент оцінки РБТЛ морфологічним, радіометричним способами та люмінесцентним із застосуванням акридинового оранжевого. Переваги та недоліки кожного з них.
5. Перелік обладнання, матеріалів та реактивів, їх приготування.
6. Оцінка препаратів РБТЛ.

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Ознайомитись з принципом методу

РБТЛ заснована на аналізі проліферативної реакції лімфоцитів в культурі на мітогени і антигени. Є два основних метода оцінки РБТЛ:

цитоморфологічний і радіометричний. Кожний із них має свої позитивні і негативні сторони. При цитоморфометричному способі оцінки РБТЛ враховують морфологічні зміни стимульованих лімфоцитів у процесі імуногенезу. Малий лімфоцит після зустрічі з антигеном (мітогеном) активується і входить в мітотичний цикл. При цьому у нього збільшується ядро, цитоплазма - за рахунок розвертання білок-синтетичної системи. В остаточному підсумку лімфоцит ділиться декілька разів, утворюючи клон антигенреактивних лімфоцитів. Враховують наступні цитоморфологічні форми клітин: малий лімфоцит, малі бластні клітини (перехідні форми), великі бластні клітини і мітози.

Радіометричний спосіб оцінки РБТЛ заснований на ефекті включення H^3 -тимідину в ДНК лімфоцитів в синтетичний період мітотичного циклу. Кількість включеного ізотопу враховують при допомозі беталічильника і виражають в імпульсах за хвилину.

На даному практичному занятті РБТЛ врахуємо цитоморфометричним способом і теоретично розглянемо етапи радіометричного способу.

ЗАВДАННЯ 2. Підготувати реактиви і обладнання

Реактиви:

1. Етанол 96°.
2. 15%-й розчин фарбника по Романовському-Гімза.
3. Батарея проводки для диференціювання препаратів: підкислена соляною кислотою дистильована вода (і крапля концентрованої соляної кислоти на 300 мл дистильованої води), три порції дистильованої води.
4. Імерсійне масло.

Обладнання: центрифуга, мікроскопи, піпетки, предметне скло.

ЗАВДАННЯ 3. Приготування препаратів для оцінки РБТЛ цитоморфометричним методом.

Контрольні дослідні культури лімфоцитів піпетують і при допомозі піпетки переносять із пеніцилінових флаконів в силіконовані центрифужні пробірки. Центрифугують 5 хв. при 100 об./хв., супернатант вилучають, залишаючи 0,1-0,2 мл в якому ретельно ресупендують осад. Із одержаної суспензії готують два мазка із кожної проби, їх фіксують 5 хв. в 96° етанолу, сушать, фарбують 15%-м розчином фарбника Гімза, на буфері Соренсона (рН 6,8-7,0) 15-20 хв. Препарати диференціюють в підкисленій соляній кислоті 1-2 сек., промивають в трьох порціях дистильованої води, сушать.

ЗАВДАННЯ 4. Аналіз морфологічних форм лімфоцитів у препаратах РБТЛ.

Препарати РБТЛ мікроскопують під імерсією (об. 90х; ок. 10х). Проаналізуйте не менше 300 мононуклеарів, що знаходяться на різних стадіях бластної трансформації. Із них відрізняють: 1 - малі лімфоцити (нетрансформовані), середній розмір 7-10 мкм, щільне ядро з крупними глибокими конденсованими хроматинами, ядерце відсутнє, цитоплазма у вигляді вузького ободка із слабо вираженою базофілією; 2 - малі бласти, або перехідні лімфоцити, розмір 10-14 мкм, ядро трошки збільшене, ДНК слабо деконденсовано, є активні ядерця, цитоплазма виражена з різкою базофілією по периферії клітини; 3 - великі бласти, розмір 14-20 мкм, ядро збільшене, рихле за рахунок мілко дисперсійного деконденсованого хроматина, ядерця крупні, часто неправильної форми, цитоплазма широка, різко базофільна по периферії, можуть бути гранули і вакуолі, краї клітини нерівні, амебовидні; 4 - мітоз - клітина крупна як великий бласт, цитоплазма різко базофільна, в клітині хромосоми видні в одній із стадій мітозу (про-, мета-, ана-, телофази).

Мазок починають аналізувати з початку основи "вусиків", продивляючись поле бачення через всю ширину мазка, потроху зсуваючи препарат до початку мазка. Між полями, що продивляються, пропускають 1-2

поля бачення. Старайтесь набрати потрібну кількість клітин (300 мононуклеарів) на 1/3 мазка від початку “вусиків”. Спочатку проаналізуйте контрольний мазок із нестимульованої культури лімфоцитів. Спонтанна РБТЛ у здорових осіб знаходиться в межах 1-6%, як правило, за рахунок малих бластів. Потім проведіть аналіз дослідних мазків із культур лімфоцитів, стимульованих ФГА і КонА. Середні показники РБТЛ на ФГА: більшість Т-лімфоцитів у здорових осіб знаходиться в межах 60-80 %, знижений рівень РБТЛ – 40-59% і різко знижений - нижче 40%. РБТЛ в культурах з Кон (неспецифічні Т-супресори), як правило, нижче, ніж в культурах з ФГА на 20-30%.

Одержані результати РБТЛ запишіть в лабораторний зошит і зробіть висновок про потенційну активність лімфоцитів, а отже і про потенційну функціональну можливість лімфоцитів у обстежуваної особи.

ЗАВДАННЯ 5. Ознайомитись з основними етапами радіометричного способу оцінки РБТЛ.

При допомозі інструкції і таблиці ознайомтесь з основними етапами даного способу і занесіть їх в лабораторний зошит. Оптимальна концентрація лімфоцитів при радіометричному методі 1,5-2 млн/мл. За 16 год до завершення інкубації в кожен пробірку вносять 1 микрокюрі на мл H^3 -тімідина. Після завершення інкубації проби обробляють 10%-ю оцтовою кислотою на протязі 10 хв., центрифугують, супернатант відкидають, а до осаду додають 1-5 мл 5%-ї трихлороцтової кислоти для екстракції ДНК із клітин. Витримують 10 хв. при 4°C, осаджують на мембранні фільтри з діаметром 0,4-0,5 мкм, фіксують 2 мл 96° етанолу 5 хв., до готового матеріалу додають синтіляційну рідину (5-8 мл) і вимірюють радіоактивність в імпульсах за хвилину. Враховують індекс стимуляції (відношення досліду до контролю). У здорових осіб індекс стимуляції складає 10-20 і більше.

ЗАВДАННЯ 6. Оцінка стимулюючого ефекту в препаратах ЗКЛ.

Приготування мазків, фіксацію та фарбування проводять як і для препаратів РБТЛ. Стимулюючий ефект в змішаній культурі лімфоцитів відображає ступінь сумісності лімфоцитів двох донорів за HLA-системою. Існує два способи його оцінки, як і РБТЛ: цитоморфологічний і радіометричний. При цитоморфологічному методі оцінки аналізу беруть різницю між дослідом і контролем. Реакція вважається позитивною, якщо в змішаній культурі знаходять 7 % і більше бласттрансформованих клітин або якщо відношення цих показників для дослідної і контрольної культур перевищують 2,0 рази. Аналізують не менше 300 лімфоцитів у мазку з урахуванням наведених для РБТЛ морфологічних форм клітин.

ЗАВДАННЯ 7. Медико-біологічна інтерпретація клінічного прикладу значень у мітогенстимульованій РБТЛ і ЗКЛ.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Перелічити ядерні та цитоплазматичні ознаки бластної трансформації.
2. Який принцип оцінки РБТЛ радіометричним способом?
3. Які субпопуляції лімфоцитів трансформуються під дією ФГА, Кон А, МЛ, ЛПС?
4. Які морфологічні ознаки характерні для клітин в стадії мітозу?
5. Які показники характерні для специфічних на антигени і не специфічної на мітогени РБТЛ?
6. При яких захворюваннях має місце зниження РБТЛ?
7. Клінічна оцінка високої та низької РБТЛ в ЗКЛ в трансплантології і вагітності?

ТЕМА 7

ЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ МЕТОД АНАЛІЗУ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ЛІМФОЦИТІВ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ДВОХВИЛЬОВОГО ЛЮМІНОФОРУ АКРИДИНОВОГО ОРАНЖЕВОГО

МЕТА: вивчити і засвоїти люмінесцентний метод із застосуванням акридинового оранжевого для визначення активації імунокомпетентних клітин в процесі імуногенеза.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Фізико-хімічні основи явища люмінесценції (флуоресценції).
2. Принципова схема пристрою сучасних люмінесцентних мікроскопів.
3. Люмінесцентні фарбники, фізико-хімічна характеристика. Застосування для аналізу білків, вуглеводів, нуклеїнових кислот.
4. Загальні принципи аналізу метаболізму нуклеїнових кислот за допомогою акридинового оранжевого.
5. Співвідношення одноланцюгових та дволанцюгових нуклеїнових кислот у лейкоцитах в залежності від їх синтетичної активності.
6. Біологічне та клінічне значення люмінесцентного аналізу клітин тканин.

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Ознайомитись з принципом методу.

Метод заснований на вибірковій здатності мономерів акридинового оранжевого (АО) до інтеркаляції між нуклеотидами у фіксованих препаратах (рН 4-6) з дволанцюговими нуклеїновими кислотами (в основному з ДНК та конденсованими ділянками РНК), а його димерів - з одноланцюговими їх ділянками (в основному з РНК, а також з метаболічно активними ділянками ДНК). При цьому мономери АО флуоресцюють у максимумі довжини

світлової хвилі 530 нм (красний колір), а димери - 640 нм (зелений колір) при спектрі збудження 430 нм. Співвідношення одноланцюгових до дволанцюгових НК збільшується у процесі активації лімфоцитів за рахунок розгортання білок-синтезуючої системи у клітині. Посилення синтезу білка у лімфоцитах спостерігається на усіх стадіях імуногенезу. Білок-синтетичну активність оцінюють за інтенсивністю флуоресценції клітин імунної системи. Білок-синтетичну активність клітин імунної системи, а отже і їх функціональну активність, оцінюють за інтенсивністю флуоресценції (I) в умовних одиницях (у. о.) у спектрі 640 нм (I 640 нм), у спектрі 530 нм (I 530 нм) та за A-параметром (відношення I 640 нм до I 530 нм), запропонованого Риглером (1966).

ЗАВДАННЯ 2. Підготувати реактиви та обладнання для постановки реакції.

Реактиви:

1) Цитратно-фосфатний буфер, рН 6,0 (Мак-Ілвейна). Маточні розчини: 200 мл 0,2 М розчину двозаміщеного фосфату натрію та 200 мл 0,1 М лимонної кислоти. Для отримання робочого розчину буфера рН 6,0 змішати 126,3 мл першого та 73,7 мл другого розчинів. Рівень рН перевірити на рН-метрі і відтитрувати до потрібного маточними розчинами. Всі розчини зберігати у холодильнику при температурі +4-6°C. Робочий розчин перед роботою нагріти до кімнатної температури.

2) Робочий розчин АО 1:20000-1:30000 на цитратно-фосфатному буфері.

Готується з маточного розчину концентрації 1:1000 на дистильованій воді. Зберігається близько місяця в холодильнику у чорному футлярі.

3) Ацетон-етаноловий фіксатор. Готується шляхом змішування абсолютних ацетону та етанолу у рівних співвідношеннях.

4) Батарей спиртів понижаючої концентрації: 96°; 60°; 30°; H₂O. Розведення етилового спирту здійснюють за правилом хреста, наприклад, 60%

спирт: 60 вагових частин 96° спирту + 36 вагових частин H₂O; 30% спирт: 30 вагових частин 96 спирту + 66 вагових частин H₂O.

5) 30% розчин полістиролу в ксилолі.

Матеріали та обладнання:

1) Предметне скло.

2) Покривне скло (Германія, Чехословаччина).

3) Чашки Петрі.

4) Пінцети анатомічні.

5) Хімічні стакани.

6) Дозовані автоматичні піпетки.

7) Мікроспектрофлуориметр-2 (МСФ-2).

ЗАВДАННЯ 3. Провести постановку метода.

Мазок з цільної крові готують стандартним способом. Після висихання його фіксують у суміші ацетон/етанол протягом 20 хвилин і знову висушують. Далі його проводять по батареї спиртів понижаючої концентрації: у 96% спирті - 15 хвилин; у 60% розчині спирту - 10 хвилин; у 30% розчині спирту - 5 хвилин; споліскують у дистильованій воді та занурюють у цитратно-фосфатний буфер на 4 хвилини. Процес можна зупинити після проводки у спиртах та дистильованій воді і препарати довго зберігати (2-3 місяці) до флуорофронування у висушеному стані.

При безперервній постановці метода препарати відразу піддають флуорохромуванню. При постановці метода на стадії сухих фіксованих та проведених через батарею спиртів та дистильовану воду їх спочатку видержують у 2-х порціях дистильованої води, потім, незалежно від модифікації постановки метода, препарати інкубують при кімнатній температурі у цитратно-фосфатному буфері рН 6,0 на протязі 4 хвилин. Флуорохромують у розчині АО 1:20000 на тому ж буфері 10 хвилин. Відмивають від непрореагувавшего АО спочатку шляхом швидкого полоскання у свіжому ЦФБ, а потім у 2-х порціях такого ж буферу по 2

хвилини. Препарати накривають покрівним склом і краї окантовують від висихання буфера 30% розчином полістеролу. Після його підсихання оцінюють флуоресценцію на МСФ-2. Перед роботою він повинен прогрітися не менше 5 хвилин. Збуджуючий потік світла перекривають фільтром, який дає спектр збудження 436 нм. У даний потік ставлять зонд за діаметром не набагато більший розміру нейтрофіла. Препарати мікроскопують при збільшенні об. 100 х; ок. 10 х. У 5-ти різних місцях препарату оцінюють інтенсивність флуоресценції в умовних одиницях по 10 лімфоцитів і по 10 нейтрофілів та по 3 вільних поля зору (фон). Середні показники фону у кожному місці препарату віднімають з показників флуоресценції клітин та оцінюють їх значення у спектрах 530 нм та 640 нм і за А-параметром для кожної клітини. Дані показники флуоресценції складають за кожним типом клітин - для лімфоцитів та нейтрофілів - і роблять висновки про стан білок-синтетичної системи клітин крові.

У здорових осіб середнього віку вони наступні:

Тип клітин крові	Інтенсивність флуоресценції в у.о. у спектрах		А-параметр
	640 нм	530 нм	
Лімфоцити	0,41	1,62	0,25
Нейтрофіли	0,15	2,8	0,05

У ряді випадків складають гістограму клітин за інтенсивністю флуоресценції з метою виявлення долі клітин з найбільшим ступенем флуоресценції, що є активованими за рахунок протікаючого імуногенезу.

ЗАВДАННЯ 4. Медико-біологічна інтерпретація клінічного прикладу даних люмінесцентного методу.

Згідно Додатка Ж занести до лабораторного журналу клінічний приклад визначення функціональної активності лімфоцитів периферичної крові людини,

пофарбованих з використанням двохвильового флуорохрому акридинового оранжевого та дати йому імунологічну інтерпретацію

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Дати визначення явищам люмінесценції, флуоресценції, фосфоресценції, хемілюмінесценції.
2. Яке співвідношення довжин хвиль спектру поглинання та спектру люмінесценції.
3. Який спектр люмінесценції мономерів та димерів акридинового оранжевого.
4. Який спектр люмінесценції одноланцюгових РНК та дволанцюгових ДНК, що пофарбовані акридиновим оранжевим?
5. Характеристика α -параметру у відношенні одноланцюгових та дволанцюгових нуклеїнових кислот.
6. Оцінити метаболічний (функціональний) стан лімфоцитів за рівнем α -параметру: 0,3; 0,7; 1,2, якщо урахувати, що α -параметр чистих фракцій ДНК, пофарбованих акридиновим оранжевим знаходиться у межах 0,2-0,25.

ТЕМА 8

ФАГОЦИТАРНА АКТИВНІСТЬ НЕЙТРОФІЛІВ: ФАГОЦИТАРНИЙ ПОКАЗНИК, ФАГОЦИТАРНЕ ЧИСЛО. НСТ-ТЕСТ (НІТРОСИНІЙ ТЕТРАЗОЛІЙ): СПОНТАННИЙ І СТИМУЛЬОВАНИЙ

МЕТА: вивчити теоретичні основи і засвоїти лабораторний регламент методу визначення фагоцитарної активності нейтрофілів - першої лінії вродженого захисту організму від проникнення антигенів та основної ланки в ініціації специфічної імунної відповіді. Вивчити теоретичні основи і засвоїти лабораторний регламент спонтанного НСТ-тесту, який відображає ступінь функціонального подразнення фагоцитуючих клітин та їх здатність до кілінгу та стимульованого НСТ-тест, що характеризує потенціальну активність

фагоцитуючих клітин і розглядається як критерій їх готовності до завершеності фагоцитозу.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Морфологічна та функціональна характеристика формених елементів крові, що мають функцію фагоцитозу.

2. Етапи фагоцитозу.

3. Зв'язок фагоцитозу з лімфоцитарним клональним імунітетом в гострій запальній реакції.

4. Принцип методу, етапи постановки та його клінічне значення.

5. Перелік обладнання, матеріалів та реактивів, їх приготування.

6. Методи вивчення фагоцитарної активності нейтрофілів.

7. Гостра запальна реакція, її стадії: судинна, клітинна. Біологічне значення.

8. Роль фагоцитозу при гострій запальній реакції.

9. Кисневозалежні та кисневонезалежні механізми фагоцитозу.

10. Роль Т-лімфоцитів у регуляції фагоцитозу.

11. Принцип методу спонтанного НСТ-тесту при оцінці фагоцитозу нейтрофілів.

12. Визначення потенційної активності фагоцитуючих клітин за допомогою стимульованого НСТ-тесту.

13. Перелік обладнання, матеріалів та реактивів, їх приготування для постановки спонтанного та стимульованого НСТ-тесту.

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Принцип методу, значення методу в клінічній імунології.

Фагоцитоз - це процес, який об'єднує розпізнавання об'єкту фагоцитозу, його поглинання, руйнування і виведення з організму. Процес фагоцитозу можна розділити на дві фази. У першій фазі чужорідний

матеріал зв'язується на поверхні мембрани фагоцитуючих клітин. В другій фазі проходить поглинання чужорідного матеріалу і його подальше руйнування. Розрізняють два основних типи клітин фагоцитів – мононуклеарні (основні з яких моноцити/макрофаги) й полінуклеарні (в основному нейтрофіли) лейкоцити. Мононуклеарні фагоцитуючі клітини відіграють важливу роль в ініціації імунної відповіді шляхом захоплення антигену, презентації його Т-лімфоцитам і секреції цитокінів - біологічно активних речовин, які мають регуляторні й захисні властивості. Полінуклеарні нейтрофіли - це перша лінія захисту від проникнення в організм різноманітних бактерій, грибів і найпростіших. Фагоцитарна активність нейтрофілів, як й інших фагоцитуючих клітин, відіграє значну роль протягом всього запального процесу аж до регенерації ушкодження в тканинах. Однак зниження фагоцитарної функції нейтрофілів може привести до хронізації запального процесу, який з гомеостатичного може перейти в імунопатологічний, наприклад, шляхом підтримки алергічного або аутоімунного процесу за рахунок порушення фагоцитами здатності до руйнування та виведення імунних комплексів із організму. Тому визначення показників фагоцитозу має значення в комплексній оцінці і діагностиці імунодефіцитних станів при часто рецидивуючих гнійно-запальних процесах, алергічних, аутоімунних хворобах, післяопераційних ускладненнях та ін. У зв'язку з тим, що фагоцити приймають участь в елімінації імунних комплексів, активність фагоцитозу тісно пов'язана з активністю С3-компонента комплементу та концентрацією Ig M та Ig G-антитіл.

Дослідження активності фагоцитозу відіграє важливу роль при аутоімунних та алергічних захворюваннях. Найбільш інформативними показниками для оцінки активності фагоцитозу вважають фагоцитарний показник та фагоцитарне число.

Принцип методу: метод базується на фагоцитозі нейтрофілами часток (латексу, дріжджів, кокових бактерій), який візуалізується в цитоплазмі

клітин у вигляді гранул синього кольору.

ЗАВДАННЯ 2. Підготовка реактивів, матеріалів та обладнання для постановки реакції.

Реактиви:

1. Концентрований розчин латексу діаметром 1-3 мкм
2. Дріжджі сухі гранульовані
3. Натрій лимоннокислий
4. Натрій хлористий
5. Фарба-фіксатор Май-Грюнвальда
6. Фарба Романовського-Гімзи
7. Масло імерсійне для мікроскопії
8. Спирт етиловий 96⁰
9. Ефір для наркозу стабілізований
10. Вода дистильована

Обладнання:

1. Дозатори медичні лабораторні з наконечниками
2. Ваги
3. Центрифуга лабораторна
4. Термостат
5. Мікроскоп бінокулярний, об'єктив (100 х), окуляр (7 х).
6. Лабораторний лічильник для підрахунку клітинних елементів крові СЛ-
7. Секундомір механічний
8. Колба мірна ємністю 100 -1000 мкл
9. Циліндр ємністю 100-1000 мл.
- 10.Стакани скляні лабораторні
11. Ємності з темного скла з притертим корком
- 12.Пробірки мірні лабораторні ємністю 10 мл
- 13.Побірки поліетиленові ємністю 1,5 мл

14.Штатив поліетиленовий для пробірок

15.Предметне скло

16. Шліфоване скло

17.Скляні палички

ЗАВДАННЯ 3. Приготування реактивів для постановки методу визначення фагоцитраної активності нейтрофілів.

3.1. Підготовка реактивів для визначення фагоцитраної активності нейтрофілів з частками латексу.

3.1.1. 3,8% розчин натрію лимоннокислого: наважку натрію лимоннокислого 3,8 г перенести в мірну колбу ємністю 100 мл, розчинити в дистильованій воді та довести об'єм до мітки. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком при температурі від +40С до +60С протягом одного тижня.

3.1.2. 0,9 % розчин натрію хлористого: наважку натрію хлористого 0,9 г перенести в мірну колбу ємністю 100 мл, розчинити в дистильованій воді та довести об'єм до мітки. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком при температурі від +4°С до +6°С протягом одного місяця.

3.1.3. Робочий розчин латексу: до 0,1 мл стандартної суспензії латексу додати 0,9мл розчину 0,9% натрію хлористого, перемішати.

З отриманого завису готують робочий завис латексу згідно стандарту мутності так, щоб при фотометруванні при довжині хвилі 640 нм екстинкція становила 1,1. Для цього до 0,1 мл попередньо розведеного завису латексу необхідно додати 9,7-9,9 мл 0,9% розчину натрію хлористого, що дорівнює 150-200 часточок латексу в 1 мл. Завис стабільний протягом тривалого часу при зберіганні при температурі від +4°С до +6°С за умов використання стерильного посуду і розчину натрію хлористого.

3.1.4. Робочий розчин фарби Романовського-Гімзи: робоче розведення готової фарби повинен визначати дослідник шляхом титрування; готують декілька розведень - 1, 2, 3 краплі барвника на 1 мл дистильованої води, далі

фарбують мазки різними розведеннями, обирають мазок із найкращим забарвленням, чим і визначають тигр барвника. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком при температурі +4°C до +6°C протягом одного місяця.

3.1.5. Суміш Нікіфорова: змішати 1 об'єм спирту етилового 96° з 1 об'ємом ефіру. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком у прохолодному місці, віддаленому від вогню.

3.1.6. Підготовка предметних скелець до роботи: занурити предметні скельця у суміш Нікіфорова не менше ніж на 2 год. Оброблене предметне скло витягнути із суміші за допомогою пінцета, протерти марлею або фланеллю.

3.2. Підготовка суспензії дріжджів.

Свіжі або ліофілізовані пекарські дріжджі розводять фізіологічним розчином у співвідношенні об'єм/об'єм 1:5 і видержують на киплячій водяній лазні 60 хвилин. Отриману концентровану суспензію дріжджів центрифугують при 1000 об./хв. протягом 10 хвилин. Для приготування робочого розчину додають 0,1 мл осаду дріжджів на 10 мл фізіологічного розчину.

ЗАВДАННЯ 4. Постановка реакції фагоцитозу нейтрофілів. Оцінка результатів.

4.1. Хід роботи по визначенню фагоцитраної активності нейтрофілів з дріжджами.

4.1.1. До 100 мкл крові, стабілізованої гепарином, додати 50 мкл робочого розчину дріжджів. Акуратно перемішати.

4.1.2. Поставити в термостат на 30 хвилин (+37°C).

4.1.3. Приготувати мазок.

4.1.4. Поставити на інкубацію в термостат ще на 60 хвилин (+37°C).

4.1.5. Приготувати мазок.

Таким чином, мазки готують на 30-й і 90-й хвилинах інкубації. Кожні 10

хвилин суспензію акуратно перемішувати.

4.1.6. Висушування мазків.

4.1.7. Фіксація препаратів у етиловому спирті (96°) 15 хвилин.

4.1.8. Фарбування мазків за Паппенгеймом (комбіноване фарбування за Май-Грюнвальдом та Романовським-Гімза).

4.1.9. Оцінка результатів. Визначають фагоцитарний індекс, фагоцитарне число.

4.2. Хід роботи по визначенню фагоцитраної активності нейтрофілів з частками латексу.

4.2.1. Виділити лейкоконцентрат за допомогою желатину (див. лабораторну роботу №3).

4.2.2. 0,1 мл лейкоконцентрату, що досліджується, дозатором лабораторним перенести в пробірку поліетиленову і додати 0,1 мл робочого розчину латексу, добре перемішати.

4.2.3. Суміш інкубувати в термостаті при температурі +37°С протягом 30 хвилин. Час інкубації контролювати секундоміром. Кожні 10 хвилин вміст пробірок обережно перемішувати.

4.2.4. Після інкубації пробірки центрифугувати 5 хвилин при 1000 об./хв., відібрати надосадову рідину за допомогою дозатора лабораторного.

4.2.5. Дозатором лабораторним з верхнього пласту клітин відібрати 7-8 мкл лейкоконцентрату, перенести його на предметне скло і рівномірно розподілити по поверхні скла тонким шаром за допомогою шліфованого скла.

4.2.6. Отримані мазки висушити при кімнатній температурі.

4.2.7. Мазки зафіксувати фарбою-фіксатором Май-Грюнвальда протягом 40 сек. Час фіксування контролювати секундоміром. Фарбу змити дистильованою водою, мазок висушити на повітрі при кімнатній температурі.

4.2.8. Мазки фарбувати робочим розчином фарби Романовського-Гімзи протягом 20 хвилин. Час фарбування контролювати секундоміром.

Фарбу змити дистильованою водою, мазок висушити на повітрі при кімнатній температурі.

4.1.9. Оцінка результатів. Підрахунок результатів проводять за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву (100x), окуляр (7x). Підрахунок проводять на 200 нейтрофілів і визначають відсоток тих клітин, які містять у своїй цитоплазмі часточки латексу (включення синього кольору).

Вираховують показники, які характеризують стан фагоцитозу: Фагоцитарний показник (ФП) - відсоток нейтрофілів, які приймають участь у фагоцитозі.

$$\text{ФП} = \frac{\text{кількість клітин з включеннями латексу}}{\text{загальна кількість підрахованих клітин}} \times 100\%$$

Фагоцитарне число - середня кількість часточок латексу, захоплених одним нейтрофілом крові. Характеризує поглинальну здатність нейтрофілів.

$$\text{ФЧ} = \frac{\text{сумарна кількість часточок латексу в клітинах}}{\text{кількість клітин з включеннями латексу}}$$

Норма:

Фагоцитарний показник - 50-80 %

Фагоцитарне число — 4-9

ЗАВДАННЯ 5. Медико-біологічна інтерпретація клінічного прикладу даних реакції фагоцитозу.

ЗАВДАННЯ 6. Загальна характеристика принципу методу спонтанного та стимульованого НСТ-тесту з хімічною інтерпретацією реакції.

Тест з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест) відображає ступінь активації кисневозалежних механізмів бактерицидності фагоцитуючих клітин. За допомогою цього тесту можна виявити наявність "метаболічного вибуху", який виникає в фагоцитуючих клітинах і супроводжується збільшенням споживання кисню, інтенсифікацією гексозомонофосфатного шляху розщеплення вуглеводів, а також зростанням утворення пероксиду водню і супероксидного аніону.

Суть реакції полягає в тому, що НСТ змінює забарвлення в присутності активних форм кисню. Внаслідок реакції поглинутий лейкоцитами нітросиній тетразолій (жовтого кольору) відновлюється в темно-синій диформазан. Підрахунок нейтрофілів з гранулами синього кольору дозволяють визначити частку нейтрофілів з активними формами кисню.

Спонтанний НСТ-тест з клітинами без стимуляції відображає ступінь функціонального подразнення фагоцитуючих клітин та їх здатність до клінінгу. Стимульований НСТ-тест характеризує потенціальну активність фагоцитуючих клітин і розглядається як критерій їх готовності до завершеності фагоцитозу. При застосуванні стимульованого НСТ-тесту проводиться штучна стимуляція клітин бактеріальним ендотоксином, зимозаном тощо.

Показники НСТ-тесту використовуються для діагностики природженого дефекту бактерицидної функції фагоцитів, причиною якого є блокада утворення кисневозалежних бактерицидних факторів. Крім того, дані НСТ-тесту можуть бути підвищені при алергічних станах та паразитарних інвазіях. При хронічній гранульоматозній хворобі показники цих тестів, які стійко перевищують норму, свідчать про активацію в організмі бактеріального процесу і може застосовуватися для диференційної діагностики бактеріальних інфекційних хвороб від вірусних.

Принцип спонтанного та стимульованого НСТ: метод базується на піноцитозі нейтрофілами світло-жовтого розчину НСТ (тетразолію

нітросинього), який відновлюється в цитоплазмі клітин до нерозчинної форми - диформазану, який має темно-синій колір.

ЗАВДАННЯ 7. Підготовка обладнання, матеріалів та реактивів.

7.1. Обладнання, матеріали та реактиви для спонтанного НСТ-тесту.

7.1.1. Реактиви:

1. Нітросиній тетразолій (НСТ)
2. Диметилсульфоксид (ДМСО)
3. Сафранін
4. Натрій лимоннокислий
5. Натрій хлористий
6. Натрій фосфорнокислий однозаміщений
7. Натрій фосфорнокислий двоаміщений
8. Масло імерсійне для мікроскопії
9. Спирт етиловий 96⁰
10. Ефір для наркозу стабілізований
11. Вода дистильована

7.1.2. Обладнання:

1. Дозатори медичні лабораторні з наконечниками
2. Ваги 2 кл. точності
3. Іономір універсальний
4. Центрифуга лабораторна
5. Термостат
6. Термометр
7. Секундомір механічний
8. Мікроскоп бінокулярний, об'єктив (90 x), окуляр (7 x).
9. Лабораторний лічильник для підрахунку клітинних елементів крові
10. Колби мірні ємкістю 100 - 1000 мл
11. Цилінри ємкістю 100 -1000 мл
12. Стакани скляні лабораторні

13.Пробірки мірні лабораторні ємкістю 10 мл

14.Пробірки поліетиленові ємкістю 1,5 мл

15.Штатив поліетиленовий для пробірок

16.Предметне скло

17.Шліфоване скло

18.Скляні палички

7.1.3. Приготування реактивів.

1. 3,8 % розчин натрію лимоннокислого: наважку натрію лимоннокислого 3,8 г перенести у мірну колбу ємкістю 100 мл, розчинити в дистильованій воді та довести об'єм до мітки. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком при температурі від +4° до +6°С протягом одного тижня.

2. Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) рН 7,2: наважки натрію хлористого 8,2 г, натрію фосфорнокислого двозаміщеного 1,6 г, натрію фосфорнокислого однозаміщеного 0,2 г, розчинити дистильованою водою в стакані. Перевірити і при необхідності довести рН до 7,2. Кількісно перенести розчин у мірну колбу ємкістю 1000 мл та довести об'єм до мітки, перемішати. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком при температурі від +4° до +6°С протягом одного місяця.

3. 0,2% розчин НСТ: наважку НСТ 2 мг розчинити в 100 мкл ДМСО і довести об'єм розчину до 1 мл ФСБ. Розчин приготувати в день постановки методу.

4. 1% розчин сафраніну: наважку сафраніну 1,0 г перенести в мірну колбу ємкістю 100 мл розчинити дистильованою водою та довести об'єм до мітки. Розчин зберігати у флаконах з темного скла з притертим корком при температурі від +4° до +6°С протягом одного місяця.

5. Суміш Нікіфорова: змішати 1 об'єм спирту етилового 96° з 1 об'ємом ефіру. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком у прохолодному місці віддаленому від вогню.

6. Підготовка предметних скелець до роботи: занурити предметні скельця у суміш Нікіфорова не менше ніж на 2 год. Оброблене предметне скло

витягнути із суміші за допомогою пінцета, протерти марлею.

7.2.Обладнання, матеріали та реактиви для стимульованого НСТ-тесту.

7.2.1 Реактиви:

1. Нітрисиній тетразолій (НСТ)
2. Диметилсульфоксид (ДМСО)
3. Зимозан
4. Сафранін
5. Натрій лимоннокислий
6. Натрій хлористий
7. Натрій фосфорнокислий однозаміщений
8. Натрій фосфорнокислий двоаміщений
9. Масло імерсійне для мікроскопії
- 10.Ефір для наркозу стабілізований
- 11 .Спирт етиловий 96°
- 12.Вода дистильована

7.2.2. Обладнання:

1. Дозатори медичні лабораторні з наконечниками
2. Ваги 2 кл. точності
3. Центрифуга лабораторна ОПН-3
4. Термостат
5. Іономір універсальний
6. Магнітна мішалка/ступка
7. Секундомір механічний
8. Мікроскоп бінокулярний, об'єктив (90x), окуляр (7x).
9. Лабораторний лічильник для підрахунку клітинних елементів крові
- 10.Термометр
- 11 .Колби мірні ємкістю 100-1000 мл
- 12.Цилінри ємкістю 100- 1000 мл

- 13.Стакани скляні лабораторні
- 14.Пробірки мірні лабораторні ємкістю 10 мл
- 15.Пробірки поліетиленові ємкістю 1,5 мл
- 16.Штатив поліетиленовий для пробірок
- 17.Предметне скло
- 18.Шліфоване скло
- 19.Скляні палички

7.2.3. Приготування реактивів.

1. 3,8% розчин натрію лимоннокислого – див. п. 2.1.3.
2. Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) рН 7,2 - див. п. 2.1.3.
3. 0,2% розчинНСТ - див. п. 2.1.3.

4. 0,15М розчин натрію хлориду: наважку натрію хлориду 8,78 г перенести в мірну колбу ємкістю 1000 мл розчинити в 800 мл дистильованої води і довести об'єм до мітки дистильованою водою. Розчин зберігати у флаконах з темного скла з притертим корком при температурі від +4° до +6°С протягом місяця.

5. Приготування 0,5% суспензії зимозану: наважку зимозану 100 мг розчинити в 10 мл 0,15М розчину натрію хлористого, поставити на киплячу водяну баню на 30 хв. Зняти з водяної бані і протягом 20 годин розмішувати за допомогою магнітної мішалки. Подрібнення зимозану також можна проводити іншим способом: наважку зимозану 100 мг розтирати в ступці протягом 1 год., додаючи по краплях 10 мл 0,15М розчину натрію хлористого. Ступінь подрібнення перевірити під мікроскопом. Отриману суспензію зимозану центрифугувати 10 хвилин при швидкості обертання 1500 об./хв., надосадову рідину відібрати, а осад ресуспендувати в 20 мл 0,15М розчину натрію хлористого. Отримана 0,5% суспензія зимозону стабільна протягом одного тижня при зберіганні при температурі +3-+4°С.

6. Одержання стандартної донорської сироватки: для приготування стандартної донорської сироватки необхідно змішати в рівних співвідношеннях сироватку крові 4-5 донорів, отриману, як вказано нижче.

Розфасувати по 1-2 мл у пробірки поліетиленові, заморозити та зберігати протягом двох тижнів при температурі -20°C .

Безпосередньо перед виконанням дослідження сироватку крові розморожують на бані водяній лабораторній при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ (до повного відтаювання пробірку струшувати). Після відтаювання сироватка повинна бути абсолютно прозорою.

7. Опсонізація зимозану: до 0,5 мл приготованої 0,5 % суспензії зимозану додати 0,5 мл стандартної донорської сироватки, інкубувати в термостаті при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хвилин. Після інкубації пробірки центрифугувати 5 хвилин при 1500 об./хв., надосадову рідину відібрати, а осад одноразово відмити ФСБ та ресуспендувати в 10 мл ФСБ. Приготовлений розчин зимозану використовують для проведення дослідження. Опсонізацію зимозану проводять перед кожною постановкою стимульованого НСТ-тесту (ex tempore).

8. 1% розчин сафраніну - див. п. 2.1.3.

9. Суміш Нікіфорова: змішати 1 об'єм спирту етилового 96° з 1 об'ємом ефіру. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком у прохолодному місці віддаленому від вогню.

10. Підготовка предметних скельць до роботи: занурити предметні скельця у суміш Нікіфорова не менше ніж на 2 год. Оброблене предметне скло витягнути із суміші за допомогою пінцета, протерти марлею.

ЗАВДАННЯ 8. Отримати лейкоконцентрат з цільної крові шляхом осадження еритроцитів желатином (див. лаб. заняття №3).

ЗАВДАННЯ 9. Постановка спонтанного НСТ-тесту. Оцінка результатів.

9.1. Постановка спонтанного НСТ-тесту. Хід роботи.

1. У пробірку поліетиленову дозатором лабораторним внести 0,1 мл лейкоконцентрату і 0,1 мл 0,2% розчину НСТ.

2. Інкубувати 30 хвилин при температурі 37°C в термостаті. Час

інкубації перевіряти за секундоміром. Кожні 10 хв. вміст пробірок обережно перемішувати.

3. Після інкубації пробірки центрифугують 5 хвилин при 1000 об./хв., отриману надосадову рідину відібрати за допомогою дозатора лабораторного і вилити.

4. Дозатором лабораторним з верхнього пласту еритроцитів відібрати 7-8 мкл лейкоконцентрату, перенести його на предметне скло і рівномірно розподілити по поверхні скла тонким шаром за допомогою шліфованого скла.

5. Отримані мазки висушити на повітрі при кімнатній температурі.

6. Зафіксувати етиловим спиртом 96° протягом 20 хвилин.

7. Фарбувати 1 % розчином сафраніну протягом 1-3 хв. Час фарбування контролювати за секундоміром. Фарбу змити дистильованою водою, мазок висушити на повітрі при кімнатній температурі.

9.2. Оцінка результатів

Підрахунок результатів проводять за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву (100x), окуляр (7x). Підрахунок проводять на 200 нейтрофілів і визначають відсоткове число нейтрофілів, які містять в своїй цитоплазмі гранули темно-синього кольору (НСТ-позитивні нейтрофіли).

Норма: 5-12%.

ЗАВДАННЯ 10. Постановка стимульованого НСТ-тесту. Оцінка результатів.

10.1. Постановка стимульованого НСТ-тесту. Хід роботи.

1. У пробірку поліетиленову дозатором лабораторним внести 0,1мл лейкоконцентрату і 0,1 мл опсонізованого зимозану.

2. Інкубувати при температурі +37⁰С протягом 30 хв. в термостаті. Час інкубації перевіряти за секундоміром. Кожні 10 хв. вміст пробірок обережно перемішувати.

3. Після інкубації проби відмити від зимозану ФСБ шляхом центрифугування протягом 5 хв. при 1000 об./хв., отриману надосадову рідину відібрати за допомогою дозатора лабораторного, осад ресуспендувати піпетуванням.

4. До осаду клітин додати 0,1 мл 0,2% розчину НСТ.

5. Інкубувати при температурі +37⁰С протягом 30 хв. в термостаті. Час інкубації перевіряти за секундоміром. Кожні 10 хв. вміст пробірок обережно перемішувати.

6. Після інкубації проби центрифугувати протягом 5 хвилин при швидкості обертання 1000 об./хв., отриману надосадову рідину обережно відібрати за допомогою дозатора лабораторного і вилити.

7. Дозатором лабораторним з верхнього пласту еритроцитів відібрати 7-8 мкл лейкоконцентрату, перенести його на предметне скло і рівномірно розподілити на поверхні скла тонким шаром за допомогою шліфованого скла.

8. Отримані мазки висушити на повітрі при кімнатній температурі.

9. Зафіксувати етиловим спиртом 96° протягом 20 хвилин.

10. Фарбувати 1 % розчином сафраніну протягом 1-3 хв., фарбу змити дистильованою водою, мазок висушити на повітрі при кімнатній температурі.

10.2. Оцінка результатів

Підрахунок результатів проводять за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву (100x), окуляр (7x). Підрахунок проводять на 200 нейтрофілів і визначають відсоткове число нейтрофілів, які містять в своїй цитоплазмі гранули темно-синього кольору (НСТ-позитивні нейтрофіли).

Підраховують індекс стимуляції (ІС):

$$ІС = \frac{\text{кількість позитивних клітин в стимульованому НСТ-тесті}}{\text{кількість позитивних клітин в спонтанному НСТ-тесті}}$$

Норма: НСТ-тест (стимульований) - 20-40 %.

ІС (індекс стимуляції) – 3,0-5,0.

ЗАВДАННЯ 11. Аналіз та інтерпретація клінічного прикладу результатів спонтанного і стимульованого НСТ-тесту.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Кисневозалежна і кисневонезалежна бактерицидність фагоцитів.
2. Механізми пригнічення паразитами фагоцитарної реакції.
3. Молекулярно-клітинний механізм хемотаксису.
4. Механізм ефекту опсонізації.
5. Який механізм судинної реакції при гострому запаленні?
6. Навести молекулярно-клітинні механізми міграції імунокomпетентних клітин у ланку запалення?
7. Що мається на увазі під поняттям “метаболічний вибух”, який виникає у фагоцитуючих клітинах?
8. Які активні форми кисню та галогенів утворюються при “метаболічному вибуху”.
9. Що собою являє нітросиній тетразолій як хімічна речовина.
10. У яку речовину перетворюється НСТ при окисненні у фагоцитах?
11. Яка діагностична різниця між спонтанним і стимульованим НСТ-тестом.
12. Клінічне значення показників НСТ-тесту при діагностиці первинного та вторинного імунodefіциту, алергічних станах, паразитарних інвазіях, хронізації бактеріального процесу.

ТЕМА 9

МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ КРОВ'ЯНОЇ ПЛАЗМИ,
СИРОВАТКИ ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНИХ ІМУНОЛОГІЧНИХ РЕАКЦІЙ.

ВИЯВЛЕННЯ ГЕТЕРОФІЛЬНИХ АНТИТІЛ В РЕАКЦІЇ ПРЯМОЇ
ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ. ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ІНФЕКЦІЙНИХ
АНТИТІЛ В РЕАКЦІЇ НЕПРЯМОЇ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ
(ПРИНЦИП МЕТОДУ) І В РЕАКЦІЇ ЗВ'ЯЗУВАННЯ
КОМПЛЕМЕНТУ (ПРИНЦИП МЕТОДУ)

МЕТА: засвоїти специфічну взаємодію антигенів і антитіл та кількісний аналіз імунореагентів за допомогою серологічних методів – реакції прямої гемаглютинації, реакції непрямой гемаглютинації та реакції зв'язування комплекменту.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Первинна і вторинна функція антитіл.
2. Імунологічні та фізико-хімічні процеси феномену аглютинації й преципітації антигену.
3. Принцип, етапи і оцінка реакції прямої гемаглютинації.
4. Гетерофільні антитіла, нормальні антитіла: характеристика і причина їх синтезу в організмі.
5. Принцип реакції зв'язування комплекменту. Етапи постановки метода, його клінічна значимість.
6. Перелік обладнання, матеріалів та реактивів, їх приготування.

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Характеристика принципу метода виявлення гетерофільних антитіл в реакції прямої гемаглютинації.

Метод заснований на реакції аглютинації. Феномен аглютинації полягає у можливості антитіл зв'язуватись з корпускулярними антигенами: мікробними

клітинами, клітинами еукаріот, склеюючи їх у агрегати, які випадають у видимий осад. Реакція гемаглютинації є прикладом аглютинації й обумовлена видимим злипанням еритроцитів, що створюють комплекс антиген-антитіло.

Розрізняють реакції прямої і непрямой аглютинації і відповідно реакції прямої і непрямой гемаглютинації. Якщо виявляють антитіла до різноманітних антигенів мембрани еритроцитів, то це реакція прямої гемаглютинації. Якщо еритроцити використовуються в якості носіїв чужорідних антигенів або гаптенів, то в цьому випадку реакція антиген-антитіло називається пасивною гемаглютинацією (РПГА) і служить для діагностики антитіл до різноманітних бактеріальних, вірусних і неінфекційних антигенів. Метод РПГА дуже чутливий, дозволяє визначити до 3-6 мг азоту антитіл.

Феномен аглютинації, і особливо гемаглютинації, обумовлений полівалентністю та полімерністю мембранних антигенів еритроцитів і полівалентністю антитіл. Зв'язування специфічних антитіл з антигенами викликають скупчення еритроцитів, деформацію клітинних мембран, зникнення мембранного потенціалу. Внаслідок цього еритроцити зближуються так, що полі- та бівалентні антитіла створюють перехресні зв'язки з різноманітними еритроцитами. Масивне утворення поперечних зв'язків між антитілами і еритроцитами макроскопічно виражається як гемаглютинація.

Виявлення гетерофільних антитіл в реакції гемаглютинації належить до прямої гемаглютинації. Реакція обумовлена наявністю на еритроцитах барана гетерофільних антигенів. Гетерофільні (або гетероспецифічні) антигени - це структури, схожі за хімічним складом і конформацією, які є у деяких окремих видів вірусів, прокариот, грибів, рослин і тварин. Їх схожість може бути випадковою або внаслідок пов'язаної еволюції різних груп організмів, а також як результат виявлення антигенної мімікрії паразитичних організмів. Найбільш розповсюдженими гетерофільними антигенами є антиген Форсмана і антиген Пауля-Буннеля. Діагностичне значення цих антигенів полягає в тому, що вказані антигени є на мембранах еритроцитів багатьох видів тварин. Тому їх можна виявляти за допомогою гетерофільних антитіл. Існує наступне

серологічне правило Ланштейнера: носії гетерофільних антигенів самі не продукують специфічних гетерофільних антитіл. Продукція гетерофільних антитіл спостерігається у індивідів, що не являються носіями гетерофільних антигенів. Для них гетерофільні антитіла відносяться до нормальних антитіл, наприклад, ізоаглютиніни АВО-системи крові. Нормальними називаються антитіла, які синтезуються в організмі без видимих причин. Природа синтезу нормальних антитіл, в том числі й гетерофільних, не в'ясна. Вважають, що вони синтезуються під впливом гетерофільних антигенів, що входять до складу мікроорганізмів-сапрофітів, які асоціюються з макроорганізмом. Так, людина не є носієм антигенів Форсмана і Пауля-Буннеля. Однак у неї виробляються антитіла до них внаслідок наявності антигенів у паразитичних і сапрофітних мікроорганізмів. Наприклад, паразитичні бактерії кишкової групи мають антиген Форсмана, а вірус інфекційного мононуклеоза - антиген Пауля-Буннеля. Ці нормальні антитіла сироватки людини можна виявити за допомогою прямої реакції аглютинації з еритроцитами барана, природного носія цих антигенів. Титр гетерофільних антитіл у дорослих людей в нормі міститься в межах 1:8-1:32 і є показником функціональної активності В-системи імунітету. Зниження або збільшення титру гетерофільних антитіл вказує на зменшення чи підвищення функцій гуморального імунітету. Необхідно мати на увазі, що вказані гетерофільні антигени мають, крім нормальної флори, паразитичні мікроорганізми. Так, антиген Форсмана мають рикетсії Провачека - збудника сипного тифу, а антиген Пауля-Буннеля - віруси інфекційного мононуклеозу. У випадку інфекції даними мікроорганізмами титр гетерофільних антитіл збільшується до 1:250 і більше.

У цьому випадку високі титри гетерофільних антитіл вже свідчать не про підвищення функції В-системи імунітету, а про інфекційний процес у організмі людини.

ЗАВДАННЯ 2. Підготувати обладнання, матеріали та реактиви для постановки прямої реакції гемаглютинації.

Реактиви:

1. Фосфатно-сольовий буфер, рН 8,2-8,4.
2. 3%-на суспензія еритроцитів барана.

Обладнання: термостат, холодильник, інактиватор сироваток, полістироловий 72-луночний планшет, автоматичні піпетки.

ЗАВДАННЯ 3. Провести постановку реакції прямої гемаглютинації.

3.1. Хід роботи.

Досліджувану сироватку інактивують від комплекта у водяній лазні при температурі $+56^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хвилин. Із інактивованої сироватки готують ряд послідовних розведень від 1:2 до 1:128. У випадку підозри на інфекційний процес розведення збільшують до 1:250 і вище.

Розчинення сироватки проводять безпосередньо в планшетах. Для цього у 9 лунок першого ряду розливають по 0,5 мл ФСБ. Далі в першу лунку додають 0,5 мл цільної сироватки, перемішують її з ФСБ і переносять 0,5 мл суміші в другу лунку, в якій також перемішують суміш і 0,5 мл її переносять в наступну лунку і т.д. до 8-ї лунки. Із 8-ї лунки після перемішування відбирають 0,5 мл суміші і вилучають із реакції. 9-а лунка з розчином залишається контрольною: контроль спонтанної аглютинації під впливом ФСБ. Далі в усі лунки додають по 0,075 мл 3%-ї суспензії еритроцитів барана. Суспензію клітин розмішують обережним розкачуванням планшетки та інкубують 2 години в термостаті при $+37^{\circ}\text{C}$, після чого проводять облік результатів реакції.

Схема постановки досліду

1. Лунки планшета	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2. ФСБ, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
3. Сироватка, мл	0,5								
4. Розведення сироватки	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128		К
5. 3%-а суспензія ЕБ	-----0,075 для всіх лунок-----								

6. Інкубація 2 год. при $+37^{\circ}\text{C}$ в термостаті

3.2. Оцінка результатів.

У випадку реакції антиген-антитіло створюються великі комплекси аглютинованих еритроцитів, які осідають на дні лунки у вигляді перевернутої "парасольки" або "килимка". Не зв'язані антитілами еритроцити осідають у вигляді компактної гранули ("гудзика"). Кількісно оцінку реакції виражають у титрах. За титр антитіл приймається величина, зворотня розведенню сироватки, коли ще має місце видима аглютинація ("килимок"). Якщо в контролі без сироватки відбулася аглютинація, то результати реакції вважаються помилковими, і тому заново готують компоненти реакції і дослід повторюють.

У здорових дорослих осіб титр гетерофільних (нормальних) антитіл коливається у межах 1:8-1:32. Зменшення його свідчить про знижену функціональну активність В-лімфоцитів, збільшення до 1:64-1:128 - про її активність. Високі титри 1:256 дозволяють передбачати інфекційний процес.

Методика роботи

Студенти розподіляються на 2 групи. Кожна з груп ставить реакцію аглютинації з одними й тими ж сироватками. Результати двох груп порівнюють. Вони не повинні відрізнятися більше ніж на одне розведення. Після обговорення отримані дані заносять в лабораторний зошит, супроводжуючи відповідними висновками.

ЗАВДАННЯ 4. Принцип реакції зв'язування комплементу (РЗК). Етапи постановки метода. Клінічна інтерпретація отриманих результатів.

4.1. Принцип метода.

Реакція заснована на зв'язуванні комплементу діагностичним комплексом антиген-антитіло (АГ-АТ), що задержує гемоліз еритроцитів барана (ЕБ) у гемолітичній системі "ЕБ-гемолітичні АТ" (див. схему).

РЗК - це метод, до складу якого входять дві системи комплексів АГ-АТ:

1) тестова система: комплекс АГ-АТ, у якій один із реагентів (АТ або АГ) не відомі (тестуються);

2) індикаторна гемолітична система: комплекс "ЕБ-гемолітичні АТ до ЕБ".

Кожна з систем конкурує за зв'язування з комплементом.

4.2. Медико-біологічне значення.

РЗК використовують як непрямий метод для виявлення АТ або АГ у рідині, що досліджується, для діагностики інфекційних захворювань (сифілісу - реакція Вассермана), як доказ автоімунного процесу, для виявлення та ідентифікації тканинних антигенів, а також для типування за HLA-системою. Метод чутливий, дозволяє виявляти АТ у концентрації 0,05 мг/мл.

4.3. Етапи постановки РЗК.

Постановка РЗК включає три етапи.

1 етап (підготовчий): визначають робочі дози розведення гемолітичної сироватки, комплементу, стандартного антигену (при визначенні антигену) у об'ємі 0,25 мл. При їх надлишку або недостатці титр АТ (АГ), буде визначений не точно.

2 етап: готують тест систему. Для цього при визначенні титрів антитіл (кількісна реакція) готують ряд геометричних розведень (розкочують) досліджувані сироватки на фізрозчині у об'ємі 0,25 мл. До неї додають по 0,25 мл (робоча доза) відомого стандартного АГ (діагностикум), проти якого визначають АТ.

У випадку визначення титрів невідомого АГ реактиви тест-системи міняють місцями - розкочують АГ-вмісну рідину і додають 0,25 мл (робочу дозу) стандартної сироватки, яка містить АТ проти АГ, що визначають.

До тест системи додають 0,25 мл робочого розведення комплементу (свіжа сироватка миші, морської свинки), що містить комплемент у високих дозах або стандартний комплемент, отриманий шляхом ліофілізації сироватки морських свинок. Суміш інкубують при +37⁰С одну годину.

3 етап: додають гемолітичну систему, тобто сенсibiliзовані ЕБ, яку готують до постановки РЗК. Для цього у рівних об'ємах (по 0,25 мл) змішують 3% суспензію ЕБ і гемолітичну сироватку, взяту у робочому розведенні.

Суміш інкубують у термостаті при +37⁰С 30 хвилин. При цьому відбувається утворення комплексу ЕБ-АТ, тобто сенсibiliзованих (чутливих) еритроцитів.

Одночасно з тест системою та гемолітичною системою ставлять контроль для кожного компоненту реакції.

Схема постановки РЗК

Тип	№ п/п	Інгредієнт	Доза реактивів, мл						Контроль				
			С	АГ	К	ЕБ	С	АГ	К	ЕБ			
Тест-система	.	Досліджувана сироватка у розведеннях	0,25 (1:10)	0,25 (1:20)	0,25 (1:40)	0,25 (1:80)	0,25 (1:160)	0,25 (1:320)	0,25 (1:10)				
	.	АГ (робоча доза)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-	0,25	-	-	-
	.	Комплемент	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-	-
	.	Фізіологічний розчин	-	-	-	-	-	-	0,25	0,25	0,50	0,75	
Інкубація при +37 ⁰ С протягом однієї години													
Гемоліти	.	Сенсibiliзовані ЕБ	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Інкубація при +37 ⁰ С протягом однієї години												
Результати (приклад)			++	++	++	+	+					++	

Результати РЗК оцінюють за чотирьохбальною системою:

- різко позитивна реакція - 100% затримка гемолізу, всі еритроцити в осаді (+++);
- позитивна реакція - часткова (50%) затримка гемолізу, рідина злегка забарвлена гемоглобіном (++);
- сумнівна реакція - слабка затримка гемолізу, рідина забарвлена у рожевий колір, незначний осад ЕБ (+);
- негативна реакція - повний гемоліз, відсутність осаду еритроцитів (-).

Результат вважається позитивним (наявність антитіл у сироватці), якщо у першому розведенні реєструється 100% бо 50% затримка гемолізу.

За титр АТ у досліджуваній сироватці вважають її найбільше розведення, при якому відбувається часткова (50%) затримка гемолізу.

До лабораторного журналу запишіть принцип методу РЗК, схему постановки РЗК, перелік систем, які входять до складу РЗК, оцінку конкретного приклада та висновки, що містять позитивну або негативну РЗК і титр антитіл у випадку позитивної РЗК.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Які антигени називають корпускулярними, які розчинними? Як називається реакція взаємодії з ними антитіл?
2. Назвати різницю прямої та непрямой гемаглютинації. Яка з них частіше використовується? Причини.
3. Як пояснити серологічне правило: гетерофільні (нормальні) антитіла виявляються у особин не носіїв гетерофільних антигенів?
4. Які антигени називають гетерофільними. Наведіть приклади.
5. Які антитіла називаються гетерофільними. Наведіть приклади.
6. Оцінити клінічне значення титру гетерофільних антитіл в реакції прямої гемаглютинації з еритроцитами барану. Титр рівний 1 : 256.
7. Що таке титр антитіл?
8. Який механізм утворення “парасольки” і “гудзика”, відповідно?

9. Який принцип постановки непрямой реакції гемаглютинації?

ТЕМА 10

ВИЗНАЧЕННЯ ТИТРУ КОМПЛЕМЕНТА ЗА 50%-ВИМ ГЕМОЛІЗОМ.

ВИЗНАЧЕННЯ С-РЕАКТИВНОГО БІЛКА

МЕТА: вивчити методи визначення комплементу та С-реактивного білка.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Принцип реакції визначення титру комплементу за 50%-вим гемолізом. Етапи постановки метода, його клінічна значимість.
2. Принцип визначення рівня С-реактивного білка (СРБ).
3. Перелік обладнання, матеріалів та реактивів, їх приготування.

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Визначення титру комплементу.

Методи визначення активності комплементу ґрунтуються на здатності продуктів його активації індукувати лізис корпускулярних антигенів у комплексі антиген — антитіло (імунний лізис). Одним з таких методів визначення активності комплементу є гемолітичний метод. При використанні у якості антигена еритроцитів (краще барана), а у якості антитіл — специфічної антиеритроцитарної (гемолітичної) сироватки у присутності комплементу спостерігається лізис еритроцитів. За отупінню гемоліза роблять висновки про лізуючу (гемолітичну) активність комплементу.

Оскільки існує залежність між ступенем гемолізу та кількістю комплементу, то є можливість за інтенсивністю гемолізу встановити кількість комплементу в сироватці крові. Графічна залежність ступеня гемолізу від кількості комплементу виражається S-подібною кривою. Лінійна залежність лізису еритроцитів спостерігається лише в центральній ділянці кривої у зоні 30-50%-вого гемолізу, де ступінь лізису різко змінюється при невеликих

коливаннях кількості комплемента. Тому з найбільшою точністю облік можливий у зоні часткового лізису еритроцитів — за 50 %-вим гемолізом. В якості одиниці виміру комплемента використовується 50 %-ва одиниця (C^1H_{50}) — кількість комплемента, яка викликає 50 %-вий лізис 0,5 мл стандартної суспензії сенсibiliзованих еритроцитів при температурі $+37^\circ\text{C}$ впродовж 60 хвилин. Ця одиниця є умовною, оскільки її величина залежить від багатьох факторів, і в першу чергу від концентрації та очистки еритроцитів, а також від кількості антитіл, величини іонної сили, реакції середовища.

Титрування комплемента, по суті, зводиться до визначення однієї 50%-вої умовної одиниці — об'єму сироватки, який містить C^1H_{50} .

1.1. Матеріали та обладнання

Стандартна сироватка проти еритроцитів барана, дослідні сироватки людини, морської свинки і хворих системним червоним вовчаком. Еритроцити барана — свіжі або консервовані в розчині Олсвера (на 1200 мл дистильованої води 24,6 г глюкози, 9,6 г цитрату натрію, 5,04 г NaCl, pH 6,4). Свіжу кров змішують з розчином у співвідношенні 1 : 2, еритроцити — у співвідношенні 1:1. Веронал-медіналовий буферний розчин (pH 7,4, веронал — 5,75 г, медінап — 3,75 г, NaCl — 85,0 г, розчин $MgCl_2$ (1 моль/л) — 5,0 мл, розчин $CaCl_2$ (1 моль/л) — 165 мл, дистильована вода — до 2000 мл). У роботі використовують буфер, розведений дистильованою водою у співвідношенні 1:5. Ізотонічний розчин хлориду натрію pH 7,2, дистильована вода. Колби об'ємом 250, 150, 100 мл, пробірки аглютинаційні, піпетки градуйовані (5 та 1 мл), мікропіпетки. Водяна баня ($+56^\circ\text{C}$), центрифуга (2000-3000 хв⁻¹), термостат ($+37^\circ\text{C}$), фотоелектроколориметр.

1.2. Визначення рівня комплемента за 50%-вим гемолізом, використовуючи стандартну шкалу, в сироватці крові здорових та хворих осіб.

Приготування гемолітичної системи. Ліофілізовану гемолітичну сироватку з відомим титром розвести розчином хлориду натрію в об'ємі, вказаному на етикетці ампули, та прогріти на водяній бані при $+56^\circ\text{C}$ впродовж 30 хвилин для інактивування комплемента. Потім приготувати 100

мл сироватки в потрібному титрі. Якщо титр гемолітичної сироватки дорівнює 1 : 1200, то для отримання потрібного титру (1 : 400) необхідно 0,25 мл цільної сироватки розвести в 99,75 мл веронал-медіналового буферного розчину.

Приготувати 3%-ву суспензію еритроцитів барана. Дефібриновану кров барана профільтрувати через трьохшаровий марлевий фільтр, фільтрат центрифугувати при 2000 хв⁻¹ впродовж 10 хвилин, осад еритроцитів тричі відмити у веронал-медіналовому буферному розчині. Потім 3 мл осаду відмитих еритроцитів суспендувати в 97 мл буферного розчину.

Для приготування гемолітичної системи до 100 мл 3%-ної суспензії еритроцитів невеликими порціями, постійно перемішуючи, влити 100 мл гемолітичної сироватки у потрібному титрі. Більшу частину (175 мл) гемолітичної системи інкубувати при +37°C впродовж 30 хвилин для сенсibiliзації еритроцитів, залишок (25 мл) розвести дистильованою водою (1 : 2) і використовувати для побудови стандартної шкали лізованих еритроцитів.

Приготування стандартної шкали лізованих еритроцитів. Гемолітичну систему, розведену 1:2 дистильованою водою, розлити у зростаючих дозах в ряд пробірок і довести веронал-медіналовим буферним розчином об'єм рідини в кожній пробірці до 1 мл (табл.1).

Таблиця 1. Визначення ступеня гемолізу.

Інгредієнти	Об'єм інгредієнтів							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Гемолітична система, 1:2	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Дистильована вода	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Гемоліз, %	20	30	40	50	60	70	80	90

Визначення титру комплементу в сироватці. Досліджувані сироватки

розвести розчином хлориду натрію (сироватку морської свинки - 1 : 10, сироватку людини - 1 : 5) і поставити реакцію для визначення титру комплемента (табл. 2). Пробірки ряду титрування комплемента інкубувати 60 хвилин при +37⁰С, охолодити у рефрижераторі при +2-5 °С впродовж 10 хвилин і центрифугувати 5 хвилин при 2000 хв⁻¹ для осадження еритроцитів. Таку ж роботу проводити з сироватками хворих.

Таблиця 2. Визначення титру комплемента сироватки.

Інгредієнти	Об'єм інгредієнтів, мл										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Конт роль
Дослідна сироватка	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	-
Веронал-медіналовий буферний розчин	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5
Сенсибілізовані еритроцити	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Облік та оцінку результатів реакції провести за гемолізом, порівнюючи дослідні пробірки зі стандартною шкалою лізованих еритроцитів, визначити за 50 %-вим або проміжним гемолізом значення однієї С¹Н₅₀ і встановити титр комплемента в 50%-вих гемолітичних одиницях. Отримані дані внести до таблиці (форма 1).

Форма 1. Титри комплементу в дослідних сироватках.

Зразки сироваток	Гемоліз, %	Кількість С ¹ Н ₅₀

1.3. Визначення рівня комплементу за 50%-вим гемолізом фотоколориметричним методом в сироватці крові донорів і хворих.

Приготування стандартизованої суспензії еритроцитів. Приготувати із осаду відмитих еритроцитів 5%-ву суспензію: 1 мл осаду суспендувати в 19 мл веронал-медіналового буферного розчину.

Отримати розчин гемоглобіну шляхом 100%-вого лізису 5%-вої суспензії еритроцитів: одну частину суспензії еритроцитів змішати з трьома частинами дистильованої води і центрифугувати впродовж 5 хвилин при 2000 хв^{-1} для усунення із отриманого розчину гемоглобіну клітинного детриту.

Визначити коефіцієнт екстинкції розчину гемоглобіну. Кювету з товщиною стінки 0,3 см заповнити розчином гемоглобіну і виміряти значення оптичної щільності на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 400-480 нм (синій світлофільтр). Для контролю в кювету внести веронал-медіналовий буферний розчин, розведений дистильованою водою в 5 раз.

Розрахувати кількість буферного розчину, необхідну для приготування 5%-вої стандартизованої суспензії еритроцитів за формулою:

$$V_x = K_e V / K_e^1$$

де V_x – об'єм буфера, що додається до 1 мл осаду еритроцитів для приготування 5%-вої суспензії; K_e – коефіцієнт екстинкції, що відповідає 100%-вому гемолізу (при даних умовах дослідження він дорівнює 1,08); K_e^1 – експериментальний коефіцієнт екстинкції приготованої 5%-вої суспензії еритроцитів.

Користуючись розрахунками, приготувати 5%-ву стандартизовану суспензію еритроцитів, суспендуючи 1 мл осаду еритроцитів у встановленому об'ємі.

Побудова калібрувальної кривої. Із 5%-вої стандартизованої суспензії еритроцитів приготувати розчин гемоглобіну, змішуючи одну частину суспензії з трьома частинами дистильованої води, і центрифугувати 2000 хв^{-1} (5 хвилин). Потім приготувати розведення розчину гемоглобіну різних концентрацій (табл.

3) і виміряти їх оптичну густину.

Таблиця 3. Стандартна шкала гемолізу.

Інгредієнти , мл	Гемоліз									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Розчин гемоглобіну при гемолізі 5 % суспензії	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Веронал-медіналовий буферний	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	

Побудувати графік залежності коефіцієнта екстинкції від відсотку гемолізу, відкладаючи на вісі абсцис відсоток гемолізу, а на вісі ординат — коефіцієнт екстинкції, відповідний даному відсотку гемолізу.

Визначення титру комплемента в сироватці. Приготувати гемолітичну систему. Змішати рівні об'єми 5 %-вої стандартизованої суспензії еритроцитів з гемолітичною сироваткою у потрібному титрі та інкубувати 30 хвилин при +37°C.

Приготувати в пробірках розведення дослідних сироваток (табл. 4), додати 1 мл гемолітичної системи, інкубувати при +37°C впродовж 60 хвилин.

Таблиця 4. Схема титрування комплементу.

Інгредієнти	Об'єм інгредієнтів, мл										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Конт-роль
Сироватка 1:10	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	-
Веонал-медіналовий буферний розчин	0,95	0,90	0,85	0,80	0,75	0,70	0,65	0,60	0,55	0,50	1,0
Гемолітична система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Після охолодження при $+2-5^{\circ}\text{C}$ впродовж 10 хвилин центрифугувати при 2000 хв^{-1} (5 хвилин) і встановити значення екстинкції надосадової рідини. Порівняти отримані коефіцієнти екстинкції з такими на калібрувальній кривій і визначити відсоток гемолізу. Використовуючи поправочний коефіцієнт даного відсотка лізису (табл. 5), розрахувати кількість C^1H_{50} в 1 мл цільної сироватки. Отримані титри комплементу в сироватках людини внести у форму 2.

Форма 2. Титри комплементу в дослідних сироватках.

Зразки	Коефіцієнт	Гемол	Кількість C^1H_{50}

Таблиця 5. Поправочні коефіцієнти Крота.

Гемоліз, %	Коефі- цієнт	Гемоліз, %	Коефі- цієнт	Гемоліз, %	Коефі- цієнт	Гемоліз, %	Коефі- цієнт
10	0,644	55	1,041	25	0,803	82	1,354
12	0,671	60	1,084	30	0,844	84	1,393
14	0,697	65	1,132	35	0,884	86	1,438
16	0,718	70	1,185	40	0,922	88	1,490
18	0,738	75	1,246	45	0,961	90	1,552
20	0,758	80	1,320	50	1,000	—	

ЗАВДАННЯ 2. Аналіз та інтерпретація клінічного прикладу результатів реакції зв'язування комплементу.

ЗАВДАННЯ 3. Виявлення С-реактивного білку в сироватці крові людини методом латексної аглютинації («СРБ – латекс-тест», *in vitro*)

Принцип методу.

У діагностикумі використовуються принцип латексної аглютинації. Антиген (антитіла проти С-реактивного білку), що адсорбований на нейтральних частинках латексу, вступає в реакцію аглютинації з С-реактивним білком. Інтенсивність аглютинації прямо пропорційна кількості СРБ.

Клінічне значення.

С-реактивний білок (СРБ) виявляються в сироватці при різних запальних та некротичних процесах і є показником їх гострою перебігу. Свою назву він одержав через здатність пресципітувати (осаджувати) С-полісахарид клітинної мембрани пневмококу. СРБ підсилює рухливість лейкоцитів. Зв'язуючись з Т-лімфоцитами, він впливає на їх функціональну активність, ініціюючи реакції преципітації, аглютинації, фагоцитозу і зв'язування комплементу. Підвищення СРБ в крові починається через 14-24 години з моменту початку запалення і зникає в ході реконвалесценції. В присутності кальцію СРБ зв'язує ліганди в

полісахаридах мікроорганізмів і визиває їх елімінацію. Рівень СРБ в сироватці відображає інтенсивність запального процесу, і контроль за ним важливий для моніторингу цих захворювань. СРБ є одним з пухлиніндуційованих маркерів. Синтез його посилюється у відповідь на появу в організмі пухлин різноманітних локалізацій.

Для оцінки ризику судинних ускладнень значимим є рівень СРБ, що не перевищує 10 мг/л. Рівень СРБ від 3 до 10 мг/л може бути ознакою запального процесу з млявим перебігом й пов'язаний з високим ризиком судинних ускладнень у практично здорових людей та хворих серцево-судинними захворюваннями, дозволяє оцінити ступінь ризику розвитку гострого інфаркту міокарда, мозкового інсульту чи раптової серцевої смерті у людей, які не страждали від серцево-судинних захворювань.

Підвищення рівню СРБ від 10 до 30 мг/л характерно для вірусних інфекцій, метастазів пухлин. хронічних запальних процесів з млявим перебігом та деяких системних ревматичних захворювань.

Підвищення рівня СРБ від 30 до 100 мг/л (інколи до 200 мг/л) характерно для гострих бактеріальних інфекцій, загостреннях деяких хронічних запальних захворювань (наприклад, ревматоїдного артрити) та ушкодженнях тканин (хірургічних операціях, гострого інфаркту міокарда).

Тяжкі генералізовані інфекції, сепсис, опіки супроводжуються підвищеннями рівня СРБ до 300 мг/л і більше.

Склад набору

Реагент 1. Латексна суспензія, 2 мл (1 шт.)

Реагент 2. Розчинник, 14 мл (1 шт.)

Реагент 3. 1 Позитивний контроль, який містить СРБ більше 6 мг/л, 0.2 мл (1 шт.)

Реагент 4. Негативний контроль, який містить СРБ менше 6 мг/л, 0.2 мл (1 шт.)

Палички для розмішування сироваток (100 шт.)

Тестовий слайд (1 шт.)

Аналітичні характеристики

Чутливість тесту становить 6 мг/л.

Матеріал для дослідження

Використовується свіжа, вільна від домішок сироватка крові. Зберігаються зразки не більше 48 годин при 4-10°C. Довгострокове зберігання допускається в замороженому вигляді при температурі -20°C. Повторне заморожування-відтавання не допускається. Не використовують мутні, хильозні та гемолітичні зразки.

Перелік необхідного устаткування

Автоматичні дозатори фіксованого або варіабельного об'єму 10-100 мкл.

Підготовка реагентів. Всі реагенти «СРБ – латекс-тест» готові до використання.

Перед використанням набір витримують при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Якщо припустима концентрація визначної речовини значно перевищує норму, рекомендується розвести сироватку в 2 рази. Перед використанням перемішують Р1 легким струшуванням флакону.

Проведення дослідження

I Якісне визначення

1. Нанести на тестовий слайд послідовно по 10 мкл Р3, Р4, досліджуваного матеріалу.

2. Додати по 10 мкл Р1 в кожную краплю Р3, Р4 і а досліджуваного матеріалу.

3. Перемішати паличкою, яка надається до складу набору або скляною.

4. Похитувати пластину протягом 3 хвилин.

5. Провести оцінку результатів дослідження.

II Кількісне визначення

1. За допомогою Р2 готується розведення досліджуваного матеріалу - 1:2, 1:4, 1:8 і т.д.

Номер проби	Досліджувана сироватка	P2	Наявність аглютинації	Титр	Вміст СРБ, мг/л
1	Цільна сироватка	-	Відсутня	-	>6
2	0,1 мл сироватки	0,1 мл	Присутня	2	>12
3	0,1 мл проб№2	0,1 мл	Присутня	4	>24
4	0,1 мл проб №3	0,1 мл	Присутня	8	>48

2. Нанести на тестовий слайд по 10 мкл кожного розведення досліджуваного матеріалу.

3. Додати по 10 мкл P1 до кожного розведення проби.

4. Перемішати паличкою, яка надається до складу набору або скляною.

5. Похитувати пластину протягом 3 хвилин.

6. Провести оцінку результатів дослідження.

Оцінка результатів дослідження

Аглютинацію, яка відбулась після 3 хвилин, розцінюють як неспецифічну. Реакцію вважають позитивною коли спостерігається аглютинація частин латексу. Величину реакції оцінюють в плюсах:

4 плюси - всі частини аглютиновані, розчин прозорий;

3 плюси - 3/4 частин аглютиновані, розчин прозорий по краю;

2 плюси – 1/2 частин аглютиновані, розчин мутнуватий;

1 плюс - слаба аглютинація, розчин мутний.

При кількісному визначенні оцінку проводять згідно з останнім титром сироватки, який дав позитивний результат.

Для визначення кількості СРБ в мг/л в пробі, необхідно найбільше розведення сироватки, що дало видиму аглютинацію, помножити на 6 мг/л.

Наприклад, якщо аглютинація спостерігалася в титрі досліджуваної сироватки 1:16, то необхідно $16 \times 6 \text{ мг/л} = 96 \text{ мг/л СРБ}$.

Референтні величини

Нормальні показники до 6 мг/л.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Які антигени називають корпускулярними, які розчинними? Як називається реакція взаємодії з ними антитіл?
2. Назвати різницю прямої та непрямой гемаглютинації. Яка з них частіше використовується? Причини.
3. Як пояснити серологічне правило: гетерофільні (нормальні) антитіла виявляються у особин не носіїв гетерофільних антигенів?

ТЕМА 11

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СИРОВАТКОВИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ ШЛЯХОМ ПРОСТОЇ РАДІАЛЬНОЇ ІМУНОДИФУЗІЇ ПО МАНЧІНІ ТА МІКРОТУРБІДИМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ. МЕТОД ВИЯВЛЕННЯ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ІМУННИХ КОМПЛЕКСІВ (ЦК) ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІЕТИЛЕНГЛИКОЛЮ 6000 (ПЕГ)

МЕТА: вивчення явища преципітації комплексу антиген-антитіло і освоєння методу кількісного визначення імуноглобулінів, циркулюючих іmunних комплексів.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Структурна різниця класів імуноглобулінів.
2. Імунохімічний аналіз в імунології.
3. Різноманітність методів імунодифузії.
4. Характеристика реакції ПРІД по Манчіні.
5. Механізм утворення ЦК в організмі.

6. Характеристика патогенезу, в якому ведучу роль грають ЦК (алергія, аутоалергія 3 типу).

7. Методи визначення ЦК. Колориметричний метод визначення ЦК в 4,16% розчині ПЕГ 6000.

8. Перелік обладнання, матеріалів та реактивів, їх приготування

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Ознайомитись з характеристикою принципу методів імунодифузії.

Метод заснований на реакції преципітації в гелі. В реакції преципітації беруть участь антитіла і розчинні антигени, які утворюють нерозчинні великі комплекси за рахунок полівалентності та полімерності антигенних детермінант, а також полівалентності та гетерогенності антитіл. Реакцію проводять в рідкому і твердому середовищі. Останній спосіб більш зручний для кількісного аналізу. Тверду фазу створює агаровий гель. При концентрації агару (агарози) 1-3% середній розмір пор гелю складає 3 нм, через які вільно дифундують антитіла і більшість розчинних антигенів, створюючи комплекси антиген-антитіло крупніше пор гелю, і закінчують дифузію, утворюючи видимі межі з гелем, де цих комплексів нема. Тобто основна функція гелю - стабілізація комплексу антиген-антитіло (преципітату).

Розрізняють просту і подвійну імунодифузію. У першому випадку дифундує один компонент, у другому - обидва. У залежності від того чи проходить дифузія по одній загальній осі або в різні боки проста імунодифузія називається лінійною або радіальною.

У клінічній імунології для визначення кількості імуноглобулінів G-, A-, M-класів знайшов широке використання метод простої радіальної імунодифузії (ПРІД) в гелі, розроблений Манчіні з співавторами (1963 р.). Суть методу полягає в створенні кільцевого преципітату в результаті специфічної взаємодії антигену (клас імуноглобуліну, який тестується), внесеного в лунку, з антитілом (моноспецифічна сироватка проти імуноглобуліну, що тестується),

яке внесено в агар. Антиген дифундує в гель і, сполучаючись із специфічними антитілами, формує кільце преципітації. Його площа, або квадрат діаметра кільця, прямо пропорційна кількості внесеного в лунку антигену. Оцінку результатів проводять шляхом порівняння розмірів кілець дослідних сироваток з калібрувальною кривою, яку будують по стандартній сироватці крові людини з відомою концентрацією імуноглобулінів. Оптимальні результати одержують при однодобовій інкубації системи.

Метод ПРІД знайшов широке використання не тільки для кількісного визначення імуноглобулінів у сироватках і різноманітних секретах. За його допомогою можна визначати кількість різних антигенів.

Точність методу полягає в межах 5-50 мкг/мл білка, коли чітко видно кільця преципітації.

ЗАВДАННЯ 2. Підготувати реактиви і обладнання, необхідні для постановки методу ПРІД.

1. 3%-й розчин агару (Дифко, Бактогар), або агарози на 0,1 М веронал-мединаловому буфері.

2. 0,1 М веронал-мединаловий буфер, рН 8,6.

5,16 г медуналу розчинити у 150 мл дистильованої води, підігрітої до 60°C на водяній лазні, додати 0,92 г вероналу. Перевірити рН, довести до 8,6 0,1 М розчином NaOH або HCl. Об'єм буфера довести до 500 мл дистильованою водою. Зберігати в холодильнику.

3. Моноспецифічні сироватки проти імуноглобулінів людини.

4. Фарбник амідно-чорний В.

1 г фарбника розчиняють у 100 мл льодяної оцтової кислоти. Потім доводять об'єм до 1 л дистильованою водою. Через 12 год. фарбу фільтрують. Використовують багаторазово.

Обладнання: холодильник побутовий, пластини з бортиком висотою 1мм, розміром 124x83 мм з робочим об'ємом суміші агар (антисироватка 10,4 мл; пробійник з зовнішнім діаметром 2 мм; столик (пристрій) з регулюємою

горизонтальною поверхнею; вимірювальний пристрій з точністю до 0,1 мм; водяна лазня; термостат; напівлогарифмічний чи міліметровий папір; мікрошприц на 2 мкл; лабораторний посуд; волога камера (ексикатор).

ЗАВДАННЯ 3. Постановка реакції ПРІД: приготування 3% розчину; розведення антисироваток проти імуноглобулінів; розведення стандартної сироватки; приготування суміші агару (антисироватка, заливання пластин, вирізання лунок у гелі та заповнення їх стандартною та тестуємою сироватками, будівлення калібрувальної кривої). Оцінка наведених результатів за лабораторними прикладами.

3.1. Приготування 3%-го розчину агару.

Навіску 0,5 мл агару поміщають в термостійку колбу, наливають 17,5мл 0,1 М веронал-мединалового буферу з рН 8,6, щільно закривають корком і розчиняють, періодично помішуючи на киплячій водянній лазні. Чи повністю розчинився агар, перевіряють за прозорістю краплі розчину на предметному склі. Одержаний розчин розливають по 5,2 мл в центрифужні хімічні пробірки, закривають корками, поміщають у водяну лазню при 56°C.

3.2. Розведення антисироваток проти імуноглобулінів (Ig). Готують три хімічні пробірки: по одній для кожної антисироватки проти Ig G-, A-, M-класів. У відповідну пробірку додають веронал-мединаловий буфер в об'ємі 1/2 титру, що вказаний на ампулі. Наприклад, титр антисироватки проти Ig дорівнює 1:24 (маркіровка на ампулі), отже в пробірку додають 12 мл буфера. Цим об'ємом буфера розчиняють і вимивають ліофілізат антисироватки. 5,2 мл кожної антисироватки наливають у центрифужну пробірку, закривають корком і нагрівають в лазні (термостаті) до 56°C як і розчин агару.

3.3. Розведення стандартної сироватки крові людини з відомою кількістю Ig G-, A-, M-класів.

Ліофілізат ампули розчиняють в 1 мл веронал-мединалового буфера, ділять на три порції відповідно трьом ампулам антисироватки проти Ig G-, A-, M-класів, що додаються в упаковці комплекту. Дві порції стандартної

сироватки людини зберігають при -20°C . Використовують при подальших постановках ПРІД. Із першої порції стандартної сироватки людини роблять ряд концентрацій: нерозведена сироватка, розведена 1:2, 1:4, 1:8 на веронал-мединаловому буфері (4 центрифужних пробірки).

3.4. Приготування суміші агар/антисироватка, заливка пластин.

Підігрітий до 56°C 3%-й розчин агару й відповідної антисироватки по 5,2 мл змішують і відразу виливають 10,4 мл суміші на пластину, що розміщена на горизонтальній поверхні столика. Суміш повинна рівномірно розподілитися по поверхні пластини, щоб після охолодження протягом 30 хвилин одержати прошарок гелю товщиною 1 мм. Таким чином готують усі 3 пластини, які містять в суміші відповідно сироватку проти Ig G-, A-, M-класів. Якщо приготовлені пластини не вивчаються відразу, їх можна зберігати 2-3 тижні у вологій камері при $+4^{\circ}\text{C}$. В цьому випадку до суміші, що готують, додають консервант - 0,01%-й розчин мертиоляту або 0,02%-й розчин азиду натрію, які зупиняють ріст мікроорганізмів.

3.5. Вирізання лунок у гелі, заповнення їх стандартною сироваткою та сироватками, що тестуються.

Після охолодження гелю пробійником вирізають лунки діаметром 2 мм на відстані 1,5 см по трафарету, що наведений в інструкції, яка додається до набору антисироваток. У 4 лунки першого ряду вносять за допомогою мікрошприця по 2 мкл стандартної сироватки, нерозведеної і в розведеннях 1:2, 1:4, 1:8. Лунки наступних рядів заповнюються по 2 мкл сироватками, що тестуються. Пластини інкубують у вологій камері (ексикаторі) протягом 24 год. при $+4^{\circ}\text{C}$, а пластини з анти-Ig M-сироваткою - 48 годин. По закінченню інкубації поверхню гелю опрацьовують 1%-м розчином оцтової кислоти протягом 30 секунд для контрастування кілець преципітації й вимірюють їх діаметри на вологих нефарбованих препаратах. Більш точні виміри проводять на зафарбованих пластинах. Для цього пластини з гелем двічі відмивають у забуференому фізіологічному розчині. Кожна відмивка продовжується 12 годин, а потім - в дистильованій воді 6-8 годин. Цим досягається вилучення

неприципітованих білків. Після відмивки висушують пластини фільтрувальним папером, зафарбовують амідочорним В протягом 15 хв., зливають фарбник, промивають пластинку в проточній воді 3-5 хв. і знову висушують.

3.6. Побудова калібрувальної кривої. Оцінка результатів.

Для побудови калібрувальної кривої на осі абсцис відкладають відому кількість Ig в мг/мл (г/л), яка міститься в стандартній сироватці кожного розведення, а по осі ординат відкладають квадрати діаметрів Кілець преципітації сироватки даної концентрації. Таким чином будуються графіки для кожного імуноглобуліну окремо.

Для визначення Ig у сироватці, що вивчається, на осі ординат відкладають квадрат діаметра кільця преципітації тестуємої сироватки. Встановлюють перпендикуляр до перетину з кривою і точки проєктують на ось абсцис, на якій знаходять відповідні значення кількості Ig.

Методика роботи

Студенти діляться на три групи, кожна з яких визначає один із класів імуноглобулінів (Ig G-, A-, M-). Облік реакції проводять на наступному занятті. Результати кожної групи зводять в один протокол, у якому повинні бути калібрувальні криві для трьох класів імуноглобулінів, а концентрації імуноглобулінів в сироватках, які тестували, заносять до таблиці.

Таблиця. Концентрація сироваткових імуноглобулінів різних класів у сироватці здорових і хворих людей

Сироватка	Концентрація, г/л		
	Ig G	Ig A	Ig M
1			
2			
3			

ЗАВДАННЯ 4. Мікротурбідиметричний метод визначення IgG, IgM и IgA людини (Ан.И. Гордиенко, В.А. Белоглазов, Ал.И. Гордиенко).

Ознайомитись з сучасним методом визначення вмісту IgG, IgM и IgA людини у біологічних рідинах.

У даний час для визначення IgG, IgM и IgA людини в клінічній практиці найчастіше використовується метод радіальної імунодифузії (РІД) по Mancini. Більш сучасними методами рутинного визначення імуноглобулінів й інших сироваткових білків є нефелометрія і турбідиметрія. Відомо, що взаємодія специфічних антитіл із стандартним або антигеном, що визначається, приводить в певних умовах до утворення негомogeneous оптичного середовища (помутніння), при цьому кількість світлорозсіювальних частинок, що формується, пропорційна концентрації антигена [4]. При нефелометрії інтенсивність розсіяння світлового потоку у вимірювальній кюветі визначають під певним кутом (від мінімально можливого до 90.); при турбідиметрії розсіяння світла визначають за напрямом розповсюдження випромінювання. Останній метод надійний, легко відтворюваний, має високу чутливість. Тривалість аналізу не перевищує 1,5 години, відтворюваність - не гірше 5%. Діапазон калібрувальної кривої складає 3,3-212 мкг/мл для IgG, 3,9-251 мкг/мл для IgM і 6-382 мкг/мл для IgA. Для турбідиметричних вимірювань можна використовувати практично будь-які фотометри або спектрофотометри. Вимірювана величина, звана каламутністю, відповідає оптичній щільності і може бути визначена із співвідношення, аналогічного закону Бера:

$$S = \lg(P_0/P)$$

де S - каламутність, P_0 - інтенсивність падаючого світлового потоку, P – інтенсивність світлового потоку, який пройшов. У разі імунологічної реакції, коли розчинник і розсіюючі частинки нефарбовані, максимальну чутливість отримується при використанні блакитної області спектру.

Реакція проводиться в плоскодонних планшетах для імуноферментного аналізу, а для обліку результатів аналізу можуть бути використані широко поширені в клінічних лабораторіях імуноферментні аналізатори.

Використовуються моноспецифічні сироватки до IgG, IgM та IgA людини (наприклад, отримані в НДІ епідеміології і мікробіології ім. Н.Ф. Гамалєї (Москва, Росія), і стандартну сироватку крові людини (серія) з набору для визначення імуноглобулінів методом РІД (наприклад, отриману з НДІ епідеміології і мікробіології, м. Горький, Росія).

Для мікротурбідиметричного визначення IgG, IgM та IgA відповідні антисироватки розводять до половини робочого титру 0,05 М фосфатним буфером, рН 7,4, що містить 1% NaCl і 0,05% NaN₃ (PBS) і зберігають при +4⁰С. У день проведення аналізу розчини антисироваток розводять в 2 рази PBS, що містить 8% поліетиленгліколь-6000 (Serva) і 0,2% Tween 20 (Ferak), – PBS-PEG, витримують 30 хвилин при кімнатній температурі та центрифугують 15 хвилин при 5000 g. Для розведення стандартної сироватки крові людини використовують PBS.

У лунки стандартних плоскодонних планшетів для імуноферментного аналізу (наприклад, ВНІІ Медполімер, С.-Петербург) вносять по 200 мкл робочого розчину антисироватки, додають 25 мкл розведеної стандартної сироватки крові людини та інкубують при кімнатній температурі (18-20⁰С) протягом 60 хвилин. До першої контрольної лунки вносять 200 мкл робочого розчину антисироватки і 25 мкл PBS; у другу – 100 мкл PBS, 100 мкл PBS-PEG і 25 мкл розведеного розчину антигена. Для визначення помутніння оптичного середовища, що утворюється внаслідок реакції антиген-антитіло, використовують імуноферментний аналізатор, наприклад АКИ-Ц-01. Всі вимірювання проводять при довжині хвилі 492 нм. Статистичну обробку даних експериментів виконують за допомогою програми Microsoft Excel 97 з пакету Microsoft Office 97.

Застосування плоскодонних планшетів для імуноферментного аналізу (ІФА) дозволяє істотно спростити і прискорити проведення мікротурбідиметричного аналізу, оскільки одна й та ж лунка планшета використовується спочатку як “пробірка” для проведення реакції антиген-антитіло, а потім – як вимірювальна кювета для обліку кількості

світлорозсіювальних комплексів, що утворилися. Крім того, використання мікрооб'ємів антисироватки і стандартного антигена (відповідно 200 мкл і 25 мкл) зводить до мінімуму витрату дорогих реактивів. Самі ж планшети, на відміну від ІФА, можуть бути використані багато разів.

При мікротурбідиметрії реакція антиген-антитіло проходить в гомогенному середовищі, що не створює перешкод для вільної дифузії взаємодіючих реагентів. Це робить можливим істотно прискорити проведення аналізу, скорочуючи його до 60 хвилин замість 24 годин для РІД.

Важливим моментом в мікротурбідиметричному визначенні імуноглобулінів, втім, як і будь-яких інших антигенів, є вибір робочого титру відповідної антисироватки. Орієнтовним значенням тут може бути робочий титр антисироватки в РІД. Правильно підібраний робочий титр антисироватки забезпечує проведення вимірювань в широкому діапазоні концентрацій антигена з максимальною чутливістю і точністю. Подальше збільшення робочого титру антисироватки зменшує чутливість аналізу і знижує його точність. У загальному випадку діапазон визначуваних концентрацій антигена і гранична чутливість даного методу істотно залежать від афінності специфічних антитіл у використовуваній антисироватці.

У таблиці приведені порівняльні результати визначення 3-х класів імуноглобулінів людини мікротурбідиметричним методом і методом РІД.

За експериментальними даними А. І. Гордієнко, В. А. Білоглазова, О. І. Гордієнко максимальна чутливість мікротурбідиметричного аналізу складала 3,3 мкг/мл для Ig G; 3,9 мкг/мл для Ig M і 6 мкг/мл для Ig A, що в 15-20 разів краще за аналогічні показники для методу РІД. Якщо використовувався імуноферментний аналізатор має набір змінних інтерференційних світлофільтрів для блакитної області спектру, то чутливість аналізу можна додатково підвищити в 2-2,5 рази проведенням вимірювань при довжині хвилі 360-380 нм. Відтворюваність результатів мікротурбідиметричного визначення Ig G, Ig M та Ig A в контрольній і дослідній сироватках була не гірше 5%, що в 2-2,8 рази краще, ніж для методу РІД.

Таблиця - Основні аналітичні характеристики методу РІД і мікротурбідиметричного методу визначення Ig G, Ig M та Ig A людини (за даними Ан.И. Гордиенко, В.А. Белоглазов, Ал.И. Гордиенко).

Анти-ген	Діапазон визначуваних концентрацій антигена, мкг/мл		Відтворюваність %		Кількість визначень на 1 мл антисироватки	
	МікроТМ	РІД	МікроТМ	РІД	МікроТМ	РІД
Ig G	3,3-212	50-400	5	10	140	160
Ig M	3,9-251	70-560	5	14	70	80
Ig A	6-382	120-960	5	12	35	50

Примітка. МікроТМ – мікротурбідиметричний метод, РІД – радіальна імунодиффузія по Mancini.

При цьому коефіцієнти кореляції між даними за вмістом Ig G, Ig M та Ig A людини в стандартній сироватці крові й дослідних сироватках, отримані мікротурбідиметричним методом і методом РІД, складають відповідно 0,95, 0,95 і 0,94 ($p < 0,001$). Діапазон концентрацій Ig G, Ig M і Ig A, які визначаються в одній пробі без її додаткового розведення, для мікротурбідиметричного аналізу в середньому в 8 разів ширше, ніж для методу РІД.

Таким чином, використання мікротурбідиметричного методу визначення Ig G, Ig M та Ig A людини дозволяє істотно прискорити проведення аналізу; підвищити його точність і збільшити чутливість; розширити діапазон одночасно визначуваних концентрацій антигенів, а також скоротити витрату реагентів. Особливо перспективне використання цього методу для визначення вмісту імуноглобулінів в інших біологічних рідинах – сечі, бронхоальвеолярній рідині і тому подібне. Вказані переваги дозволяють рекомендувати мікротурбідиметричний метод визначення імуноглобулінів для ширшого використання в клінічній практиці як альтернативу методу РІД по Mancini.

ЗАВДАННЯ 5. Характеристика принципу методу, клінічного значення виявлення ЦК.

Метод заснований на селективній преципітації комплексів антиген-антитіло і агрегованих імуноглобулінів у 3,75%-му розчині ПЕГ-6000 та вимірюванні оптичної щільності розчину на спектрофотометрі (СФ) або фотоелектроколориметрі (ФЕК). Дану модифікацію запропонувала Л. М. Хашкова (1980).

Екзо- та ендогенні антигени можуть утворювати в організмі імунні комплекси (ІК), що є фізіологічною реакцією гуморальної імунної відповіді на нейтралізацію антигену. Далі, у нормі більшість імунних комплексів адсорбується на макро- та мікрофагах. Фіксація ІК на клітинах відбувається за допомогою рецепторів до константного фрагменту антитіл або через рецептор до третього компоненту комплексу. Опсонізовані на фагоцитах ІК фагуються і лізуються.

У випадку утворення значної кількості ІК, а також певного дефекту фагоцитарної системи організму або інших ланок імунітету, в організмі з'являється велика кількість вільних циркулюючих імунних комплексів (ЦК). Вони можуть адсорбуватися крім фагоцитів на клітинах інших тканин, які мають відповідні рецептори до С3. До таких клітин належить ендотелій кровоносних судин, клітини шкіри, нирок. Адсорбція на них ІК може активувати систему комплексу й викликати їх цитоліз, що в подальшому приводить до запальних реакцій. Захворювання, в патогенезі яких значну роль відіграють ЦК, називають "захворюваннями імунних комплексів". Вони входять до групи алергій і автоалергій 3-го типу по класифікації Кумбса і Джелл (1966). Прикладом таких захворювань є нефрити, васкуліти, артрити. ЦК реєструють при великій групі патологій: алергічних і автоімунних захворюваннях, серцево-судинній патології, гострих і хронічних захворюваннях, онкогенезі. Патогенна активність ЦК залежить від їх величини, складу, які, в свою чергу, залежать від виду антигену і антитіл.

ЗАВДАННЯ 6. Ознайомитись з будовою та правилами роботи спектрофотометру, фотоколориметру.

Відповідно інструкції, що додається до приладу, ознайомтесь з режимом його роботи. Зверніть увагу на правила техніки безпеки.

ЗАВДАННЯ 7. Реактиви та обладнання до методу виявлення ЦК за допомогою поліетиленгліколю 6000.

Реактиви:

1. 0,1 нормальний боратний буфер з рН 8,4.

2. Маточні розчини:

№ 1 - 1,24%-й розчин борної кислоти;

№ 2 - 1,9%-й розчин бури.

3. Робочі розчини: змішати 55 мл розчину № 1 і 45 мл розчину № 2, перевірити рН (8,4) і розвести дистильованою водою 1:2 (100 мл отриманого буфера і 200 мл дистильованої води).

4. 4,6%-й розчин ПЕГ-6000 на боратнім буфері, розведеному 1:2 дистильованою водою.

Обладнання: СФ, ФЕК, КФК-2.

ЗАВДАННЯ 8. Етапи постановки методу виявлення ЦК. Оцінка результатів, їх клінічне тлумачення.

На кожне дослідження беруть три пробірки. У першій пробірці розводять досліджувану сироватку 1:2. Для цього беруть 0,3 мл сироватки і до неї додають 0,6 мл боратного буферу. При роботі СФ одержаний розчин сироватки розливають по 0,3 мл в другу (контроль) і третю (дослід) пробірки. Потім в другу пробірку додають 2,7 мл боратного буфера, а в третю - 2,7 мл 4,16%-го ПЕГ-6000 на боратному буфері (кінцева концентрація 3,75 %). При роботі на ФЕК або КФК-2 об'єм взятих рідин сироватки, буфера, ПЕГ-6000 для складання розчинів збільшують, бо об'єм кювет в 1 см для ФЕК і КФК-2

більше, ніж кювета для СФ потрібної ширини. Для цього із першої пробірки, яка містить 0,9 мл розведеної 1:2 досліджуваної сироватки, беруть по 0,4 мл для другої і третьої пробірок. У другу пробірку додають 3,6 мл боратного буфера, а в третю - 3,6 мл 4,16%-го розчину ПКГ-6000.

Дослідну і контрольну пробірки інкубують 1-2 год. при кімнатній температурі. За цей час ЦК у 3,75 розчині ПЕГ-6000 втрачають розчинність, утворюють комплекси і розчин в дослідній пробірці мутніє. Потім на СФ, ФЕК, КФК-2 виявляють оптичну площу розчинів другої і третьої (дослід) пробірок в кюветах шириною 1 см (контроль) при довжині хвилі 150 нм (на СФ) або 440 нм (на ФЕК або КФК-2).

При цьому оптична площа другої пробірки (контроль) приймається за нуль, тоді як виміри показань прибору при колориметруванні третьої пробірки (дослід) обумовлені ЦК. У практично здорових людей рівень ЦК коливається в межах 0,1-0,01 одиниць площі. Результати дослідних пробірок занести в лабораторний зошит, порівняти з показниками у здорових осіб і зробити висновок про вміст ЦК в сироватці тестованих осіб.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Галузь застосування реакції ПРІД в імунології.
2. Який механізм утворення кілець преципітації?
3. Яке співвідношення між площиною (діаметром) кільця преципітації та концентрації реагентів – АГ-АТ?
4. Як складати калібровочну криву та як нею користуватися?
5. Привести приклади захворювань з підвищеним та зниженим вмістом імуноглобулінів G, A, M-класів.
6. Чи можна даним методом визначити кількість імуноглобулінів E-класу.
7. Який буфер використовують в реакції виявлення ЦК? Його склад?
8. Який механізм дії 3,75% розчину ПЕГ-6000 на ЦК?

9. При яких довжинах хвиль визначають ЦК на спектрофотометрі та фотоелектроколориметрі?

10. Які межі щільності розчину сироватки в ПЕГ, характерні для здорових осіб.

ТЕМА 12

СУЧАСНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОЛОГІЧНИХ ФАКТОРІВ У КЛІНІЧНОЇ ІМУНОЛОГІЇ: ІМУНОЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ, ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ, МЕТОД ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

МЕТА: засвоєння принципів сучасних методів клінічної імунології (імунофлуоресцентний, імуноферментний, полімеразна ланцюгова реакція).

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Принцип, розрішаюча здатність, варіанти та алгоритм постановки імунофлуоресцентного аналізу.

2. Принцип, розрішаюча здатність, варіанти та алгоритм проведення імуноферментного аналізу.

3. Загальна характеристика конкурентного та неконкурентного варіанта постановки імуноферментного аналізу.

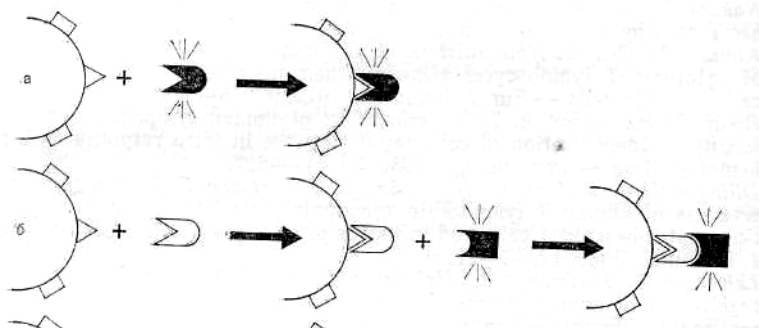
4. Принцип, розрішаюча здатність, етапи проведення полімеразної ланцюгової реакції.

5. Застосування у лабораторній імунології сучасних методів клінічної імунології (імунофлуоресцентний, імуноферментний, полімеразна ланцюгова реакція).

НАВЧАЛЬНІ ЗАВДАННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Ознайомитись з характеристикою принципу імунофлуоресцентного методу.

Імунофлуоресценція — це метод, заснований на використанні специфічності імунологічної реакції та чутливості флуоресцентної мікроскопії. Один з компонентів імунної реакції, як правило АТ, мітиться флуоресцентним фарбником (маркування, кон'югація). Після збудження флуоресцентного агента положення АГ стає доступним безпосередньому спостереженню внаслідок розвитку флуоресценції.



а) пряма імунофлуоресценція: флуорохромовані АТ до мембранних АГ;

б) непряма імунофлуоресценція: на першому етапі з мембранними АГ зв'язуються специфічні не мічені АТ, на другому етапі з АТ зв'язуються флуорохромовані нтивидові АТ.

ЗАВДАННЯ 2. Непрямий імунофлуоресцентний метод фенотипування лімфоцитів крові за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ).

2.1. Постановка непрямого варіанту визначення поверхневих антигенів за допомогою МКАТ (макрометод)

1) Лімфоцити виділяють із гепаринізованої крові центрифугуванням на градієнті фікол-верографіна (щільність 1,077-1,078 г/мл).

2) 1-0,1 млн лімфоцитів в об'ємі 50 мкл вносять у центрифужні пробірки або лунки 96-луночного круглодонного планшета. До клітин додають 5 мкл тестуючого моноклонального антитіла та інкубують 30-45 хв. при +4°C.

3) Додають 150 мкл розчину Хенкса і центрифугують 5 хв. при 200 g.

4) Видаляють супернатант. Потім вносять 50 мкл розчину Хенкса, клітини суспендують, додають 150 мкл розчину Хенкса і центрифугують 5 хв. при 200 g.

5) Видаляють супернатант. До осаду відмитих клітин додають 50 мкл F(ab)²-фрагментів овечих антитіл до Ig миші, мічених ФІТЦ і розведених 1:100. Для розведення використовують фізрозчин, забуферений фосфатами, що містить 0,5% желатини і 0,1% азиду натрію (замість забуференого фізіологічного розчину можна використовувати розчин Хенкса). Клітини суспендують та інкубують 30 хв. при +4°C.

6) Клітини 2 рази відмивають як зазначено в пунктах 3-4.

7) Клітини готові для спостереження імунофлуоресценції, однак якщо результати тесту будуть враховуватися лише через кілька годин, то клітини необхідно зафіксувати. Для цього після заключного центрифугування і видалення супернатанта до осаду клітин додають 50 мкл 1% параформальдегіда на забуференому фізіологічному розчині (можна використовувати розчин формаліну, розведеного 1:40 на забуференому фізіологічному розчині). Клітини суспендують. Фіксовані клітини зберігають флуоресценцію протягом тижня.

Пофарбовані клітини аналізуються на проточному цитометрі або проглядаються за допомогою флуоресцентного мікроскопа. В останньому випадку клітини суспендують, суспензія переноситься на предметне скло, накривається покривним склом і препарат проглядається під імерсією на флуоресцентному мікроскопі (об'єктив x90). Найкраща якість зображення досягається при використанні окулярів із невеликим збільшенням (x3 або навіть x1,7). Рекомендується використовувати нефлуоресцююче імерсійне масло. Оцінку результатів варто проводити в затемненому приміщенні. Кількість антиген-позитивних клітин визначають як % флуоресцюючих клітин при аналізі 200 лімфоцитів за вирахуванням % флуоресцюючих клітин, що

спостерігаються в препараті негативного контролю. У якості негативного контролю використовують препарати, підготовлені аналогічним способом, за винятком того, що замість моноклональних антитіл клітини обробляють розчином Хенкса або нормальними Ig миші.

2.2. Непрямий варіант визначення поверхневих антигенів за допомогою моноклональних антитіл (мікрометод)

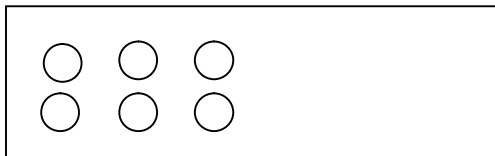
1) Кров перед нашаровуванням на градієнт щільності розводять 1:1 (у 2 рази) фізіологічним розчином.

2) Нашаровують розведену кров на 2-3 мл фікол-верографіна і центрифугують при 1500 об/хв 30 хвилин.

3) Відмити “кільце” фізіологічним розчином 2-3 рази (1-й раз - об'ємом, що дорівнює об'єму “кільця” - 20 хвилин при 1500 об/хв; 2-й раз - приблизно 5 мл - 5 хвилин при 1500 об/хв).

4) Зі стрічки Parafilm M вирізають ділянку по ширині предметного скла і яка за довжиною відповідає 6 отворам по 5 мм у діаметрі.

CD3 CD4 CD8



На один зразок сироватки

CD16 CD19 K

(20)

(22)

5) У стрічці Parafilm M пробійником із нержавіючої сталі пробивають лунки діаметром 5 мм.

6) Готується підложка з полі-L-лізину (PLL): у лунки вносять по 10 мкл PLL й інкубують у вологій камері при +37⁰C 40 хвилин, після чого

підговлену підложку промивають в 2-х склянках із забуференим фізіологічним розчином.

7) У кожен лунку вносять по 10 мкл суспензії клітин в концентрації 3-4 млн/мл та інкубують при $+37^{\circ}\text{C}$ 20 хвилин у вологій камері.

8) Переносять вологу камеру в холодильник на 20 хвилин при $+4^{\circ}\text{C}$, після чого промивають в 2-х склянках із забуференим фізіологічним розчином.

9) Наносять по 10 мкл у лунку моноклональних антитіл (МКАТ) та інкубують при $+4^{\circ}\text{C}$ у вологій камері 30 хвилин.

10) Промивають в 2-х склянках із забуференим фізіологічним розчином.

11) На наступному етапі вносять по 10 мкл F(ab)^2 -фрагментів овечих антитіл до Ig миші, мічених FITC (флуоресцеїнізотіоціанат), інкубують 30 хв. при $+4^{\circ}\text{C}$.

12) Промивають в 2-х склянках із забуференим фізіологічним розчином круговими рухами.

13) Витирають зворотній бік предметного скла й окреслюють склогографом поля лунок.

14) Висушують лунки на повітрі.

15) Видаляють стрічку Parafilm.

16) Наносять по 20-50 мкл 50% гліцерину на 4%-ному параформальдегіді, накривають покривним склом 24 x 24 мм.

17) Парафінують покривне скло.

Підрахунок проводиться при збільшенні ок. x10; об. x90 під імерсійним маслом, яке не флуоресцює. Підраховують 200 клітин. Позитивні клітини виражають у відсотках.

Для ідентифікації антигена у ядрах до цієї методики додаються пункти: (між 8 і 9)

8а. Вносять по 10 мкл 4% параформальдегіда на 5 хвилин.

8б. Промивають в 2-х склянках із забуференим фізіологічним розчином.

8в. Вносять у кожен лунку 10 мкл 0,2% розчину тритона X-100 на 5

хвилин. При цьому руйнується оболонка клітини.

8 г. Промивають в 2-х склянках із забуференим фізіологічним розчином.

Для клітин, що проліферують, застосовують відповідні CD замість приведених вище у переліку МКАТ.

ЗАВДАННЯ 3. Ознайомитись з характеристикою принципу імуноферментного методу.

Імуноферментний метод (ІФА) заснований на тому ж принципі, що й РІА, тільки замість радіоактивної мітки застосовується ферментна мітка. АГ і АТ, які вступають в імунну реакцію, мітяться ферментом. По перетворенню субстрату ферментом можна судити про кількість компоненту реакції АГ-АТ, що вступив у взаємодію. Чутливість ІФА дозволяє визначати мінімальні кількості речовини (нанограми). Розрізняють гомогенний і гетерогенний варіант ІФА.

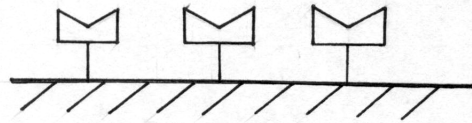
Гомогенний ІФА застосовується для визначення гаптена. У основі лежить інгібіція активності ферменту при приєднанні його до гаптена (активність ферменту відновлюється в результаті реакції АГ-АТ), або, навпаки, втрата активності маркерного ферменту в результаті реакції АГ-АТ. Тому видалення вільного АГ з суміші, яка містить зв'язаний АГ, неможливе.

При гетерогенному ІФА АГ або АТ фіксується на твердій фазі (пластик), а компоненти реакції, які не прореагували, видаляються багатократним відмиванням.

У ІФА розрізняють методи конкурентного і неконкурентного аналізу:

1) Конкурентний метод. АТ сорбовані на твердій фазі, АГ - мічений ферментом. Можливий варіант, коли АГ сорбований на твердій фазі, а АТ мічені ферментом.

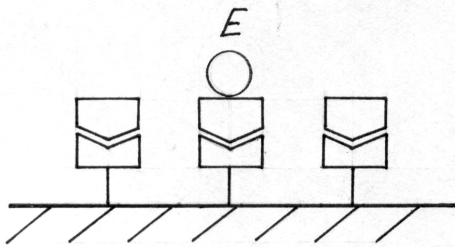
1. АГ сорбовані на твердій фазі, АГ мічений ферментом.



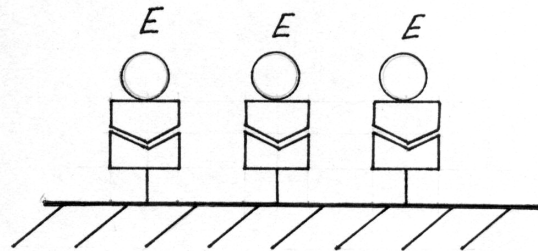
АГ зв'язуються з твердою фазою

2. Відмивка.

3. Інкубація з АГ, міченим ферментом у присутності (А) та відсутності досліджуваної проби (Б)



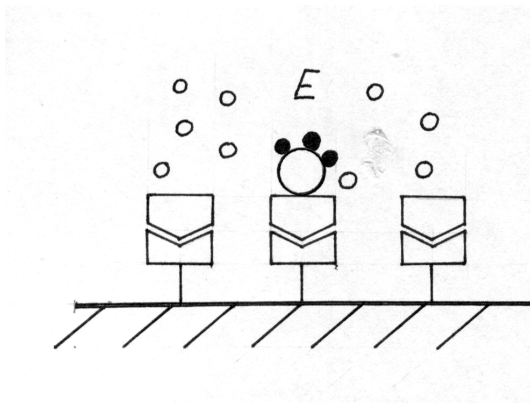
А

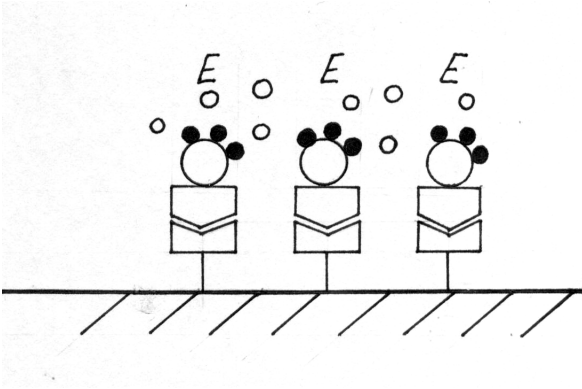


Б

4. Відмивка.

5. Інкубація з субстратом - ○ ; продукт реакції - ● (його кількість вимірюють) .

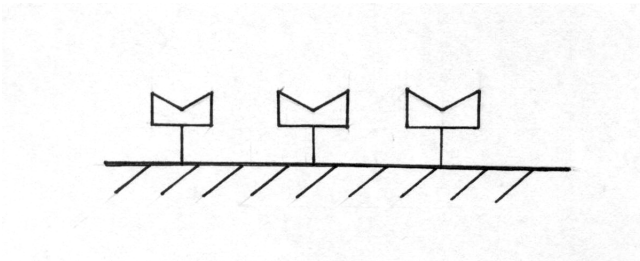




2) Неконкурентні методи.

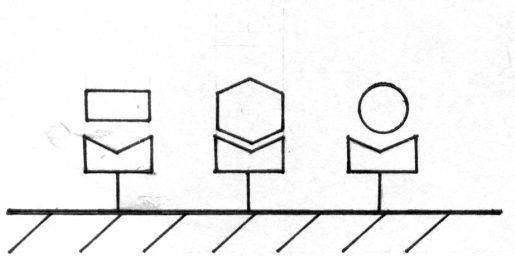
- «сендвіч - ІФА» (метод подвійних АТ для визначення АГ).

1. АТ зв'язуються з твердою фазою.



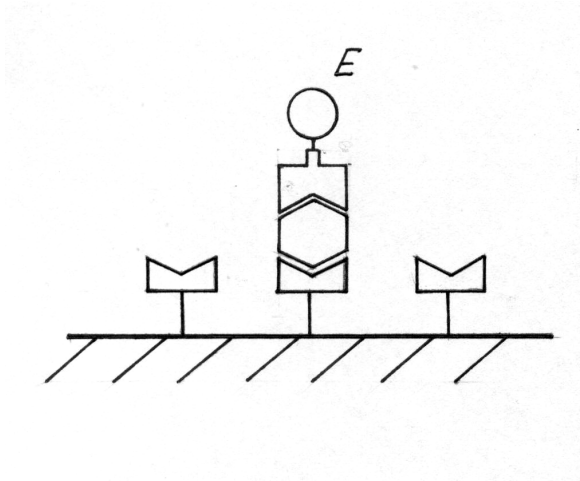
2. Відмивка.

3. Інкубація пробою, яка містить АГ.



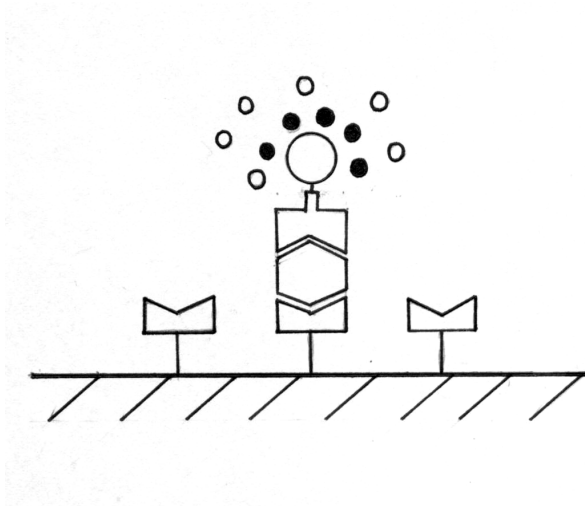
4. Відмивка.

5. Інкубація з кон'югатом АТ-фермент.



6. Відмивка.

7. Інкубація з субстратом - ○ ; продукт реакції - ● (його кількість вимірюють) .



3) Приклад проведення дослідження.

Схема кількісного визначення HB_s - антигена за допомогою ІФА.

А). Сенсibilізація полістиролових пробірок (антисироватка морської свинки (200 мкл) проти HB_s - антигена, 16 годин, $+4^\circ\text{C}$).

Б). Стандартний розчин HB_s - антигена або досліджувана сироватка (200 мкл, 2 години, $+37^\circ\text{C}$).

В). Анти - HB_s АТ кролика (200 мкл, 2 години, $+37^\circ\text{C}$).

Г). Антикroлячий баранячий Ig G, мічений пероксидазою (200 мкл, 2 години, 37°C).

Д). Субстрат діанізидин (500 мкл, 2 години, $+20^\circ\text{C}$).

Е). Зупинка реакції, 5 М HCl (500мкл).

Ж). Визначення екстинкції при довжині хвилі 535 нм.

По калібрувальній кривій визначають кількість НВs — антигена (мкг/мл).

ЗАВДАННЯ 4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Занести до лабораторного зошита принцип ПЛР та скласти схему (алгоритм) проведення ПЛР.

ДНК-діагностика — це один з найбільш сучасних високотехнологічних методів дослідження. ДНК-аналіз широко застосовується в діагностиці інфекційних захворювань, дозволяючи виявляти навіть одиничні мікроорганізми в організмі людини.

ДНК-діагностика об'єднує декілька методів дослідження, найпоширеніший з них — метод ПЛР.

ПЛР — (Polymerase chain reaction, PCR diagnostics) - розшифровується як полімеразна ланцюгова реакція. ПЛР діагностика — це метод лабораторної діагностики інфекційних захворювань, зокрема, цей метод широко застосовується і для діагностики захворювань, що передаються статевим шляхом.

Аналіз методом ПЛР заснований на виявленні в матеріалі дослідження невеликого фрагмента ДНК збудника тієї інфекції, яку підозрює лікар. При проведенні ПЛР-аналізу ведеться пошук такого фрагмента ДНК інфекції, який специфічний тільки для даного мікроорганізму. Це означає, що цей фрагмент ДНК «особливий» — він зустрічається тільки у цього мікроба (або групи споріднених мікробів), але не зустрічається ні у одного іншого мікроба. Сама полімеразна ланцюгова реакція використовується для того, щоб знайдений фрагмент розмножити, клонувати: щоб однозначно «побачити» ці фрагменти ДНК, до закінчення реакції їх повинно бути не менше 10^{12} штук.

Появі ПЛР сприяло відкриття унікального ферменту ДНК-полімерази (або taq-полімерази). Саме цей фермент каталізує і «контролює» всі процеси під час проведення аналізу методом ПЛР. Особливість цього ферменту — він

виключно термостійкий: він витримує нагрівання до температури кипіння без втрати активності, а «улюблений» його температурний режим під час роботи — 72С⁰. Багато реакцій при проведенні ПЛР йдуть майже виключно при підвищеній температурі.

Матеріалом для проведення ПЛР-діагностики може бути: зіскоб епітеліальних клітин (зіскоб з уретри у чоловіків і у жінок, зіскоб з цервікального каналу); кров, плазма, сироватка крові; біологічні рідини (рідина простати, плевральна, спинномозкова, навколоплідна, суглобова рідина, слина); сеча (використовується перша порція ранкової сечі); мокрота; біопати шлунку і дванадцятипалої кишки; слиз та інші біологічні виділення

Результат ПЛР-діагностики зазвичай можна отримати через 1,5—2 доби після задачі аналізу. Можливо отримання результатів ПЛР-тесту протягом одного дня.

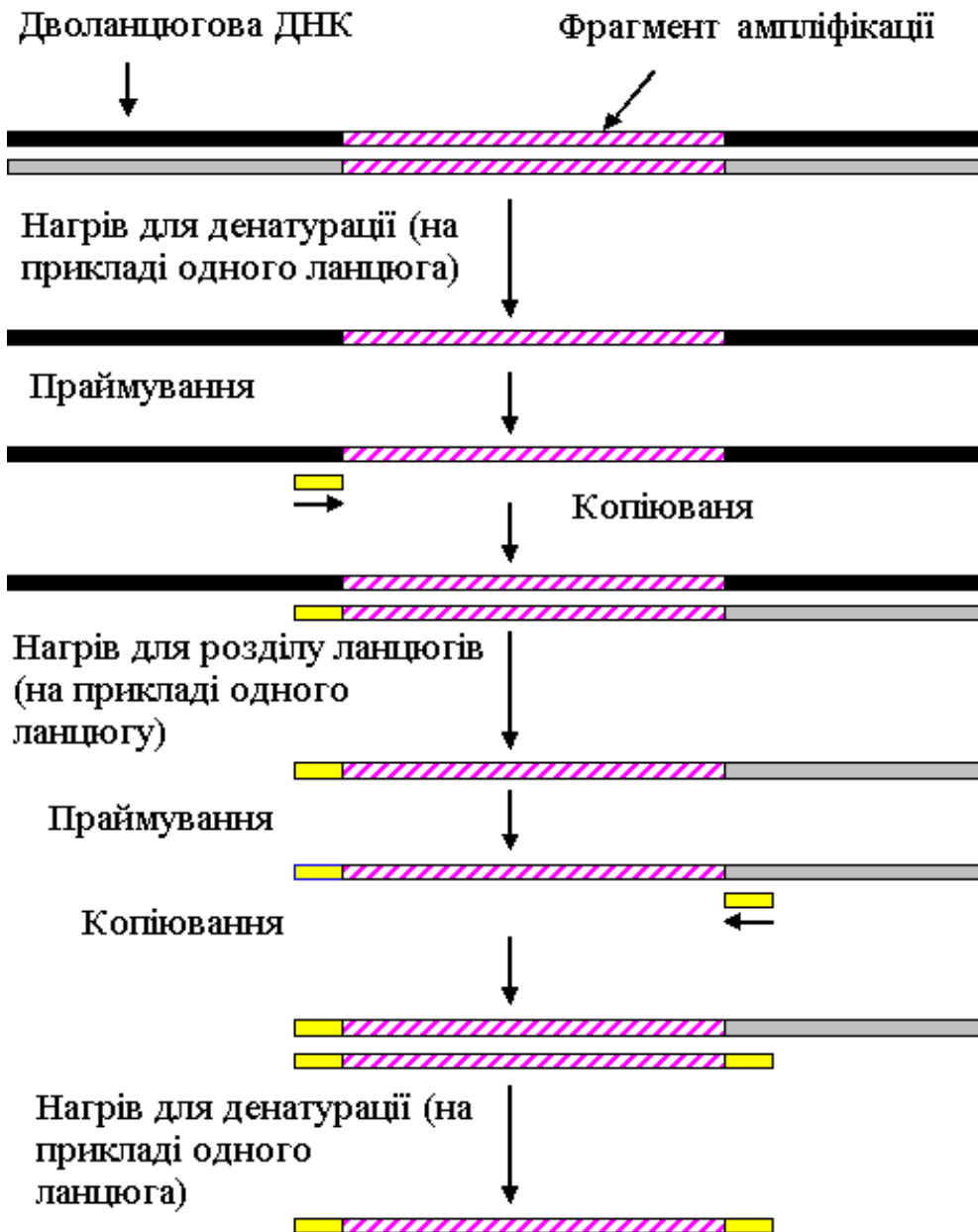
Кожен цикл діагностики інфекцій проходить в три стадії:

Денатурація - розплітання ланцюгів двониткової ДНК - не ферментативний процес, який йде при температурі 95С⁰.

Приєднання (віджиг) праймерів. Для початку процесу реплікації в ПЛР використовують праймери - коротку одноланцюгову ДНК (завдовжки 15-30 основ), яка додає в надлишку в реакційну суміш. Вони специфічно (за принципом комплементарного спаровування) приєднуються до коротких ділянок, що обмежують вибрану мішень. Ця стадія не є ферментативною і проходить в процесі інкубації реакційної суміші при 55-65С⁰. Праймери приєднуються тільки до вибраних специфічних для даного збудника фрагментів ДНК і не взаємодіють ні з якими іншими послідовностями ДНК (а в клінічній пробі дуже багато ДНК, як людини, так і різних мікроорганізмів). Саме цим забезпечується абсолютна специфічність діагностичної ПЛР-тест-системи. Надмірна кількість ДНК праймерів по відношенню до матричної ДНК забезпечує високу чутливість методу. Тобто праймери в початковому для ПЛР розчині з 100% вірогідністю знайдуть мішень для приєднання.

Етапи полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Проведення ПЛР в лабораторії.

Спрощена схема перебігу циклу полімеразно ланцюгової реакції



■ – це так звані 3'- і 5'-"липкі" кінці олігонуклеотиду.

В результаті приєднання праймерів утворюються структури [ДНК-матриця + праймер], що є затравочними комплексами. Починається добудовування праймерів, починаючи з 3'-кінців, шляхом комплементарного

синтезу на матрицях одноланцюгових фрагментів ДНК. Цей процес здійснюється за допомогою спеціального ферменту - Таq-полімерази (термостійкої ДНК-полімерази) і нуклеотидів (як будівельний матеріал).

Знов синтезована двуланцюгова ДНК після стадії денатурації, знову зв'язує праймери, які знаходяться в суміші в надлишку. Отримані структури після добудовування утворюють специфічні фрагменти ДНК, обмежені послідовностями праймерів. Таким чином, навіть якщо початковою для ПЛР була тільки одна молекула ДНК, то протягом 25 – 40 циклів відбувається ампліфікація, тобто синтезується велика кількість (10^8 - 10^9 копій) специфічних фрагментів ДНК (ампліконів), достатня для візуального обліку результату реакції після електрофорезу в агарозному гелі.

ПЛР проводять в циклаторі або ампліфікаторі – приладі, в якому циклічно автоматично виконується заданий режим зміни температур, що дозволяє багато разів послідовно проходити всі стадії процесу.

Облік реакції проводять за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Негативно заряджені молекули ДНК рухаються в гелі під дією електричного поля від катода до анода, при цьому довжина пробігу фрагментів ДНК за певний проміжок часу залежить від їх розміру. ДНК в гелі забарвлює бромідом етидію, що робить її видимою в ультрафіолетовому світлі. Якщо в досліджуваній пробі в результаті ПЛР накопичилися амплікони (фрагменти ДНК однакового розміру), то вони опиняться на одній відстані від старту і будуть видні як смуга на доріжці гелю. Якщо положення смуги на доріжці гелю відповідає розрахунковою для використаної пари праймерів, тобто знаходиться на тій же відстані від старту, що смуга позитивного контролю, то це означає, що результат дослідження позитивний.

Як і в кожному експерименті при обліку результатів ПЛР передбачають контролі – позитивний і негативний. Будь-яка діагностична тест-система повинна мати затверджений регламент, який включає наявність згаданих контролів.

Позитивний контроль – це зразок з ДНК-матрицею для накопичення

специфічного амплікону, відповідного визначуваному мікроорганізму.

Негативний контроль - вода, ДНК людини або ДНК мікроорганізмів, близькоспоріднених визначуваному даною тест-системою.

Переваги і недоліки ПЛР-діагностики

Аналіз методом ПЛР в діагностиці інфекційних захворювань має наступні переваги:

- пряме визначення збудників інфекційних захворювань;
- висока специфічність ПЛР-діагностики.

В процесі проведення аналізу в досліджуваному матеріалі виділяється фрагмент ДНК, специфічний, тобто властивий тільки конкретному збудникові - тільки певній бактерії або вірусу. Дана ділянка ДНК унікальна і не характерна ні для однієї інфекції на землі.

Висока чутливість ПЛР.

Виявлення інфекції можливе навіть в тому випадку, якщо в забраному у пацієнта матеріалі міститься лише одна клітина бактерії або вірусу. В порівнянні з іншими імунологічними і мікробіологічними методами діагностики: чутливість ПЛР-аналізу — 10—100 клітин в пробі, інші методи - 10^3 — 10^5 клітин.

Універсальність ПЛР-аналіза.

Для ПЛР-дослідження може застосовуватися практично будь-які матеріали, в тому числі недоступні для дослідження іншими методами: слиз, сеча, кров, сироватка, мокрота, еякулят, зскрібок епітеліальних клітин - оскільки інфекція може міститися в будь-яких біологічних виділеннях і тканинах.

Висока швидкість отримання результату ПЛР-аналіза.

Єдиний для всіх метод обробки забраного на аналіз у пацієнта матеріалу, детекція продуктів реакції, автоматизована ПЛР-ампліфікація дозволяють провести повну ПЛР-діагностику за 4—5 годин. На культуральні методи дослідження витрачається значно більше часу — від декількох діб до декількох тижнів, оскільки необхідне виділення, а потім і вирощування збудника на

культури клітин.

Можливість діагностики будь-якого виду інфекції. Висока чутливість методу ПЛР дозволяє діагностувати інфекцію не тільки на гострій стадії захворювання, але і хронічні інфекції і навіть наявність одиничних бактерій або вірусів. Аналіз методом ПЛР дозволяє виявити інфекції, які неможливо виявити в мазку на флору: хламідіоз, уреаплазмоз, мікоплазмоз, генітальний герпес.

Якими б значними перевагами не володів метод дослідження, але і ПЛР-діагностика має деякі обмеження. До недоліків ПЛР-діагностики можна віднести:

Імовірність отримання псевдопозитивного результату. ПЛР-аналіз може показати позитивний результат навіть в тому випадку, якщо інфекція вже мертва, «вбита» антибіотиками, але її мертві клітини все ще містяться в тканинах пацієнта. Наприклад, інфекція живе в клітинах епітелію (на слизовій оболонці статевих органів або очей). Її лікували. Але для «оновлення» клітин епітелію потрібний час. Якщо матеріал буде забраний лікарем до терміну повного оновлення клітин, в матеріалі можуть міститися мертві клітини інфекції. Клітини містять генетичний матеріал — ДНК або РНК збудника, який і «шукає» ПЛР. ПЛР не відрізняє мертві клітини від живих: вона шукає ДНК, і «клонує» їх у величезних кількостях. Результат такого аналізу позитивний. Насправді ж він є псевдопозитивним.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Галузь застосування імунофлуоресцентного, імуноферментного аналізу, полімеразної ланцюгової реакції в імунології.
2. Варіанти оцінки результатів імунофлуоресцентного метода.
3. Методичні варіанти визначення антигенів та антитіл в ELISA.
4. Принцип виявлення антигенів (на прикладі пухлинних) методом подвійних антитіл в “сендвіч”-варіанті ELISA.
5. Реактиви та обладнання для проведення ІФА, імунофлуоресцентного методів.

ДОДАТОК А

Примірне положення про лікаря-лаборанта-імунолога та про лабораторію імунології

ЗАТВЕРДЖЕНО

Наказ Міністерства
охорони здоров'я України
19.11.2002 N 422

ПРИМІРНЕ ПОЛОЖЕННЯ про лікаря-лаборанта-імунолога

1. Загальні положення

1.1. Лікар-лаборант-імунолог - фахівець з вищою освітою, який пройшов курс спеціалізації з "Лабораторної імунології", володіє різними лабораторними методами діагностики імунопатологічних станів (алергічних, аутоімунних, імунодефіцитних), теоретичними та практичними знаннями в області імунології та імунопатології у відповідності до вимог кваліфікаційної характеристики, має відповідний сертифікат.

1.2. У своїй роботі керується цим положенням та іншими нормативними документами МОЗ України.

1.3. Безпосередньо підпорядковується завідувачу лабораторії імунології, а при його відсутності - керівнику лікувального закладу або його заступнику з лікувальної роботи.

1.4. Призначення та звільнення лікаря-лаборанта-імунолога здійснюється за встановленим порядком керівником закладу.

2. Обов'язки лікаря-лаборанта-імунолога

2.1. Самостійно проводить необхідні діагностичні імунолабораторні дослідження (без формулювання клінічного діагнозу та призначення

імунотропної терапії).

2.2. Організовує та проводить визначення нормативних (середньорегіональних) показників для практично здорового населення для використання їх в якості регіонального контролю.

2.3. Уточнює об'єм раціональних методик імунолабораторного обстеження хворих.

2.4. Проводить імунолабораторне обстеження хворих, госпіталізованих у соматичні та спеціалізовані стаціонари, з метою виявлення різних форм імунопатології.

2.5. Виявляє та аналізує причини розходження даних досліджень імунологічного статусу, які отримані різними методами.

2.6. Приймає участь в удосконаленні та розробці методів оцінки функціонування імунної системи.

2.7. Контролює правильність проведення діагностичних імунолабораторних процедур, експлуатації апаратури та обладнання, раціональне використання реактивів, виконання правил техніки безпеки та охорони праці.

2.8. Несе відповідальність за оформлення медичної документації встановленого зразка у відповідності до вимог МОЗ України.

2.9. Підвищує свою кваліфікацію на науково-практичних конференціях, нарадах-семінарах, на циклах тематичного удосконалення не рідше одного разу на рік.

3. Права лікаря-лаборанта-імунолога

Лікар-лаборант-імунолог має право:

3.1. Контролювати роботу підлеглого йому середнього та молодшого медичного персоналу.

3.2. Приймати участь у нарадах, науково-практичних конференціях, бути членом різноманітних суспільних та професійних організацій.

3.3. Оцінювати (інтерпретувати) дані імунолабораторного обстеження.

4. Відповідальність лікаря-лаборанта-імунолога

Лікар-лаборант-імунолог несе відповідальність за неналежне обстеження хворих у встановленому законодавством порядку.

Начальник Головного управління
організації медичної
допомоги населенню

М.П.Жданова

ЗАТВЕРДЖЕНО

Наказ Міністерства

Охорони здоров'я України

19.11.2002 N 422

ПРИМІРНЕ ПОЛОЖЕННЯ про лабораторію імунології

1. Загальні положення

1.1. Лабораторія імунології є самостійним структурним підрозділом клінік науково-дослідних та медичних інститутів, обласних, міських лікарень. При наявності в медичному закладі центру клінічної імунології лабораторія імунології функціонально входить до його складу.

1.2. Лабораторію очолює лікар, що має I кваліфікаційну категорію зі спеціальності "Лабораторна імунологія". Він безпосередньо підпорядковується керівнику закладу або його заступнику з медичних питань або з поліклінічної роботи.

1.3. Призначення та звільнення завідуючого відбувається у встановленому порядку керівником закладу. При наявності в медичному закладі центру клінічної імунології завідувач лабораторії імунології в своїй методичній роботі функціонально підпорядковується керівнику центру.

2. Основні функції та завдання

Основними завданнями лабораторії є:

2.1. Надання профільної лабораторно-діагностичної допомоги населенню підпорядкованої території.

2.2. Проведення імунодіагностичних досліджень особам з груп ризику та хворим на імунодефіцити, аутоімунні, онкологічні захворювання.

2.3. Проведення імуномоніторингу з метою контролю ефективності терапевтичних заходів та спостереження за перебігом захворювань у хворих, які знаходяться на лікуванні в відділеннях клінічної імунології (імунотерапії), алергології, терапії, пульмонології, онкології, гематології, нефрології та інших відділеннях як в гострому періоді захворювання, так і в випадках хронічно перебігаючих захворювань, що потребує, у зв'язку з цим, довготривалого застосування протимікробних та імунотропних препаратів.

2.4. Встановлення наявності генетичної схильності щодо розвитку імуно- та алергопатології у пацієнтів.

2.5. Впровадження в практику роботи сучасних методів лабораторної діагностики імунозалежних захворювань.

2.6. Перелік основного обладнання, лабораторного посуду, реактивів та тест-систем, необхідних для лабораторної імунології (розраховане на комплексне обстеження 4 тисячі чоловік на рік).

Аналізатор імунохімічний	1 шт
Набір апаратури для проведення імуноферментного аналізу (спектрофотометр, промиваючий пристрій, термостат).....	1 компл
Апарат для електрофорезу	1 шт
Проточний цитометр.....	1 шт
Фотоелектроколориметр.....	1 шт
Термопапір для друкуючого пристрою	3 компл
Шейкер 5-3	1 шт
Мікроскоп бінокулярний "Біолам Р-17".....	3 шт
Люмінісцентний мікроскоп "Люам Р-8".....	1 шт
Освітлювач до мікроскопу ОИ-19 або ОИ-25.....	2 шт

Люмінометр.....	1 шт
Холодильник побутовий з морозильною камерою.....	2 шт
Холодильник на -20 град. С.....	1 шт
Лупа бінокулярна МБС-9.....	1 шт
СО ₂ - інкубатор	1 шт
Центрифуга ОС-6М.....	2 шт
Центрифуга СМ- на 12 пробірок.....	2 шт
Центрифуга ОПН-8	2 шт
рН-метр.....	1 шт
Приставка-утримувач для планшет до ротора центрифуги.....	4 шт
Ваги лабораторні електронні ВЕ-200 3 клас	1 шт
Ваги для сипуч. речовин ВСМ-5.....	2 шт
Термостат повітряний ТС-80.....	1 шт
Термобаня ТБ-110.....	1 шт
Протипильова шафа (ламінарний бокс).....	1 шт
Дистилятор ДЕ-10.....	1 шт
Апарат для інактивації сироватки крові	1 шт
Ареометр.....	1 шт
Ексикатор	2 шт
рН-метр.....	1 шт
Планшети стриптовані на 96 лунок.....	400 шт
Автоматичний пристрій для промивання планшет.....	1 шт
Камери Горяєва	4 шт
Лічильник лабораторний СЛ-1.....	1 шт
Лічильник формених елементів крові.....	1 шт
Цитологічна лійка-насадка.....	1 шт
Мікродозатори автоматичні (різного об'єму одно- та багатоканальні).....	20 шт
Комп'ютер.....	2 шт
Водяна баня.....	1 шт
Водоструменевий насос.....	1 шт

Гепарин.....	500 г
Желатин кристалічний	120 л
Розчин Хенкса.....	50 л
Середовище 199.....	50 л
Середовище RPMI-1640.....	4 л
Агар "Difco".....	1000 г
Азуреозин.....	200 г
Теляча ембріональна сироватка.....	1 л
Моноспецифічні сироватки проти IgA, M, G людини.....	50 компл
Моноспецифічні сироватки проти секреторного IgA людини.....	50 компл
Набір реактивів для кількісного визначення загального IgE.....	250 наб
Масло імерсійне	1000 г
Веронал.....	50 г
Мединал.....	50 г
Двозаміщений фосфатнокислий натрій.....	2000 г
Однозаміщений фосфатнокислий натрій.....	2000 г
Двозаміщений фосфатнокислий калій.....	1000 г
Однозаміщений фосфатнокислий калій.....	1000 г
Хлористий натрій.....	2000 г
Хлористий калій.....	1000 г
Мертиолат.....	10 г
Дріжджі пекарські	500 г
Глутаровий альдегід 25%-ий	500 мл
Фітогемагглютинін.....	5 фл
Ліпополісахарид	5 фл
Конканавалін А.....	5 фл
Фікол.....	3 кг
Верографін.....	40 компл
Мітоген лаконоса.....	20 фл
Латекс.....	500 мл

Поліетиленгліколь.....	200 г
Бура.....	300 г
Борна кислота.....	500 г
Нітросиній тетразолій.....	50 г
Метилловий зелений	200 г
Зимозан.....	50 г
Пеніцилін.....	48 фл
Стрептоміцин.....	48 фл
Льодяна оцтова кислота ХЧ.....	5 л
Соляна кислота.....	0,5 л
Їдкий натр.....	500 г
Глюкоза.....	2000 г
Цитрат натрію.....	1000 г
Лимона кислота.....	1000 г
Гемолітична сироватка (комерційна, суха).....	100 фл
Метанол.....	10 л
Фарба Романовського-Гімзи.....	4 л
Фарба Май-Грюнвальда.....	2 л
Фарба амідочорний	500 г
Сироватка антимишача люмінісцентна	за потребою
Імуноферментні тест-системи для визначення основних аутоантитіл (антиядерних, до тиреолобуліну, колагену та ін.).....	за потребою
Тест-системи для визначення рівнів компонентів комплементу	за потребою
Тест-системи для визначення рівнів IgG, M, A, E (ІФА).....	за потребою
Набори моноклональних антитіл в комплекті в флюорисцуючими антитілами до IgG миші для визначення кількості популяцій та субпопуляцій Т- та В-лімфоцитів.....	за потребою
Пробірки центрифужні.....	1000 шт
Пробірки хімічні.....	500 шт

Пробки гумові N 14, 5.....	3 000 г
Планшетки для імунологічних реакцій одноразового використання, круглодонні.....	400 шт
Скельця предметні	10000 шт
Піпетки пастеровські.....	10000 шт
Піпетки різного об'єму.....	500 шт
Покривні скельця.....	20000 шт
Пеніцилінові флакони з гумовими корками	1000 шт
Скляні капіляри з однаковим внутрішнім діаметром.....	500 шт
Фільтрувальний папір.....	10 кг
Гумові рукавиці.....	4000 шт

2.7. Перелік методів дослідження:

1. Визначення білкових фракцій.
2. Визначення гострофазових білків.
3. Визначення вмісту загального комплементу та окремих компонентів комплементу - С заг., С3, С4, С1інг.
4. Визначення фагоцитарної активності.
5. НСТ - тест (спонтанний, стимульований).
6. Визначення кількості популяцій та субпопуляцій лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл:
 - кількість Т-лімфоцитів (CD3);
 - кількість В-лімфоцитів (CD 19-22);
 - кількість Т-хелперів (CD4);
 - кількість Т-супресорів (CD 8);
 - кількість НК-клітин (CD 16).
7. Визначення функціональної активності Т- та В-лімфоцитів за допомогою реакції бласттрансформації.
8. Визначення стану клітинного імунітету за допомогою шкірних тестів з інфекційними recall-антигенами (кандіда, трихофітон, очищений туберкулін, правцевий та дифтерійний токсин, протей, стрептокок тощо).

9. Визначення у сироватці концентрації Ig M, G, A, E.
 10. Визначення циркулюючих імунних комплексів.
 11. Визначення специфічних гуморальних аутоантитіл.
 12. Визначення специфічної клітинної сенсibiliзації.
 13. Визначення алергії на ліки in vitro.
- 2.8. Нормативи витрати часу при проведенні імунологічних досліджень.

№п/п	Найменування дослідження	Затрачений час на одне дослідження в хв	
		лаборант	Лікар-лаборант
1. Визначення білкових фракцій методом електрофорезу			
	- поодинокі	120	30
	- кожне наступне	20	10
2. Визначення гострофазових білків			
	- поодинокі	15	20
	- кожне наступне	10	15
3. Визначення комплементарної активної сироватки крові			
3.1 За методом 50% гемолізу			
	- поодинокі	45	10
	- кожне наступне	20	10
3.2 Компонентів комплементу імунохімічним методом			
	- поодинокі	70	20
	- кожне наступне	55	15
4. Визначення фагоцитарної активності лейкоцитів			
4.1 Прямим візуальним методом			
	- поодинокі	80	44
	- кожне наступне	28	44
4.2 Імунохімічним методом			
	- поодинокі	20	10
	- кожне наступне	10	5

5. НСТ-тест			
5.1 НСТ-тест (спонтанний)			
	- поодинокі	10	20
	- кожне наступне	7	20
5.2 НСТ-тест (стимульований)			
	- поодинокі	16	20
	- кожне наступне	9	20
6. Визначення субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів імунолюмінесцентним методом			
	- поодинокі	150	75
	- кожне наступне	150	75
7. Реакція бласттрансформації з мітогенами			
	- поодинокі	20	10
	- кожне наступне	15	10
8. Визначення концентрації різних класів імуноглобулінів			
8.1 За методом Манчіні			
	- поодинокі	100	20
	- кожне наступне	10	8
8.2 Імунохімічним методом			
	- поодинокі	45	20
	- кожне наступне	15	10
9. Визначення циркулюючих імунних комплексів за допомогою осадження поліетиленгліколем-600			
	- поодинокі	20	10
	- кожне наступне	10	8
9.1	Приготування базових розчинів 1 раз на 2 тижні	180	-

10. Визначення ревматоїдного фактору в сироватці крові			
10.1 Реакція гемаглютинації (Ваалер-Розе)			
	- поодинокі	30	30
	- кожне наступне	10	8
10.2 Латекс-тест в модифікації Сперанського			
	- поодинокі	12	5
	- кожне наступне	6	5
11. Визначення титру антитіл методом гемаглютинації			
	- поодинокі	-	40
	- кожне наступне	-	17
12. Метод імуноферментного аналізу			
	- поодинокі	120	25
	- кожне наступне	20	15
13. Реакція гальмування міграції лейкоцитів (з антигенами) капілярним методом			
	- поодинокі	30	20
	- кожне наступне	10	20

Начальник Головного управління
організації медичної
допомоги населенню

М.П.Жданова

Інструкції до експлуатації приладів

ПРАВИЛА ЕКСПЛУАТАЦІЇ ТЕРМОСТАТУ ЕЛЕКТРИЧНОГО
СУХОПОВІТРЯНОГО ТС- 80М –2

1. Увімкніть термостат у мережу проводом з двополюсною виделкою із заземлюючим контактом.
2. Встановіть ручку тумблеру S2 у положення „СІТЬ”, при цьому вмикаються лампи цифрової індикації на табло.
3. Встановіть ручку тумблеру S1 у положення „УСТАНОВКА”. Через 60 с. ручками резисторів задайте необхідну температуру у робочій камері термостату, контролюючи її установку на світловому табло.
4. Встановіть ручку тумблеру S1 у положення „КОНТРОЛЬ”. Слідкуйте за значенням температури у робочій камері термостату.
5. При необхідності безперервного контролю робочої температури протягом всього часу роботи термостату до зажимів „ВИХІД” підключить само пишучий мілівольтметр.

ПРАВИЛА ЕКСПЛУАТАЦІЇ УЛЬТРАТЕРМОСТАТУ Т 4

1. До початку роботи ультратермостат потрібно підключити до електромережі.
2. Підключення ультратермостату до розетки без захисного контакту не дозволяється.
3. Вмикаючий вузол приводиться у дію клавішею-вмикачем. Підключення вузла сигналізується контрольною лампочкою.
4. Потрібну робочу температуру слід встановити за допомогою поворотної кнопки голівки контактного термометру.
5. По закінченню роботи відключити термостат натисканням клавіші вмикаючого вузла. Відключити від електромережі.

ПРАВИЛА ЕКСПЛУАТАЦІЇ ДИСТИЛЯТОРА ЕЛЕКТРИЧНОГО

1. Відкрити водопровідний кран.
2. Переставити вліво ручний вмикач, після чого загоряється сигнальна лампочка „СІТЬ”.
3. Після 10 хв. (час, необхідний для наповнення котлу водою) загоряється сигнальна лампочка „ДИСТИЛІЯТ” та одночасно почнеться безпосередньо процес дистиляції.
4. Для вимкнення дистилятора потрібно переставити вправо ручний вмикач.

ПРАВИЛА ЕКСПЛУАТАЦІЇ ВОДЯНОЇ БАНІ LW – 1

1. Заповнити резервуар бані водою, краще дистильованою.
2. Підключити баню до джерела живлення змінного струму.
3. Вмикання лазні здійснюється наступним чином:
 - Повністю вдавити кнопку перемикача;
 - Вмикання нагріву та встановлення температури здійснюється шляхом повороту рукоядки регулятора температури з кінцевого положення у праву сторону відповідно руху годинникової стрілки.
 - Рукоядка регулятора температури необхідна для встановлення температури в межах від 20° до 100°С.
4. Для того, щоб увімкнути баню, потрібно вдруге натиснути кнопку перевмикача, а після закінчення роботи – витягнути штепсель з сітьового гнізда.

ПРАВИЛА ЕКСПЛУАТАЦІЇ ШАФИ СУШИЛЬНО-СТЕРИЛІЗАЦІЙНОЇ

1. Розташувати у коробках предмети, що треба обробити.
2. Підключити шафу до мережі за допомогою шнура живлення.
3. Послабити стопорний гвинт магнітної голівки електроконтактного термометру та, повертаючи голівку, встановити на верхній шкалі потрібну температуру.

4. Натиснути на перемикач „СІТЬ”, при цьому повинні загорітися сигнальні лампи „СІТЬ” та „НАГРІВ”.

5. Точне встановлення температурного режиму здійснювати повільним обертанням голівки електроконтактного термометру у необхідному напрямку до досягнення температури у камері, близької до необхідної.

ПРАВИЛА ЕКСПЛУАТАЦІЇ рН-МЕТРУ рН – 340

1. Вимірювання проводять через 30 хв. після вмикання. Регулятор „вид роботи” в положенні „рН”.

2. Перед вимірюванням необхідно перевірити роботу рН-метру, в якому будуть проводитися вимірювання.

3. Перед вимірюванням необхідно встановити температуру досліджуваного розчину, яка визначається за допомогою термометру.

4. Спочатку вимірюється приблизне значення рН по нижній шкалі (положення регулятора „розмах” на 15 рН)

5. Потім регулятор „розмах” встановлюється в положенні 3 „рН”, а регулятор „межі вимірювання” в тому діапазоні рН, який необхідний для точного визначення.

6. Точне значення рН визначається по верхній шкалі приладу.

7. Після кожного визначення електроди необхідно промити дистильованою водою.

8. При додаванні до досліджуваної рідини інших розчинів необхідно користуватися магнітною мішалкою.

Про атестацію професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я



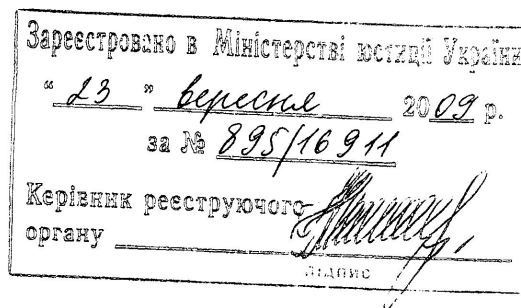
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НАКАЗ

12.08.2009

№ 588

м. Київ



Про атестацію професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я

Відповідно до вимог підпункту 33 пункту 4 Положення про Міністерство охорони здоров'я України, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 02.11.2006 № 1542, та з метою вдосконалення професійного рівня професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я,

НАКАЗУЮ:

1. Затвердити:

1.1. Положення про проведення атестації професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я (далі – Положення), що додається.

100 УДП

1.2. Номенклатуру спеціальностей професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я (далі – Номенклатура спеціальностей), що додається.

2. Керівникам органів, закладів, установ, організацій і підприємств охорони здоров'я України всіх форм власності протягом 2009 року через атестаційні комісії забезпечити присвоєння професіоналам з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я, кваліфікаційних категорій зі спеціальностей, передбачених Номенклатурою спеціальностей, після проходження передатестаційних циклів (далі – ПАЦ).

3. Міністру охорони здоров'я Автономної Республіки Крим, начальникам управлінь (головних управлінь) охорони здоров'я обласних, Київської і Севастопольської міських державних адміністрацій, головним державним санітарним лікарям Автономної Республіки Крим, областей, міст Києва та Севастополя, водного, залізничного, повітряного транспорту, керівникам закладів охорони здоров'я, безпосередньо підпорядкованих МОЗ:

3.1. Створити до 30.11.2009 атестаційні комісії відповідно до Положення, затвердженого підпунктом 1.1 пункту 1 цього наказу.

3.2. Забезпечити:

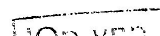
3.2.1. Ознайомлення професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я, з Номенклатурою спеціальностей та Положенням.

3.2.2. Проведення атестації професіоналів з вищою немедичною освітою відповідно до вимог Положення.

4. Департаменту кадрової політики, освіти і науки, ректорам вищих медичних навчальних закладів III - IV рівнів акредитації, що мають факультети післядипломної освіти, та ректорам закладів післядипломної освіти до кінця 2009 року організувати передатестаційні цикли для професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я за спеціальностями згідно з Номенклатурою спеціальностей, та розробити Положення про проведення іспитів на ПАЦ.

5. Визнати таким, що втратив чинність, наказ Міністерства охорони здоров'я України від 25.06.2003 № 281 "Про атестацію біологів, зоологів, ентомологів, які працюють у закладах та установах охорони здоров'я", зареєстрований у Міністерстві юстиції України 11.07.2003 за № 581/7902.

6. Професіонали з вищою немедичною освітою, які до набрання чинності цим наказом зараховані на лікарські посади в закладах охорони здоров'я, зберігають право на подальшу роботу на лікарських посадах тих же найменувань та атестацію на кваліфікаційну категорію з лікарських спеціальностей.

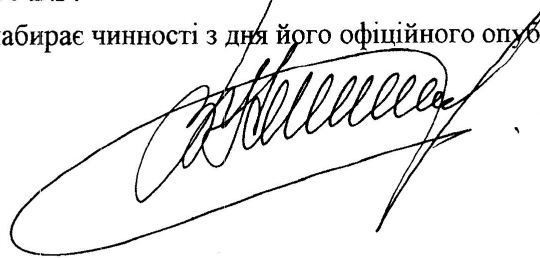


7. Директору Департаменту кадрової політики, освіти і науки Банчуку М.В. забезпечити організацію реєстрації наказу в Міністерстві юстиції України.

8. Контроль за виконанням даного наказу покласти на заступника Міністра Бідного В.Г.

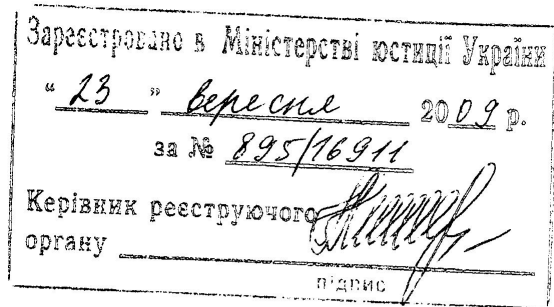
9. Цей набирає чинності з дня його офіційного опублікування.

Міністр



В.М. Князевич

ЗАТВЕРДЖЕНО
Наказ Міністерства охорони
здоров'я України
12.08.2009 № 588



ПОЛОЖЕННЯ
про проведення атестації професіоналів з вищою немедичною освітою, які
працюють в системі охорони здоров'я

І. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1.1. Це Положення регулює атестацію професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я: бактеріологів, біологів генетичної лабораторії, біологів імунологічної лабораторії, біологів, біохіміків клінічної лабораторії, біологів санітарно-гігієнічної лабораторії, біологів санітарно-епідеміологічної станції, ентомологів, зоологів, мікробіологів (далі – професіонали), яка проводиться з метою удосконалення діяльності лабораторної та санітарно-епідеміологічної служб системи охорони здоров'я щодо поліпшення надання медичної допомоги населенню, діяльності закладів охорони здоров'я, підбору і використання кадрів.

1.2. Основним завданням атестації є визначення рівня професійної підготовки професіоналів, оцінка їх трудової діяльності, можливості їх подальшого використання у системі охорони здоров'я та підвищення кваліфікації.

1.3. Встановлюються такі види атестації:

- атестація на визначення знань і практичних навиків з присвоєнням (підтвердженням) звання "спеціаліст";
- атестація на присвоєння кваліфікаційної категорії;
- атестація на підтвердження кваліфікаційної категорії.

1.4. Атестація на визначення знань та практичних навиків з присвоєнням (підтвердженням) звання "спеціаліст" проводиться комісіями, що створюються при вищих медичних навчальних закладах, які знаходяться у підпорядкуванні МОЗ III-IV рівнів акредитації (далі – ВМНЗ) та закладах післядипломної освіти.

1.5. Атестація на присвоєння (підтвердження) кваліфікаційних категорій проводиться атестаційними комісіями, що створюються при Міністерстві охорони здоров'я України (Центральна атестаційна комісія), Міністерстві охорони здоров'я Автономної Республіки Крим, управліннях (головних управліннях) охорони здоров'я обласних, Київської і Севастопольської міських державних адміністрацій (далі – органи охорони здоров'я), санітарно - епідеміологічних станціях Автономної Республіки Крим, областей, міст Києва та Севастополя, Центральній санітарно-епідеміологічній станції на водному транспорті, Центральній санітарно-епідеміологічній станції на залізничному транспорті, Центральній санітарно-епідеміологічній станції на повітряному транспорті (далі – СЕС) та органах охорони здоров'я відомчого підпорядкування.

1.6. Атестаційні комісії при Міністерстві охорони здоров'я Автономної Республіки Крим, управліннях (головних управліннях) охорони здоров'я обласних, Київської і Севастопольської міських державних адміністрацій, санітарно - епідеміологічних станціях Автономної Республіки Крим, областей, міст Києва та Севастополя, Центральній санітарно-епідеміологічній станції на водному транспорті, Центральній санітарно-епідеміологічній станції на залізничному транспорті, Центральній санітарно-епідеміологічній станції на повітряному транспорті проводять атестацію професіоналів безпосередньо підпорядкованих закладів охорони здоров'я, професіоналів, які працюють у закладах охорони здоров'я, підпорядкованих відомствам, що не мають своїх атестаційних комісій, та професіоналів, які працюють за наймом у суб'єктів господарювання, що зареєстровані в установленому порядку як юридичні особи та розташовані на території відповідної адміністративно-територіальної одиниці.

1.7. Центральна атестаційна комісія:

1.7.1. Проводить атестацію професіоналів закладів охорони здоров'я, підпорядкованих МОЗ.

1.7.2. Розглядає скарги на рішення атестаційних комісій на місцях з питань присвоєння кваліфікаційних категорій.

1.7.3. Здійснює методичне керівництво роботою атестаційних комісій.

1.8. Атестаційні комісії формуються з представників органів охорони здоров'я, СЕС, закладів охорони здоров'я, ВМНЗ та закладів післядипломної освіти, науково-дослідних інститутів, асоціацій та інших професійних і громадських об'єднань.

Персональний склад атестаційних комісій затверджується наказом органу охорони здоров'я, СЕС, при яких вони створюються.

У проведенні атестацій повинні брати участь не менше 2/3 кількості членів комісії. Рішення ухвалюється більшістю присутніх. При рівності голосів вирішальним є голос голови комісії.

1.9. Засідання атестаційних комісій проводяться не рідше одного разу на квартал згідно зі щорічним графіком, який затверджується перед початком нового календарного року керівником органу охорони здоров'я, СЕС, при яких створені комісії.

Атестаційна комісія веде протоколи своїх засідань. Протоколи та атестаційні справи зберігаються в установленому порядку.

1.10. Атестацію на присвоєння (підтвердження) кваліфікаційних категорій за спеціальностями «Клінічна лабораторна діагностика», «Генетика лабораторна», «Лабораторна імунологія» проходять професіонали з вищою немедичною освітою, які працюють на посадах біологів в клінічних лабораторіях; «Клінічна біохімія» - на посадах біохіміків; «Біологія» - біологів СЕС; «Зоологія» - зоологів СЕС; «Ентомологія» - ентомологів СЕС; «Лабораторні дослідження факторів навколишнього середовища» - біологів у санітарно-гігієнічних лабораторіях; «Бактеріологія» - бактеріологів; «Мікробіологія і вірусологія» - мікробіологів.

1.11. Атестація на присвоєння (підтвердження) кваліфікаційних категорій проводиться за бажанням професіонала. Професіонали, які протягом року після закінчення п'ятирічного строку з моменту попередньої атестації не виявили бажання і не подали документи на чергову атестацію, крім випадків, передбачених пунктом 4.2 цього Положення, та професіонали, яким за рішенням атестаційної комісії відмовлено у присвоєнні (підтвердженні) другої кваліфікаційної категорії, підлягають атестації на визначення знань та практичних навиків з підтвердженням звання "спеціаліст".

Особи, яким присвоєна кваліфікаційна категорія, проходять атестацію на її підтвердження один раз на п'ять років.

За бажанням професіонала атестація на присвоєння кваліфікаційної категорії може бути проведена позачергово, але не раніше ніж через один рік з моменту попередньої атестації.

1.12. У разі виявлення істотних недоліків у роботі професіонала з вищою немедичною освітою керівник органу охорони здоров'я чи закладу охорони здоров'я може направити подання у відповідну атестаційну комісію про зняття кваліфікаційної категорії чи звання спеціаліста незалежно від строку присвоєння (підтвердження) категорії чи звання. Подання розглядається комісією у порядку, визначеному пунктами 4.5 - 4.8 цього Положення, без попереднього проходження передатестаційного циклу (далі – ПАЦ) і подання звіту про професійну діяльність за останні три роки роботи.

100/100

II. АТЕСТАЦІЯ НА ВИЗНАЧЕННЯ ЗНАТЬ ТА ПРАКТИЧНИХ НАВИКІВ З ПРИСВОЄННЯМ (ПІДТВЕРДЖЕННЯМ) ЗВАННЯ "СПЕЦІАЛІСТ"

2.1. Атестації на визначення знань та практичних навиків з присвоєнням звання "спеціаліст" підлягають професіонали, які пройшли курси спеціалізації за однією із спеціальностей, та професіонали, які своєчасно не пройшли атестацію на кваліфікаційну категорію або яким відмовлено у присвоєнні (підтвердженні) другої кваліфікаційної категорії.

2.2. Атестаційна комісія, яка проводить атестацію на визначення знань та практичних навиків з присвоєнням (підтвердженням) звання "спеціаліст", та графік її засідання затверджуються ректором ВМНЗ, де проводиться підготовка або перепідготовка професіоналів.

Голова комісії призначається із числа висококваліфікованих спеціалістів. До складу атестаційної комісії на правах членів можуть входити: завідувачі, професори або доценти профільних кафедр, спеціалісти органів (закладів) охорони здоров'я, представники асоціацій та інших професійних і громадських об'єднань.

2.3. Атестаційній комісії з визначення знань та практичних навиків з присвоєнням (підтвердженням) звання "спеціаліст" не пізніше ніж за тиждень до початку її засідання подаються такі документи:

письмова заява;

копія диплома;

заповнений атестаційний листок встановленого зразка (додаток 1).

Професіонал має право представити комісії матеріали, що характеризують рівень його кваліфікації та практичної підготовки.

2.4. Атестацію на визначення знань та практичних навиків проводять згідно з Номенклатурою спеціальностей професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в системі охорони здоров'я (далі – Номенклатура спеціальностей), та з урахуванням вимог кваліфікаційних характеристик професіоналів.

Професіоналом однієї із спеціальностей, що затверджена Номенклатурою спеціальностей, може бути особа з повною вищою немедичною освітою за спеціальностями: «Біологія», «Генетика», «Мікробіологія-вірусологія», «Біохімія», «Хімія», «Зоологія», «Ентомологія», яка пройшла курси спеціалізації, має сертифікат спеціаліста та необхідну теоретичну і практичну підготовку з відповідної спеціальності.

2.5. За результатами атестації на визначення знань та практичних навиків комісія приймає такі рішення: присвоїти (підтвердити) або відмовити у присвоєнні (підтвердженні) звання "спеціаліст" з конкретної спеціальності.

Результати атестації доводяться до відома осіб, що атестуються, одразу після закінчення засідання комісії.

2.6. Протокол з рішенням атестаційної комісії при закладі охорони здоров'я про присвоєння (підтвердження) звання "спеціаліст" з конкретної спеціальності затверджується наказом у десятиденний термін по ВМНЗ або по закладу післядипломної освіти, при якому створена комісія.

2.7. Особі, якій за результатами атестації на визначення знань та практичних навиків присвоєно (підтверджено) звання "спеціаліст" з відповідної спеціальності, закладом (факультетом) післядипломної освіти видається сертифікат встановленого зразка (додаток 2), а особі, якій відмовлено в присвоєнні (підтвердженні) звання "спеціаліст" з відповідної спеціальності, - витяг із протоколу засідання атестаційної комісії, завірений ВМНЗ, не пізніше трьох днів з моменту затвердження протоколу засідання комісії.

2.8. Рішення атестаційної комісії, яким особі відмовлено у присвоєнні (підтвердженні) звання "спеціаліст" з відповідної спеціальності, може бути оскаржено у судовому порядку відповідно до чинного законодавства.

ІІІ. АТЕСТАЦІЯ НА ПРИСВОЄННЯ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ КАТЕГОРІЇ

3.1. До атестації на присвоєння кваліфікаційних категорій допускаються особи з вищою немедичною освітою, які працюють за сертифікатом спеціаліста та закінчили протягом року, що передуює атестації, ПАЦ на базі закладу (факультету) післядипломної освіти.

3.2. Комплектування ПАЦ проводиться відповідно до щорічної потреби закладів охорони здоров'я у навчанні професіоналів, які підлягають атестації.

Видача путівок на ПАЦ проводиться закладом (факультетом) післядипломної освіти за поданням органу охорони здоров'я, СЕС або за особистою заявою професіонала.

3.3. Після закінчення ПАЦ екзаменаційною комісією, яка створюється на відповідній кафедрі, проводиться іспит. Професіоналам, які успішно склали іспит, закладом (факультетом) післядипломної освіти видається свідоцтво встановленого зразка (додаток 3) з рекомендацією про присвоєння відповідної кваліфікаційної категорії.

Професіонали, які отримали незадовільну оцінку на іспиті, після ПАЦ допускаються до складання повторного іспиту тільки після закінчення нового ПАЦ.

3.4. Професіонали, які бажають пройти атестацію на присвоєння кваліфікаційної категорії, подають секретарю відповідної атестаційної комісії

згідно з вимогами пункту 1.6, підпункту 1.7.1 пункту 1.7 цього Положення атестаційну справу не пізніше як за два місяці до початку її роботи.

3.4.1. До атестаційної справи належать такі документи:
 письмова заява професіонала про присвоєння кваліфікаційної категорії за спеціальністю згідно з Номенклатурою спеціальностей;
 заповнений атестаційний листок встановленого зразка;
 копія диплома;
 копія сертифіката "спеціаліст";
 свідоцтво про складання іспиту зі спеціальності після проведення передатестаційного циклу;
 оригінал та копія посвідчення про кваліфікаційну категорію (за наявності);
 копія трудової книжки;
 звіт про професійну діяльність за останні три роки, затверджений керівником закладу охорони здоров'я, СЕС.

3.4.2. Професіонали, які змінювали місце роботи за останні три роки, подають звіти з попередніх місць роботи, затверджені керівниками цих закладів, при цьому загальний строк перерв у роботі не повинен перевищувати трьох місяців (стаж роботи на останньому місці - не менше одного року).

Усі копії засвідчуються в установленому законодавством порядку.

3.4.3. Професіонали, які працюють за наймом у суб'єктів господарювання, що зареєстровані в установленому порядку як юридичні особи, додатково подають ксерокопію ліцензії на здійснення суб'єктами господарювання підприємницької діяльності з медичної практики за відповідною спеціальністю.

3.5. У звіті, який професіонал готує у довільній формі обсягом не більше 20 сторінок друкованого тексту, викладаються основні функції та особливості його професійної діяльності, показники роботи, передбачені статистичними формами, їх аналіз тощо.

Атестаційною комісією звіт професіонала направляється на рецензію висококваліфікованим спеціалістам.

3.6. Атестаційна комісія виносить своє рішення про присвоєння кваліфікаційної категорії на підставі рецензії на звіт, документів, поданих відповідно до пункту 3.4 цього Положення, та співбесіди з професіоналом.

Встановлювати категорії вищі, ніж рекомендовані закладом (факультетом) післядипломної освіти, комісії не дозволяється.

3.7. Кваліфікація професіоналів визначається атестаційною комісією за трьома кваліфікаційними категоріями: друга, перша, вища.

Юр. упр.

3.7.1. Друга кваліфікаційна категорія:

присвоюється професіоналам зі стажем роботи з даної спеціальності не менше п'яти років, які мають необхідну теоретичну та практичну підготовку за відповідною спеціальністю, володіють сучасними методами клініко-діагностичних та санітарно-гігієнічних досліджень, забезпечують облік та аналіз основних клініко-діагностичних та санітарно-гігієнічних показників.

3.7.2. Перша кваліфікаційна категорія:

присвоюється професіоналам зі стажем роботи з даної спеціальності не менше семи років, які мають необхідну теоретичну та практичну підготовку за відповідною та за суміжними спеціальностями, володіють сучасними методами клініко-діагностичних та санітарно-гігієнічних досліджень, забезпечують облік та аналіз основних клініко-діагностичних та санітарно-гігієнічних показників, знають суміжні дисципліни, основи первинної профілактики захворювань та санітарно-просвітньої роботи.

3.7.3. Вища кваліфікаційна категорія:

присвоюється професіоналам, які мають стаж роботи з даної спеціальності не менше десяти років, високу теоретичну та практичну професійну підготовку та за суміжними спеціальностями, володіють сучасними методами клініко-діагностичних та санітарно-гігієнічних досліджень, забезпечують облік та аналіз основних клініко-діагностичних та санітарно-гігієнічних показників, знають суміжні дисципліни, основи первинної профілактики захворювань, санітарно-просвітньої роботи, клінічного значення лабораторних досліджень в діагностиці захворювань, сучасні напрями розвитку лабораторної служби.

3.8. При присвоєнні кваліфікаційних категорій рекомендується дотримуватися послідовності: друга, перша, вища.

3.9. За результатами атестації на присвоєння кваліфікаційної категорії комісія приймає такі рішення: присвоїти кваліфікаційну категорію або відмовити у присвоєнні кваліфікаційної категорії з відповідної спеціальності.

У разі відмови у присвоєнні кваліфікаційної категорії, на яку претендує професіонал, комісія або підтверджує раніше присвоєну категорію, або понижує її.

Якщо атестація відбулася позачергово, час наступної атестації обчислюється новим п'ятирічним строком.

3.10. Протокол з рішенням комісії про присвоєння кваліфікаційної категорії затверджується наказом органу охорони здоров'я, СЕС, при якому створена комісія, в десятиденний строк з дня атестації.

3.11. Професіоналам, яким присвоєно кваліфікаційну категорію, органом охорони здоров'я, СЕС, при яких створені атестаційні комісії, видається посвідчення встановленого зразка (додаток 4).

Підпис

Професіоналам, яким унаслідок атестації змінена кваліфікаційна категорія, видається нове посвідчення.

Особам, яким відмовлено у присвоєнні другої кваліфікаційної категорії, у двотижневий термін з дня атестації видається витяг із протоколу засідання комісії, завірений керівником відповідного органу охорони здоров'я, СЕС.

3.12. Рішення атестаційної комісії може бути оскаржено до Центральної атестаційної комісії в місячний строк з дня видачі посвідчення або витягу із протоколу засідання комісії.

Рішення Центральної атестаційної комісії може бути оскаржено у судовому порядку відповідно до вимог чинного законодавства України.

IV. АТЕСТАЦІЯ НА ПІДТВЕРДЖЕННЯ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ КАТЕГОРІЇ

4.1. Атестації на підтвердження кваліфікаційної категорії підлягають професіонали, у яких закінчується п'ятирічний строк з дня присвоєння (підтвердження) кваліфікаційної категорії.

4.2. Від атестації на підтвердження кваліфікаційної категорії звільняються вагітні жінки та особи, що перебувають у відпустці по догляду за дитиною, згідно з чинним законодавством. Термін їх чергової атестації переноситься на період вагітності та перебування у відпустці по догляду за дитиною.

У випадку виробничої необхідності або з інших об'єктивних причин термін атестації на підтвердження кваліфікаційної категорії переноситься наказом органу охорони здоров'я, СЕС, які проводять атестацію, на строк не більше одного року.

4.3. Перед атестацією на підтвердження кваліфікаційної категорії професіонали проходять ПАЦ на базі закладів (факультетів) післядипломної освіти.

4.4. Професіонали, які бажають пройти атестацію на підтвердження кваліфікаційної категорії, подають секретарю відповідної атестаційної комісії документи, визначені у пунктах 3.4, 3.5 цього Положення.

4.5. За результатами атестації на підтвердження кваліфікаційної категорії комісія приймає такі рішення: підтвердити кваліфікаційну категорію з відповідної спеціальності або відмовити у підтвердженні кваліфікаційної категорії.

У разі відмови у підтвердженні кваліфікаційної категорії атестаційна комісія виносить рішення про її зниження чи зняття.


4.6. При підтвердженні професіоналом кваліфікаційної категорії в посвідченні ставиться відповідна відмітка або видається нове посвідчення, коли у попередньому не залишилось місця для відміток.

Професіоналам, яким за наслідками атестації на підтвердження кваліфікаційної категорії змінено кваліфікаційну категорію, у двотижневий строк з дня атестації видаються нові посвідчення, у разі відмови у підтвердженні другої кваліфікаційної категорії - витяг із протоколу засідання атестаційної комісії, завірений керівником відповідного органу охорони здоров'я, СЕС.

4.7. Рішення атестаційної комісії про відмову у підтвердженні кваліфікаційної категорії (або про її зниження чи зняття) у десятиденний строк доводиться до відома адміністрації за місцем роботи атестованого.

4.8. Оскарження рішення атестаційної комісії про зниження чи зняття кваліфікаційної категорії проводиться у порядку, передбаченому пунктом 3.12 цього Положення.

Директор Департаменту
кадрової політики, освіти і науки



М.В. Банчук

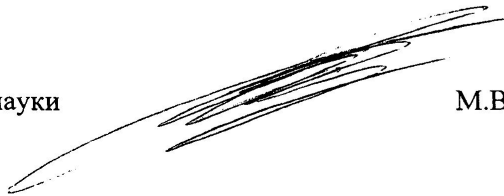
Юр. ут

ЗАТВЕРДЖЕНО
Наказ Міністерства охорони
здоров'я України
12.08.2009 № 588

**Номенклатура спеціальностей
професіоналів з вищою немедичною освітою, які працюють в
системі охорони здоров'я**

1. Бактеріологія
2. Біологія
3. Генетика лабораторна
4. Ентомологія
5. Зоологія
6. Клінічна біохімія
7. Клінічна лабораторна діагностика
8. Лабораторні дослідження факторів
навколишнього середовища
9. Лабораторна імунологія
10. Мікробіологія і вірусологія

Директор Департаменту
кадрової політики, освіти і науки



М.В. Банчук

Цитоморфометричне дослідження лімфоцитів
периферичної крові людини

№ п/п	d max, у.о.	d min, у.о.	d сер., у.о.	d сер., мкм (к=6,67)	№ п/п	d max, у.о.	d min, у.о.	d сер., у.о.	d сер., мкм (к=6,67)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,5	1,2			23	1,8	1,5		
2	2	1,6			24	1,4	1,2		
3	1,3	1,2			25	1,4	1,4		
4	1,1	0,8			26	1,5	1,4		
5	1,3	1,1			27	1,8	1,5		
6	1,5	1,3			28	2,5	2		
7	1,4	1,4			29	2	1,8		
8	1,3	1,4			30	1,7	1,2		
9	1,3	1,2			31	2,5	1,7		
10	1,4	1,2			32	1,7	1,5		
11	1,4	1,3			33	1,5	1,5		
12	1,7	1,3			34	2	1,3		
13	2,1	2			35	2	1,8		
14	1,8	1,5			36	2	2		
15	1,7	1,2			37	1,4	1,2		
16	2,2	2			38	2	1,8		
17	1,5	1,4			39	2	1,8		
18	1,5	1,2			40	1,2	1,2		
19	1,9	1,7			41	2,2	1,8		
20	1,8	1,2			42	1,8	1,3		
21	1,2	1,1			43	1,8	1,4		
22	2	1,8			44	1,8	1,4		

Продовження додатка Д

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
45	2	2			72	1,2	1,2		
46	1,8	1,4			73	1	0,8		
47	2	1,8			74	0,8	0,8		
48	2	1,5			75	0,8	0,8		
49	1,4	1,4			76	0,8	0,8		
50	2	2			77	1	0,8		
51	2,4	1,7			78	0,8	0,8		
52	2,5	1,6			79	0,5	0,5		
53	1,6	1,3			80	1,7	1,7		
54	1,8	1,8			81	0,8	0,8		
55	1,8	1,5			82	1	1		
56	2	2			83	0,7	0,7		
57	1,8	1,4			84	0,8	0,8		
58	1,8	1,8			85	1	1		
59	1,8	1,4			86	1,4	1,2		
60	1,8	1,4			87	0,7	0,7		
61	1,8	1,7			88	1,4	1,2		
62	1,8	1,3			89	1	1		
63	2	1,8			90	1,2	1		
64	2	1,3			91	1	1		
65	1,2	1,1			92	0,7	0,7		
66	1,5	1,3			93	1,4	1,4		
67	1,5	1,5			94	1,4	1,2		
68	2	1,8			95	1,4	1		
69	1,8	1,8			96	1,2	1,1		
70	0,8	0,8			97	1,2	1		
71	1	1			98	2	1,2		

Продовження додатка Д

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
99	1,1	1			126	1,8	1,8		
100	1,2	1			127	1,4	1,7		
101	1	1			128	1,6	1,3		
102	1,1	1,1			129	1,8	1,6		
103	1,2	1,1			130	2	2		
104	1,2	1,2			131	2,5	2,2		
105	1	1			132	2	1,8		
106	1	1			133	1,8	1,6		
107	1,4	1,2			134	1,8	1,8		
108	1,2	1,1			135	1,5	1,3		
109	1	1			136	2	1,8		
110	1	1			137	0,5	0,5		
111	1,8	1,3			138	0,7	0,7		
112	1,8	1,7			139	1,5	1,3		
113	1,5	1,3			140	1,7	1,5		
114	1,6	1,3			141	1,6	1,3		
115	2	2			142	1,8	1,2		
116	1,8	1,4			143	1,8	1,5		
117	1,8	1,8			144	1,5	1,4		
118	1,5	1,5			145	1,4	1,2		
119	0,8	0,8			146	1,4	1,4		
120	1	0,8			147	1,8	1,5		
121	1,7	1,7			148	1,7	1,5		
122	1	1			149	1,2	1,1		
123	2	1,8			150	1,9	1,7		
124	0,7	0,7			151	1,5	1,5		
125	1,4	1,1			152	1,7	1,5		

Продовження додатка Д

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
153	2,2	1,8			180	1	0,8		
154	1,8	1,3			181	0,5	0,5		
155	2	1,5			182	0,7	0,7		
156	1,4	1,4			183	1,8	1,6		
157	1,4	1,2			184	1,5	1,3		
158	1,5	1,3			185	1	1		
159	1,7	1,5			186	0,7	0,7		
160	1,8	1,6			187	1,4	1,2		
161	1,9	1,7			188	1,4	1,3		
162	1,2	1,1			189	1,2	1,1		
163	1,4	1,2			190	2	1,8		
164	1,4	1,2			191	2	1,2		
165	1,2	1,1			192	0,4	1,2		
166	1,6	1,3			193	1,2	1		
167	1,8	1,8			194	2	2		
168	1,8	1,5			195	1,8	1,7		
169	2	2			196	1,6	1,3		
170	1,8	1,4			197	1,5	1,3		
171	1,8	1,4			198	1,8	1,8		
172	1,8	1,7			199	1,4	1,1		
173	2	1,8			200	2,5	1,5		
174	1,5	1,5							
175	1,2	1,1							
176	1,5	1,3							
177	1,8	1,8							
178	1,6	1,3							
179	0,8	0,6							

ДОДАТОК Е

Визначення функціонального стану лімфоцитів периферичної крові людини
авідним розетковим методом

№ п/п	n ЕБ	№ п/п	n ЕБ	№ п/п	n ЕБ	№ п/п	n ЕБ
1	2	3	4	5	6	7	8
1	2	24	0	47	8	70	2
2	8	25	9	48	3	71	0
3	0	26	2	49	8	72	10
4	0	27	8	50	2	73	2
5	8	28	0	51	4	74	9
6	1	29	4	52	1	75	0
7	2	30	9	53	10	76	3
8	0	31	2	54	4	77	2
9	9	32	0	55	8	78	10
10	2	33	8	56	4	79	1
11	0	34	0	57	1	80	9
12	10	35	3	58	8	81	3
13	2	36	8	59	1	82	8
14	3	37	0	60	8	83	4
15	0	38	1	61	1	84	4
16	8	39	3	62	4	85	8
17	1	40	10	63	9	86	4
18	4	41	0	64	3	87	9
19	1	42	8	65	1	88	3
20	9	43	1	66	4	89	0
21	0	44	4	67	10	90	1
22	0	45	9	68	3	91	8
23	8	46	3	69	4	92	3

Продовження додатка Е

1	2	3	4	5	6	7	8
93	4	120	0	147	9	174	10
94	8	121	8	148	2	175	3
95	1	122	4	149	3	176	2
96	10	123	1	150	8	177	8
97	0	124	0	151	2	178	3
98	8	125	8	152	4	179	8
99	1	126	1	153	9	180	4
100	4	127	10	154	3	181	10
101	9	128	0	155	4	182	1
102	3	129	8	156	8	183	4
103	4	130	3	157	4	185	8
104	8	131	4	158	0	186	3
105	9	132	9	159	1	187	1
106	2	133	3	160	10	188	4
107	4	134	3	161	3	189	9
108	8	135	8	162	1	190	3
109	2	136	2	163	3	191	4
110	8	137	4	164	4	192	10
111	4	138	8	165	8	193	0
112	8	139	1	166	0	194	1
113	4	140	9	167	3	195	9
114	2	141	4	168	1	196	4
115	3	142	2	169	3	197	3
116	2	143	3	170	2	198	8
117	9	144	8	171	2	199	8
118	3	145	4	172	3	200	0
119	2	146	1	173	0		

Визначення функціональної активності лімфоцитів периферичної крові
людини люмінесцентним методом із застосуванням двохвильового
флуорохрому акридинового оранжевого

	№	530	640		№	530	640	
1	2	3	4	5	6	7	8	
Фон	1	0,12	0,25	Лімфоцити	18	0,92	0,18	
	2	0,12	0,16		19	0,86	0,17	
Лімфоцити	1	0,86	0,39	Фон	20	0,86	0,19	
	2	1,02	0,36		1	0,13	0,20	
	3	0,83	0,28		2	0,18	0,25	
	4	1,23	0,41		Лімфоцити	21	0,79	0,23
	5	1,00	0,34			22	0,88	0,38
	6	0,90	0,30			23	0,98	0,30
	7	0,93	0,41			24	1,39	0,22
	8	1,05	0,46			25	0,81	0,25
	9	1,03	0,36			26	0,66	0,34
	10	0,90	0,33			27	0,90	0,38
Фон	1	0,09	0,16	28		0,79	0,40	
	2	0,17	0,23	29	1,03	0,49		
Лімфоцити	11	1,11	0,16	Лімфоцити	30	0,75	0,30	
	12	1,09	0,19		Фон	1	0,10	0,15
	13	0,78	0,14			2	0,19	0,17
	14	0,90	0,13		Лімфоцити	31	0,86	0,26
	15	0,97	0,16			32	1,24	0,34
	16	0,98	0,20			33	0,97	0,36
	17	1,20	0,25			34	1,00	0,32

Продовження додатка Ж

	№	530	640		№	530	640
1	2	3	4	5	6	7	8
Лімфоцити	35	1,20	0,33				
	36	0,75	0,38				
	37	0,88	0,40				
	38	1,17	0,28				
	39	0,92	0,27				
	40	0,93	0,23				
Фон	1	0,18	0,19				
	2	0,06	0,20				
Лімфоцити	41	1,12	0,40				
	42	0,83	0,07				
	43	0,85	0,10				
	44	0,83	0,05				
	45	0,93	0,10				
	46	0,76	0,11				
	47	1,27	0,35				
	48	1,20	0,38				
	49	1,13	0,37				
	50	0,90	0,26				

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Основна:

1. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / [Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П. и др.]; Под ред. Меньшикова В. В. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
2. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Беркало Л. В., Бобович О. В., Боброва Н. О. і др.]; Під ред. Кайдашева І. П. – Полтава: Полімет, 2003. – 320 с.
3. Иммунология. Практикум /Учебн. пособие для биол. спец. вузов / [Пастер Е. У., Овод В. В., Позур В. К., Вихоть Н. Е.] – Киев: Вища школа. Изд-во при Киевском гос. университете, 1989. – 304 с.
4. Позур В. К. Имуногенетика. Практикум. Посібник / В. К. Позур. – К.: Ін-т математики НАН України, 2000. – 265 с.

Додаткова:

5. Имунологія: Підручник / [Вершигора А. Ю., Пастер Є. У., Колибо Д. В та ін.] – Київ: Вища школа, 2005. – 599 с.
6. Ройт А. Иммунология / Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. - Пер. с англ. - М.: Мир, 2000.-592 с.
7. Хаитов Р. М. Иммунология: ученик / Р. М. Хаитов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 528 с.
8. Ярилин А. А. Основы иммунологии: Учебник / А. А. Ярилин. - М.: Медицина. - 1999. - 608 с.
9. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология: Пособие для студентов, врачей-интернов, иммунологов, аллергологов, врачей лечебного профиля всех специальностей / Г. Н. Дранник. – 4-е изд., доп – К.: ООО «Полиграф плюс», 2010. – 552 с.
10. Фролов А. К. Патогенетический анализ состояния иммунной системы по динамике новообразования и миграции активированных

лимфоцитов во внутренней среде организма. Методические рекомендации / А. К. Фролов - Запорожье: Изд-во ЗГУ, 1999. - 31 с.

11. Гордиенко А. И. Микротурбидиметрический метод определения Ig G, Ig M, Ig A человека / А. И. Гордиенко, В. А. Белоглазов // Імунологія та алергологія. – 2000. - №1. – С. 12-15.

12. Теория и практика иммуноферментного анализа / [Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М.] - М.: Высшая школа, 1991.-288 с.

Воробьева Н. В. Иммунодиффузия и иммуноэлектрофорез. Теория и практика / Н. В. Воробьева. – М.: Научный мир, 2006. – 80 с.

Навчально-методичне видання
(українською мовою)

Фролов Олександр Кирилович,
Копійка Віра Вікторівна
Федотов Євген Рудольфович

**ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ ПО ІМУНОЛОГІЇ
«МЕТОДОЛОГІЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ССАВЦІВ»**

Навчально-методичний посібник
для студентів вищих навчальних закладів

Редактор *О. К. Фролов*
Технічний редактор *О. П. Корж*
Коректор *В. Ю. Задорожня*