

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

ДО ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ
З КУРСУ «ІМУНОЛОГІЯ»



ОДЕСА
ОНУ
2018

УДК 57.083.3(07)
I-55

Рекомендовано до друку Вченою радою біологічного факультету
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 7 від 19.04.2018 р.

Рецензенти:

С. А. Петров, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри біохімії
ОНУ імені І. І. Мечникова;

Г. В. Майкова, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології людини
та тварин ОНУ імені І. І. Мечникова.

I-55 **Імунологічні методи** : метод. вказівки до проведення лаб.
занять з курсу «Імунологія» / Т. О. Філіпова, Т. В. Гудзенко,
М. Б. Галкін, О. Ю. Зінченко, Г. В. Ямборко, М. Ю. Русакова. –
Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2018. – 90 с.

Методичні вказівки щодо основних методів, що застосовуються в
імунології. Вони містять детальні плани організації лабораторних занять
студентів для ознайомлення з основними методами імунології.

Рекомендовано для студентів біологічного факультету, що
отримують освітній рівень «бакалавр» за спеціальностями «біологія» та
«біотехнологія».

УДК 57.083.3(07)

ЗМІСТ

Список скорочень	4
Вступ	5
Правила роботи, вимоги техніки безпеки в імунологічній лабораторії	6
Заняття 1. Приготування корпускулярних антигенів кишкової палички	7
Заняття 2. Реакція аглютинації (РА)	12
Заняття 3. Реакція непрямой (пасивної) гемаглютинації РНГА (РПГП)	16
Заняття 4. Реакція гемаглютинації (РГА)	20
Заняття 5. Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА)	23
Заняття 6. Реакція нейтралізації і гальмування гемадсорбції в культурі клітин	26
Заняття 7. Реакція зв'язування комплекменту (РЗК)	29
Заняття 8. Реакція преципітації	36
Заняття 9. Імуноферментний аналіз	39
Заняття 10. Радіоімуний аналіз (РІА)	47
Заняття 11. Метод флюоресцируючих антитіл (МФА)	55
Заняття 12. Иммуноэлектрофорез	62
Заняття 13. Методи первинної оцінки імунного статусу людини	66
Заняття 14. Методи оцінки імунного статусу в експерименті	75
Заняття 14.1. Вивчення анатомії та морфології органів імунної системи мишей. Визначення органних індексів та клітинності	75
Заняття 14.2. Визначення функціональної активності макрофагів	77
Заняття 14.3. Дослідження реакцій гуморальної імунної відповіді	79
Заняття 14.4. Дослідження імунних реакцій клітинного типу	83
Заняття 14.5. Визначення активності природних кілерів	85
Контрольні питання	87
Список рекомендованої літератури	88

Список скорочень

АГ	- антиген
АТ	- антитіло
Гем.	- гемолітична сироватка (гемолізін)
КАГ	- контроль антигену;
КВ	- контроль вірусу
КЕ	- контроль еритроцитів
КС	- контроль сироватки
Комп.	- комплемент
РА	- реакція аглютинації
РГГА	- реакція гальмування
РНГА(РП	гемаглютинації
ГА)	- реакція непрямой (пасивної)
Р-н	гемаглютинації
Сиров.	- розчин
5-АСК	- сироватка
С	- кислота 5-аміносаліцилова
	- концентрація

ВСТУП

В даний час імунологія займає одне з ведучих місць серед медико-біологічних наук. Імунологія - не тільки теоретичний, але й суто практичний розділ біології та медицини. На основі дослідження імунологічних закономірностей формується серологічна діагностика, розробляються засоби специфічної профілактики та терапії інфекційних захворювань (вакцини та сироватки), здійснюється переливання крові, трансплантація органів, тканин та багато інших лікувальних заходів клінічної та практичної медицини.

Реакції імунітету, тобто реакції взаємодії антигену (АГ) та відповідного йому антитіла (АТ), завдяки високій специфічності та чутливості знайшли широке застосування у діагностиці інфекційних захворювань та в наукових медико-біологічних дослідженнях.

Широке запровадження імунологічних методів дослідження в різні області біології та медицини потребує підготовки висококваліфікованих спеціалістів. Основу професійної підготовки кадрів за фахом “Мікробіологія і вірусологія” в Одеському національному університеті ім. І. І. Мечникова складають не тільки цикли фундаментальних природничих, але і спеціальних дисциплін, які забезпечують оволодіння студентами методологією дослідницької і практичної діяльності в області імунології: “Імунологія”, “Молекулярно-генетичні основи імунології”, “Клінічна імунологія”, “Імунологія рослин”, “Епідеміологія” та інші.

Загальна професійно-функціональна спеціалізація згідно рівня кваліфікації – «спеціаліст» і «магістр» передбачає оволодіння навичками та вміннями лабораторної діагностики бактеріальних і вірусних захворювань, первинної оцінки імунного статусу людини. Задача практикуму з імунології - допомогти студентам опанувати традиційні класичні і сучасні імунологічні методи, відпрацювати методичні навички, поглибити їх та закріпити отримані теоретичні знання.

Мета занять: ознайомити студентів із застосуванням імунологічних методів для діагностики інфекційних захворювань і оцінки імунного статусу людини та навчити постановці реакцій, що мають широке застосування в лабораторній практиці.

Методичні вказівки складені для студентів IV курсу денної форми навчання біологічного факультету, можуть бути використані при виконанні курсових та дипломних робіт.

Правила роботи в лабораторії

1. До лабораторії у верхньому одязі та без халата не заходити.
2. Під час роботи з піпетками користуватися виключно грушами.
3. Посуд, матеріали, інструменти, залишки середовищ та реактивів, котрі використовувалися у роботі, знезаражувати дезинфікуючим розчином.
4. На робочому місці підтримувати чистоту.
5. Шанувати прилади, обладнання, ощадливо використовувати реактиви та реагенти.
6. Дотримуватися тиші.
7. По закінченню заняття робоче місце привести до порядку, руки помити з милом та протерти ватним тампоном, змоченим 70° спиртом.

При виконанні робіт з кожного розділу малого практикуму студент зобов'язаний:

1. Опрацювати відповідний розділ курсу “Загальна імунологія”.
2. Виявити максимум самостійності у виконанні експериментальної частини роботи.
3. Представити викладачеві оформлений звіт (методика експерименту, таблиці, малюнки, схеми, обробка результатів, висновки).

ЗАНЯТТЯ 1. ПРИГОТУВАННЯ КОРПУСКУЛЯРНИХ АНТИГЕНІВ КИШКОВОЇ ПАЛИЧКИ

Мета заняття: Ознайомитися з принципами приготування корпускулярних та розчинних антигенів та сферою їх застосування; опанувати методи приготування корпускулярних антигенів кишкової палички.

Антигени представлені широким спектром хімічних речовин, які несуть десятки та сотні антигенних детермінант що перебувають в складних біологічних системах (клітини, віруси, органели, сироватка крові, тканинна рідина). Розрізняють специфічні (видові), групові, типові, гетероспецифічні, органоспецифічні, тканинноспецифічні антигени. Стандартні антигени отримали широке використання в лабораторній практиці:

а) корпускулярні антигени:

- як індуктори алергічної реакції;
- в серологічному аналізі при виявленні антитіл в сироватках людей та тварин;

- як вакцини для профілактики ряду інфекційних захворювань;

- для вивчення закономірностей формування імунної відповіді;

б) розчинні антигени:

- у діагностиці відторгнення трансплантата, аутоенсибілізації, як специфічний антиген використовують тканинні екстракти;

- у діагностиці, терапії та профілактиці злоякісних новоутворень;

- створення багатокомпонентних молекулярних вакцин;

Принцип методу приготування корпускулярних антигенів

Корпускулярні антигени - це суспензія живих або неживих (інактивованих) клітин, вірусів або їх субодиноць в ізотонічних або буферних розчинах. Для інактивації використовують методи, які не викликають зниження імуногенних властивостей і підвищення токсичності препаратів.

Інактивацію проводять:

а) фізичними методами:

- дією високої температури, наприклад, прогріванням протягом 60-90 хв. при 56-60 °С і протягом 30-60 хв. при 68-70 °С. Для отримання ліпополісахаридної фракції соматичного О-антигена, суспензію мікроорганізмів нагрівають 1-2 год. при 100 °С для руйнування термостабільних антигенних речовин. Мікроорганізми піддають повільному нагріванню, щоб запобігти денатурації білків;

- дією ультразвуку;

- опроміненням ультрафіолетовим промінням;

- опроміненням рентгенівським промінням, зокрема пухлинних клітин, використовуваних потім для стимуляції протипухлинного імунітету;

б) хімічними методами:

- дією формаліну, спирту, ацетону, фенолу тощо.

Живі або інактивовані препарати корпускулярних антигенів доводять до заданої кількості клітин в одиниці об'єму (в 1 мл розчину).

При цьому використовують такі методи:

- підрахунок під мікроскопом в лічильній камері: еритроцитів, лейкоцитів, лімфоцитів, дріжджів, одноклітинних водоростей, бактерій та інших мікроорганізмів великих розмірів;
- висів бактеріальної суспензії на тужаві живильні середовища;
- визначення за оптичною густиною бактеріальної суспензії спектрофотометрією з наступним висівом на тужаві живильні середовища. Для визначення залежності оптичної густини від кількості бактерій будують калібровочну криву.

Як орієнтовний метод використовують стандарт мутності з відомою кількістю клітин в одиниці об'єму. Запаяні пробірки-еталони містять суспензію в дистильованій воді найдрібніших частинок скла пірекс з різним ступенем мутності. Застосовують пробірки-еталони з числовими позначеннями (5, 9, 10, 11, 20). За одиницю мутності прийнята мутність суспензії живих тифозних бактерій, яка містить 1×10^8 мікробних клітин в 1 мл. Мутність стандарту на 10 одиниць відповідає кількості клітин в 1 мл суспензії, яка залежить від розмірів бактерій: $8,5 \times 10^8$ бактерій кишкової групи, 1×10^9 бактерій тифо-паратифозної групи, $1,5 \times 10^9$ бруцельозних бактерій, 2×10^9 холерних вібріонів, $4,5 \times 10^9$ туляремійних бактерій, 1×10^{10} коклюшних бактерій.

Принцип методу приготування розчинних антигенів

Для вивчення окремих антигенних речовин, що входять до складу клітин або інших складних систем, їх необхідно мати в чистому вигляді. Для цього застосовують багатоступеневий процес з використанням комбінації різних методів. Екстрагують нековалентно інтегровані антигени з клітин, не руйнуючи їх (наприклад, білок А та ліпополісахарид, розташовані у зовнішній мембрані стафілокока та грамнегативних бактерій). Екстракцію проводять:

- дистильованою водою;
- нейтральним, кислим, основним буферними розчинами;
- ізотонічним розчином NaCl;
- розчинами кислот та лугів.

Найчастіше клітини руйнують:

- механічно з допомогою дезінтегратора, пресів та гомогенізаторів;
- за допомогою ферментів, що розривають ковалентні зв'язки;
- детергентами.

Окремі клітинні компоненти отримують з допомогою центрифугування з наступним переводом у розчинний стан. Вибір виду центрифугування залежить від лінійних розмірів, форми, маси та густини частинок. Застосовують такі види центрифугування:

- диференційне для частинок з різною масою;
- зональне для частинок різної маси і форми, але з однаковою низькою густиною, наприклад, субодиниці рибосом;

- метод врівноваженого центрифугування в градієнті густини сахарози, солей винної кислоти або хлориду цезія для частинок одного типу, але дуже різних за розміром. Наприклад, розподіл фракції мембран.

Екстракти (нативні антигени) - це складні суміші антигену та додаткових баластних речовин. Їх вилучають і очищують методами:

- вибірконим осадженням важкими металами;
- гельфільтрацією;
- електрофорезом;
- афінною хроматографією.

Застосовувані методи отримання окремих антигенів і складних сумішей мають забезпечити максимальне збереження ними імуногенних властивостей.

Умови приготування корпускулярного антигену кишкової палички:

- 1) наявність добової агарової культури кишкової палички;
- 2) наявність бактеріальних стандартів мутності;
- 3) присутність електроліту - фізіологічного розчину;

Практичне завдання: Приготувати корпускулярний антиген кишкової палички.

1. Приготувати бактеріальну суспензію добової агарової культури кишкової палички.
2. Стандартизувати антиген, використовуючи бактеріальні еталони мутності.
3. Інактивувати антиген високою температурою.

Методика приготування корпускулярного антигену кишкової палички включає наступні етапи:

I. Приготування бактеріальної суспензії:

1. Налити 5 мл NaCl - в пробірку (А) з добовою агаровою культурою *E.coli*;
2. Обережно крутити пробірку (А) між долонями до відокремлення мікробної маси, або використати для цього мікробіологічну петлю;
3. Перевірити чистоту бактеріальної суспензії, досліджуючи під мікроскопом морфологічні та тінкторіальні властивості;
4. Перенести бактеріальну суспензію в центрифужну пробірку (Б) стерильною пастерівською піпеткою;
5. Закрити стерильною гумовою пробкою центрифужну пробірку (Б);
6. Тричі відмити клітини розчином NaCl, центрифугуючи при 5000 об/хв. протягом 30 хв.

II. Стандартизація антигену:

1. Вилити надосадову рідину з пробірки (Б) і ресуспендувати осад двома мілілітрами фізіологічного розчину;
2. Ресуспендовану бактеріальну суспензію стерильною піпеткою перенести до стерильної пробірки (В);
3. Для отримання суспензії 1×10^9 клітин в 1 мл відібрати з пробірки (В) 0,1 мл бактеріальної біомаси і перенести в стерильну пробірку (Г);
4. У пробірку (Г) вносять чітко визначені пропорції фізіологічного розчину до зрівняння мутності в пробірці (Г) з еталонем (Д) на 10 одиниць. Порівнюють

ступінь мутності з дослідною та еталонною пробіркою в променях падаючого світла.

Наприклад: до початкової суспензії об'ємом 0,1 мл довелося додати 1,5 мл фізіологічного розчину для зрівняння мутності. Отже, в 0,1 мл початкової суспензії - 1,5 мл (фізіологічний розчин) + 0,1 (початкова суспензія) = $1,6 \times 10^9$ клітин, тоді в одному мл - 16×10^9 клітин.

Дано завдання приготувати 5 мл суспензії з концентрацією 5×10^9 клітин в 1 мл, що складає 25×10^9 клітин. Позаяк в об'ємі 5 мл концентрація бактеріальних клітин у 5 разів більша, ніж у 1 мл, то концентрація збільшується.

Для визначення того, який об'єм початкової суспензії містить розраховану кількість (25×10^9) клітин, складають пропорцію:

1 мл - 16×10^9 клітин;

x мл - 25×10^9 клітин;

x = 1,56 мл

Для того, щоб приготувати 5 мл суспензії бактерій (5×10^9 клітин в 1 мл) необхідно взяти 1,56 мл початкової суспензії (з пробірки Г) перенести в пробірку (Е) і додати до цього об'єму 3,44 мл фізіологічного розчину.

1,56 мл початкової суспензії 3,44 мл фіз. розчину

III. Інактивація антигену:

1. Стандартизований антиген кишкової палички кількістю 5 мл (5×10^9 клітин в 1 мл) розділити на дві частини, одну з них для інактивації прогріти на водяній бані при 100°C протягом 1 год. Для цього відібрати стерильною піпеткою 2,5 мл з пробірки (Е) і перенести в пробірку (Ж). Пробірку (Ж) поставити в металевий штатив на водяну баню.

2. Для перевірки стерильності одну-дві краплі інактивованого антигену засіяти в пробірку з м'ясо-пептонним бульйоном (3-5 мл) і інкубувати в термостаті при 37°C протягом доби.

Відсутність росту свідчить про інактивацію антигену.

3. Інактивація і нативні антигени розлити в стерильні ампули і запаяти. Для цього ампулу тримають над спиртівкою у верхній частині полум'я. Або переливають у стерильні пробірки, котрі зберігають під стерильними гумовими пробками.

4. На етикетці вказують назву антигену, його концентрацію, номер курсу і групи, хто його приготував, дату виготовлення.

Наприклад: О-антиген *E.coli* інактивований 100°C

5 мл (5×10^9 кл/мл)

Зберігають антиген в холодильнику при 4°C .

Матеріали та обладнання

1. Добова агарова культура *Escherichia coli* штам М-17.
2. Бактеріальні стандарти мутності: №9, №10, №11.
3. МПБ в пробірках по 5 мл.
4. Фізіологічний розчин (0,85 %).
5. Стерильні хімічні пробірки.

6. Пастерівські піпетки.
7. Піпетки градуйовані (1 і 5 мл).
8. Скляні ампули (10 мл).
9. Лейкопластир.
10. Ножиці.
11. Металевий штатив для пробірок.
12. Мікробіологічна петля.
13. Спиртівка.
14. Предметні скельця.
15. Набір реактивів для забарвлення за методом Грама.
16. Мікроскоп.
17. Водяна баня.
18. Центрифужні пробірки.
19. Стерильні гумові пробки № 14,5.
20. Центрифуга.

ЗАНЯТТЯ 2. РЕАКЦІЯ АГЛЮТИНАЦІЇ (РА)

Мета заняття: Ознайомитися з принципом, деякими характеристиками та галуззю застосування реакції аглютинації; опанувати методи постановки реакції аглютинації: класичний (розгорнутий, пробірковий) та платівковий (орієнтовний, прискорений).

Реакція аглютинації - перша серологічна реакція, відкрита у 1896 р. німецькими дослідниками Грубером та Дурхамом.

Згодом були розроблені різні варіанти та модифікації РА, багато з яких завдяки високій специфічності та простоті постановки отримали широке застосування у лабораторній практиці:

- в медицині для діагностики багатьох інфекційних захворювань:

а) визначення виду вилученого від хворого мікроорганізму-збудника за допомоги діагностичних аглютинуючих сироваток - серологічна ідентифікація мікроорганізмів (застосовується у діагностиці кишкових інфекцій, холери, коклюшу тощо);

б) виявлення специфічних АТ та визначення їх титру у сироватці крові, інших рідинах та секретах у нормі та у різних патологічних станах - серологічна діагностика (застосовується при черевному тифі та паратифах - реакція Відаля; при бруцельозі - реакція Райта та Хедлсона; при висипному тифі - реакція Вейль-Фелікса);

- при переливанні крові для визначення групових АГ та Rh - АГ;

- у мікробіологічній практиці для ідентифікації мікроорганізмів, при вивченні їх антигенної структури.

Принцип методу. Феномен аглютинації полягає у здатності АТ (аглютинінів) зв'язуватися з корпускулярними АГ (аглютиногенами - клітинами будь-якого походження - мікробні, тваринні, рослинні), склеювання їх у агрегати, котрі випадають у осад (аглютинат) на дно пробірки (рис.1).

Реакція аглютинації протікає у 2 фази:

1. Невидима фаза реакції, специфічна - адсорбція аглютинінів (АТ) на поверхні АГ (мікробна клітина);

2. Видима фаза - утворення агрегатів (аглютинату) та осадження їх у осад під дією електроліту (фізіологічного розчину).

Залежно від ознак АГ, який вступає у реакцію, та характеру аглютинату, що утворюється під час реакції, розрізняють дрібнозернисту (О-) та крупнопластівчату (Н-) аглютинацію. Дрібнозернистий аглютинат утворюється при склеюванні мікробних тіл (наприклад бруцел, туляремійних бактерій) аглютинінами (АТ), специфічними до соматичного О-АГ. Така аглютинація буває компактною, тонкозернистою і протікає повільно, протягом 18-22 годин. Аглютинація з утворенням великих пластівців проходить у джгутикових бактерій (наприклад, сальмонел, ешеріхій) при склеюванні бактеріальних клітин АТ до джгутикових Н-АГ. Такий аглютинат швидко (протягом 2-4 годин) осідає на дно пробірки.

Умови проведення реакції аглютинації:

1) визначення кількісного співвідношення АГ та АТ - феномен оптимуму;

2) наявність електроліту - фізіологічного розчину.

Практичне завдання: Провести діагностику бруцельозу.

1. Виявити у сироватці крові специфічні аглютиніни до бруцел. Поставити та провести облік результатів реакції Хедлсона - платівкову реакцію аглютинації з бруцельозним діагностикомом.

2. Визначити титр специфічних аглютинінів до бруцел. Поставити реакцію Райта - класичний розгорнутий пробірковий метод.

Платівкова реакція аглютинації Хедлсона

Призначення: використовується для прискореної серодіагностики бруцельозу під час масового обстеження людей та тварин.

Методика постановки реакції: чисту знежирену скляну платівку (20x12 см) розділити восковим олівцем на шість квадратів, у п'ять із них (1-5) нанести нерозбавлену досліджувану сироватку у кількості 0,08; 0,04; 0,02; 0,01; 0,002 мл (табл.1). Додати до перших чотирьох доз сироватки бруцельозний діагностиком - антиген Хедлсона у кількості 0,03 мл, що містить 2×10^{10} клітин у 1 мл; до п'ятої додати

0,03 мл фізіологічного розчину (контроль сироватки). У шостий квадрат нанести антиген Хедлсона (бруцельозний діагностиком) та фізіологічний розчин (контроль антигена) по 0,03 мл кожного компоненту. Тримаючи скло, коловими рухами перемішати сироватку з антигеном. Для прискорення реакції сироватки з антигеном суміш злегка підігріти (1-2 хв.), високо тримаючи над полум'ям пальника.

Таблиця 1

Схема постановки реакції Хедлсона

Інгредієнти	Доза реагентів, мл				КС	КА
Досліджувана сироватка(нерозбавлена)	0,08	0,04	0,02	0,01	0,02	-
Бруцельозний діаностикум	0,03	0,03	0,03	0,03	-	0,03
Фізіологічний розчин	-	-	-	-	0,03	0,03
Облік результатів	+++ +	+++ +	+++	++	-	-

Облік та оцінку результатів реакції Хедлсона проводять за 5-10 хвилин неозброєним оком, за допомоги лупи або аглютиноскопа. Основним критерієм під час оцінки є величина, кількість зерен аглютинату та ступінь просвітлення рідини у краплі.

При наявності аглютинату у краплі сироватки з АГ та відсутністю його у контролі сироватки та АГ оцінюють ступінь виразності аглютинації за чотирьох плюсовою системою:

“++++” - усі клітини аглютиновані з утворенням великих і дрібних зерен - добре виразний осад, повне просвітлення рідини;

“+++” - дрібні та поодинокі великі зерна, виразний осад, слабка опалесценція рідини;

“++” - аглютинат дрібнозернистий у вигляді невеликого осаду, слабке просвітлення рідини;

“+” - ледь помітні дрібні зерна - сліди аглютинації, рідина непрозора;

“-” - відсутність зерен аглютинації, рідина рівномірно мутна.

Для діагностичної оцінки результатів використовують таку схему:

1. Різко позитивна реакція - аглютинація на “++++” в усіх дозах сироватки;
2. Позитивна реакція “+++” аглютинація не менше, ніж на третій (0,02 мл) та четвертій (0,1 мл) дозах сироватки;
3. Негативна (заперечна) реакція - відсутність аглютинації в усіх дозах сироватки.

Пробіркова об'ємна розгорнута реакція Райта

Призначення: для серологічної діагностики бруцельозу та визначення титру аглютининів до бруцел. Методика постановки реакції. Приготувати основне розбавлення (1:50) досліджуваної сироватки: внести у пробірку 0,2 мл нерозведеної сироватки, додати до неї 9,8 мл фізіологічного розчину, перемішати.

У штативі поставити ряд чистих аглютинаційних або звичайних пробірок, на кожній з них восковим олівцем написати ступінь розведення (від 1:100 до 1:3200), на двох останніх - відмітити контроль сироватки (КС) та контроль АГ (КАГ) (див. табл. 2). В усі пробірки, окрім № 7, розлити по 1 мл фізіологічного розчину.

Таблиця 2

Схема постановки розгорнутої реакції аглютинації Райта

Інгредієнти	Розбавлення сироватки						КС	КА Г
	1:1 00	1:2 00	1:40 0	1:8 00	1:16 00	1:32 00		
фізіологічний р-н, мл	1	1	1	1	1	1	-	1
Досліджувана сироватка(1:50), мл	1→	1→	1→	1→	1→	1 ↓	1:50	-
Бруцельозний діагностикум,мл	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1
Облік результату	++	++	+++	++	+	-	-	-

З основного розбавлення сироватки (1:50) методом перекачки приготувати ряд послідовних (кратних двом) розбавлень від 1:100 до 1:3200 в аглютинаційних пробірках, встановлених у штативі. Для цього у першу

пробірку наливають 1 мл основного розбавлення сироватки (1:50), після ретельного струшування вмісту, 1 мл переносять у 2-у пробірку, потім у 3-ю і т.д. З 6-ої пробірки 1 мл видаляють (у банку з дезрозчином) для збереження однакового об'єму. У 7-у пробірку (КС) вносять 1 мл основного розбавлення сироватки (1:50). Додають по дві краплі бруцельозного діагностикуму у кожен пробірку з розбавленням сироватки (з 1 по 6) та у 8-у пробірку (КАГ). Штатив з пробірками енергійно струшують і ставлять у термостат при 37 °С на 18-20 годин.

Облік та оцінку результатів реакції визначають за інтенсивністю аглютинації (чотирьох плюсова система, див.вище).

Достовірними можна вважати результати тільки при чітких контролях: КС - не повинно бути мутним за рахунок проросту сироватки; КАГ - не повинно бути спонтанної аглютинації діагностикума.

За титр АГ (аглютининів) у сироватці приймають те найбільше його розбавлення, у якому спостерігається аглютинація не менше, ніж на ++.

Діагностичну оцінку результатів реакції Райта здійснюють за ступенем аглютинації в розбавленнях сироватки:

1. Реакція різко позитивна - аглютинація не менше, ніж на “++” при титрі сироватки 1:1600 та вище;
2. Реакція позитивна - при титрі 1:200 - 1:400;
3. Реакція сумнівна - при титрі 1:100.

Матеріали та обладнання

1. Досліджувана сироватка хворого.
2. Антиген Хедлсона - бруцельозний діагностикум: суспензія убитих нагріванням та забарвлених кристалічним фіолетовим бруцел, густиною 2×10^{10} клітин у 1 мл.
3. Фізіологічний розчин.
4. Скляні платівки розміром 20x12 см.
5. Пробірки.
6. Піпетки градуйовані (1 мл).

ЗАНЯТТЯ 3. РЕАКЦІЯ НЕПРЯМОЇ (ПАСИВНОЇ) ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ РНГА (РПГА)

Мета заняття: Ознайомитися з принципом та сферою застосування реакції непрямой (пасивной) гемаглютинації; опанувати методику постановки РНГА (РПГА).

В імунологічній практиці застосовують реакцію непрямой (пасивной) гемаглютинації з розчинними антигенами білкової або полісахаридної природи.

Вперше метод РНГА (РПГА) був розроблений А.Т. Кравченко та М.І. Соколовим (1945-1946 рр.) для визначення антигенів бактерій (чума, холера, дизентерія та інші). Пізніше цю реакцію почали з успіхом використовувати у лабораторній діагностиці багатьох бактеріальних та риккетсіозних інфекцій.

З вірусними антигенами ця реакція була описана Бернетом і Андерсеном (1946 р.), вони застосували її для виявлення вірусів паротиту і хвороби Ньюкасл. Подальшого розвитку метод набув після робіт Бойдена (1951 р.), який запропонував використовувати для цієї реакції еритроцити, оброблені таніном.

Спостереженнями ряду авторів встановлено, що РНГА (РПГА) за чутливістю значно перевищує РГА та дозволяє виявити мінімальні кількості антитіл та антигенів. При стандартизації реагентів та умов проведення реакції можна виявити до 3-6 нг азоту антитіл в 1 мл. В клінічній практиці РНГА (РПГА) використовують для виявлення:

- аутоантитіл, зокрема, ревматоїдного фактору (IgM-антитіл проти гамаглобулінів);
- виявлення HBs-антигену вірусу гепатиту В в епідеміологічних дослідженнях і для оцінки донорської крові.

Принцип методу. Феномен непрямой (пасивной) гемаглютинації ґрунтується на склеюванні - аглютинації навантажених антигеном еритроцитів сироватками, що мають специфічні антитіла до антигену (рис. 1).

Для отримання феномена аглютинації антиген попередньо адсорбують на корпускулярному носії, за котрий служать інертні частки (латекс, оксид барію, бентоніт). Якщо адсорбентом являються еритроцити (баранячі, курячі, О-групи людини), реакція носить назву пасивной (непрямой) гемаглютинації. Антигени полісахаридної природи добре адсорбуються еритроцитами без додаткової обробки. При використанні антигенів білкової природи необхідна додаткова обробка еритроцитів таніном для підвищення їх адсорбційних властивостей.

У постановці РНГА (РПГА) застосовують платівчатий і розгорнутий способи.

Умови проведення реакції непрямой (пасивной) гемаглютинації:

- 1) для титрування специфічних АТ до бруцел необхідна досліджувана сироватка від хворого з підозрою на бруцельоз;

- 2) суспензія стандартного еритроцитарного діагностикуму у концентрації 2,5 %, до складу якого входять формалізовані еритроцити барана, сенсibiliзовані ліпополісахаридом з *Brucella abortus*;
- 3) температура 37 °С;
- 4) наявність електроліту - 0,85 % розчин NaCl.

Практичне завдання: Провести лабораторну діагностику бруцельозу, використовуючи РНГА (РПГА).

1. Поставити реакції непрямой (пасивной) гемаглютинації з метою виявлення специфічних АТ до бруцельозу в сироватці крові.
2. Визначити титр специфічних АТ до бруцельозу в РНГА (РПГА).

Методика постановки реакції непрямой (пасивной) гемаглютинації.

Специфічні антитіла виявляються в сироватці крові хворих людей та тварин, а також антигени в культурах клітин, трупах тварин, об'єктах довкілля.

Приготування еритроцитарного діагностикума:

Для постановки реакції частіше використовують еритроцити барана або людини групи О. Рекомендовано використовувати формалізовані еритроцити, так як вони не лізуються у присутності таніну і при адсорбції антигену. Оброблені таким чином еритроцити отримують при змішуванні рівних об'ємів суспензії еритроцитів (2,5 %) та розчину таніну (1:20000). Контакт 10-15 хв. при t° 37 °С. Потім суміш центрифугують, відмивають осад фосфатним буфером рН 7,2. Відмиті еритроцити розводять фізіологічним розчином до концентрації 2,5 % і змішують з антигеном (1:2). Витримують 15 хв. при кімнатній

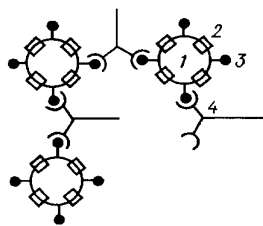


Рис. 1. Схема реакції непрямой (пасивной) гемаглютинації

1 - еритроцити; 2 - антиген еритроцита; 3 - кон'югований антиген; 4 - антитіло

температурі, далі центрифугують, осад еритроцитів тричі відмивають фізіологічним розчином або фізіологічним розчином з нормальною сироваткою кроля в розбавленні 1:250. У промисловому виробництві еритроцитарний діагностикум ліофілізують.

При використанні еритроцитарного діагностикума у заводській упаковці, в середину флакона вносять 10 мл 0,9 %-ого розчину хлориду натрію рН 7,1 \pm 0,1 і отримують суспензію з концентрацією 2,5 %.

Підготовка досліджуваної сироватки:

Досліджувану сироватку хворого на бруцельоз прогрівають на водяній бані при $T 56^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв. для інактивації комплементу.

Основне розбавлення (1:50) сироватки готують змішуючи в пробірці 0,2 мл сироватки і 9,8 мл розчину хлориду натрію.

Методика постановки реакції. Схема приготування двохкратних розбавлень сироватки, що містить специфічні антитіла (від 1:50 до 1:6400) подана в таблиці 3. З 1-ої по 9-ту виїмки планшети вносять по 0,5 мл досліджуваної сироватки, перемішують піпеткою і 0,5 мл розчину переносять у 2-у виїмку після перемішування 0,5 мл переносять у третю виїмку і т.д. З 8-ої виїмки 0,5 мл сироватки виливають у склянку з дезинфікуючим розчином. Таким чином, методом перекатки готують двохкратні розбавлення досліджуваного матеріалу: 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400 (табл.3).

Титрування: у кожен виїмку (з 1-ої по 8-у) додають по 0,25 мл еритроцитарного діагностикума (перед внесенням його необхідно ретельно перемішувати). Дослід супроводжується постановкою контролю на спонтанну аглютинацію сенсibiliзованих еритроцитів. Для цього у 9-у виїмку додають 0,5 мл фізіологічного розчину і додають 0,25 мл еритроцитарного діагностикума. Після цього необхідно струсити планшету і поставити у термостат при $T 37^{\circ}\text{C}$ на 2-3 години.

Облік та оцінку результатів проводять через 2-3 години після того, як еритроцити в контрольних виїмках випадають на дно у вигляді компактного щільного диску. Облік результатів реакції проводять за 3-4-бальною системою. Достовірні результати отримують за відсутності гемаглютинації у контролі.

Позитивну реакцію непрямой гемаглютинації оцінюють плюсами за формою утвореного еритроцитами осаду:

“++++” - усі або майже усі еритроцити аглютинували - осад у вигляді тонкої мереживної плівки рівномірно покриває дно і стінки виїмки (“перекинута парасолька” з хвилястим краєм);

“+++” - аглютинат трохи меншого діаметру, ніж при “++++” (“перекинута парасолька” з рівним краєм);

“++” - не всі еритроцити аглютинували осад у вигляді мережива має менший діаметр, на дні формується невелика кільцева щільна зона еритроцитів;

“+” - більшість еритроцитів не аглютинували і утворили в центрі виїмки щільний диск із зазубреною каймою по краю;

“-” - еритроцити зсілися на дно виїмки у вигляді “гудзика” або маленького кільця з рівним чітко окресленим краєм.

Гемаглютинаційний титр сироватки враховується в останньому розбавленні її з оцінкою не менше, ніж на “+++”. При дослідженні на бруцельоз в РНГА (РПГА) сироваток людини і великої рогатої худоби як діагностичні титри приймають:

титр сироватки 1:50 - реакція слабо позитивна;
титр сироватки 1:100 і вище - позитивна

Таблиця 3

Схема постановки РНГА (РПГА)

Інгредієнт	Доза реагентів, мл								
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:160 0	1:320 0	1:640 0	К эр.
Фізіологічний розчин, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сироватка, мл	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 ↓	-
Еритроцитарний діагностикум, мл*	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Облік результатів	+++ +	+++ +	+++	+++	++	++	+	+	-

Примітка: *Після внесення всіх інгредієнтів експозиція 2-3 години при температурі 37 °С.

Матеріали та обладнання

1. Досліджувана сироватка хворого на бруцельоз.
2. Стандартний еритроцитарний діагностикум з *Brucella abortus*.
3. Фізіологічний розчин.
4. Пластмасові планшети для постановки серологічних реакцій.
5. Піпетки градуйовані (1 мл).
6. Термостат.

ЗАНЯТТЯ 4. РЕАКЦІЯ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ (РГА)

Мета заняття: Ознайомитися з принципом та застосуванням реакції гемаглютинації; опанувати методику постановки РГА.

У 1941 р. Хьорст та незалежно від нього Мак Кліленд та Хейр помітили, що вірус грипу склеює (аглютинує) еритроцити курей. Потім це явище було підтверджено багатьма лабораторіями. Було встановлено, що вірус грипу аглютинує не тільки еритроцити курей, але й інших видів птахів та ссавців (качок, голубів, чайок, морських свинок, собак тощо). Виявилось також, що гемаглютинуючі властивості мають багато інших вірусів: осповакцини, енцефаломієліту пацюків, ящура, паротиту, поліоми тощо аглютинують еритроцити. Реакція вірусної гемаглютинації (РГА) не відноситься до чітких імунно-серологічних реакцій, хоча природна компліментарність компонентів, які беруть участь у ній (вірусів та еритроцитів) багато у чому нагадує специфічність імунологічних реакцій.

Реакція гемаглютинації має широке застосування у вірусологічній практиці як швидкий, технічно простий, економічний і, одночасно, достатньо надійний метод виявлення та титрування вірусів.

Принцип методу. Феномен гемаглютинації полягає у склеюванні - аглютинації еритроцитів не антитілами, а вірусними часточками (рис.3).

Установлено, що у реакції бере участь поверхневий антиген вірусної частки - гемаглютинін та N-ацетилнейрамінова кислота рецепторів еритроцитів. В результаті їх взаємодії проходить склеювання еритроцитів у агрегати та осідання на дно пробірки у вигляді "парасольки". РГА має три фази. У першій фазі відбувається адсорбція вірусних часточок на поверхні еритроцитів. Потім настає 2-а фаза - аглютинація еритроцитів з адсорбованим вірусом до агрегатів. З'єднання вірусів з еритроцитами - зворотний процес і може наступити 3-я фаза - елюція (вивільнення) вірусу від еритроцитів.

Умови проведення реакції гемаглютинації:

- 1) для титрування вірусу грипу - необхідні еритроцити курей, морських свинок, людини (0 групи); вірусу енцефаліту - еритроцити гусей; вірусу поліоми - еритроцити морської свинки;
- 2) використовують 1-3 %% суспензію еритроцитів;
- 3) температура 4-22 °С;
- 4) наявність електроліту - 0,85 % розчин NaCl.

Практичне завдання: Провести лабораторну діагностику грипу.

1. Поставити реакцію гемаглютинації з метою виявлення вірусу грипу.
2. Визначити титр вірусу грипу в досліджуваному матеріалі.

Методика постановки реакції гемаглютинації. Досліджуваним матеріалом, що містить вірус, можуть бути носоглоткові змиви, алантоїсна та амніотична рідина тощо.

Для приготування 1 % суспензії еритроцитів використовують метод дефібринування: кров з вени крила курки забирають у стерильну банку (бажано з притертою пробкою), у котрій є скляне намисто, що покриває дно банки у 2 шари. Після забору крові банку закривають і безперервно

струшують до повного зсідання крові (приблизно 15-20 хв.). Охолоджену дефібриновану кров переливають у центрифужні пробірки. Центрифугують 10 хв. при 2000 об/хв. Осад 3-4 рази промивають фізіологічним розчином, щоразу еритроцити осаджують центрифугуванням (режим зазначено вище). Для приготування 1 % суспензії еритроцитів на кожен мілілітр компактного осаду відмитих еритроцитів додають 99 мл фізіологічного розчину. До використання суспензію зберігають у холодильнику.

Приготування двократних розбавлень матеріалу, що містить вірус (від 1:2 до 1:128) подано у таблиці 4.

З цією метою у ряд лунок планшету наливають фізіологічний розчин по 0,2 мл. До першої лунки вносять 0,2 мл досліджуваного матеріалу, перемішують піпетуючи і 0,2 мл рідини переносять до 2-ої лунки, з другої лунки після перемішування 0,2 мл переносять до третьої лунки і т.д. З останньої лунки 0,2 мл виливають у банку з дезінфікуючим розчином. Таким чином, методом перекачки готують такі двократні розбавлення матеріалу, що містять вірус: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128.

До досліду ставлять один контроль - на стабільність суспензії еритроцитів. Для цього у 8-му лунку наливають 0,4 мл фізіологічного розчину і додають 0,4 мл 1 %-ої суспензії еритроцитів.

Титрування: у кожен лунку (з 1-ої до 7-ої) вносять по 0,4 мл 1 %-ої суспензії еритроцитів (перед внесенням її треба ретельно перемішати). Пластини обережно струсити і залишити при кімнатній температурі або при 4 °С на 30-60 хв. Еритроцити курей осідають за 30 хв., а ссавців - протягом однієї години.

Таблиця 4

Схема титрування вірусу в реакції гемаглютинації

Інгредієнти	Розбавлення матеріалу, що містить вірус							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Кер.
Фізіологічний розчин, мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4
Матеріал, що містить вірус	0,2 →	0,2 →	0,2 →	0,2 →	0,2 →	0,2 →	0,2↓	-
Фіз. р-н	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-
Курячі еритроцити, 1% суспензія*	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Облік результату	++	++	++	+++	+++	++	+	-

Примітка: *Після внесення всіх інгредієнтів експозиція 30-60 хв. при температурі 20 °С.

Облік та оцінку результатів проводять за 60 хв. по тому, як у контрольній (8-ій) лунці еритроцити осядуть на дно у вигляді компактного щільного осаду - "гудзика" - це негативна реакція (-). Позитивну реакцію гемаглютинації оцінюють плюсами за формою утвореного осаду еритроцитів:

"+++" - еритроцити розташовуються рівномірним шаром з хвилястим краєм у виймці дна лунки або у вигляді кола ("бублик");

"-" - еритроцити осіли у вигляді щільного диска з зернистим краєм.

За титр вірусу приймають те найбільше розбавлення, при якому спостерігається ще повна аглютинація еритроцитів не менше, ніж на два плюси (++) . Це є одна аглютинуюча одиниця - 1 АО.

Матеріали та обладнання

1. Досліджуваний біоматеріал: алантоїсна або хоріоалантоїсна рідина, що містить вірус.
2. Фізіологічний розчин.
3. Кров куряча або людини (О-група).
4. Пластмасові планшети для постановки серологічних реакцій.
5. Піпетки градуйовані (1мл).
6. Скляна стерильна банка з притертою пробкою та скляним намистом.
7. Центрифужні пробірки.
8. Центрифуга.

ЗАНЯТТЯ 5. РЕАКЦІЯ ГАЛЬМУВАННЯ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ (РГГА)

Мета заняття: Ознайомлення з принципом та галуззю застосування РГГА, засвоєти методику її постановки.

Невдовзі після відкриття реакції гемаглютинації було з'ясовано, що противірусні імунні сироватки, змішані з відповідними штамми вірусу грипу, здатні нейтралізувати їх. Нейтралізація (гальмування, затримка) гемаглютинації відбувається у випадках, коли антитіла імунної сироватки відповідають типу вірусу, до якого вони отримані, тобто РГГА - типоспецифічна реакція.

Ця реакція набула широкого застосування у діагностиці вірусних захворювань (коли невідомий антиген визначають за відомим антитілом). Також ця реакція використовується для виявлення антитіл у сироватці хворих та тих, що перехворіли (за відомим АГ визначають АТ), для визначення ефекту вакцинації.

Окрім цього РГГА використовується для визначення типу вилученого вірусу та для вивчення антигенної структури антигенних варіантів вірусу.

Умови проведення реакції гальмування гемаглютинації.

1. Для постановки РГГА використовують 1 % суспензію еритроцитів курей або людини (0-групи).
2. Матеріал, що утримує вірус у вигляді грипозного діаностикума з певною робочою дозою вірусу (4 АО).
3. Стандартні діагностичні сироватки, отримані гіперімунізацією тварин певними штамми вірусу грипу та виготовлені в заводських умовах.
4. Наявність електроліту - 0,85 % розчин NaCl.

Перед постановкою РГГА в реакції гемаглютинації визначають робочу дозу вірусу - 4 АО. Наприклад, якщо у РГА титр вірусу 1:40 (1 АО), то 4 АО будуть відповідати розбавленню 1:10.

Практичне завдання:

1. Поставити реакцію гальмування гемаглютинації з метою серологічної ідентифікації вірусу.
2. Визначити титр діагностичної сироватки в РГГА.

Методика постановки реакції

Вірус у робочій дозі (4 АО) готують у колбі в об'ємі, необхідному для всієї реакції.

У пробірках або у виїмках готують двократне розбавлення діагностичної сироватки, починаючи з 1:10 та до 1:320, в об'ємі 0,2 мл (табл. 5).

Схема постановки РГГА

Інгредієнти, мл	Розбавлення сироватки						КС	КВ	К ер.
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:16 0	1:320			
Фіз. р-н	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4
Сироватка діагност. (1:10)	0,2	0,2 →	0,2 →	0,2 →	0,2 →	0,2↓	0,2	-	-
Вірус (4АО)*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2	-
1% суспензія еритроцитів*	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Облік результатів	+++ +	+++ +	+++	+++	++	+	-	-	-

Примітка: *Експозиція 30 хв. при 20 °С.

У 9 пробірок (виїмок планшета), починаючи з другої вносять по 0,2 мл фізіологічного розчину. У останню, відповідну контролю еритроцитів - 0,4 мл.

Попередньо у колбі готують робоче розбавлення сироватки 1:10 та вносять у першу, другу та сьому пробірку (виїмку) по 0,2 мл. Починаючи з другої пробірки методом перекочування готують розбавлення сироватки від 1:20 до 1:320. З шостої пробірки 0,2 мл виливають у банку з дезінфікуючим розчином.

Потім в усі пробірки (окрім 8 та 9) додають по 0,2 мл вірусу, який має 4 АО. Штативи (планшети) струшують та за 30-60 хвилин в усі пробірки додають по 0,4 мл 1% суспензії еритроцитів курей або людини (0-групи). Пробірки (планшети) знову струшують та залишають при кімнатній температурі на 30 хвилин.

Для перевірки специфічності гальмування гемаглютинуючих властивостей вірусу ставлять три контролю:

1. Контроль сироватки (КС) - перевіряють можливість сироватки спонтанно аглютинувати еритроцити.

2. Контроль вірусу (КВ) - перевіряють можливість вірусу спонтанно аглютинувати еритроцити. 3. Контроль еритроцитів (КЕ) - перевіряють можливість еритроцитів спонтанно гемаглютинувати.

Облік результатів проводять за триплюсовою системою залежно від форми осаду, що утворився:

“+++” - еритроцити осідають щільним диском у вигляді гудзика на дно пробірки (виїмки), пройшло повне гальмування реакції гемаглютинації;

“++”, “+” - еритроцити рівномірно поширюються на дні пробірки (виїмки) або з рівним краєм або кільцевою зоною;

“-” - еритроцити розташовуються по вигнутому дну пробірки (виїмки) у вигляді “перекинутої парасольки”.

За титр антитіл приймають найбільше розбавлення сироватки, яке дає повну затримку гемаглютинації.

Матеріали та обладнання

1. Сироватка діагностична.
2. Досліджуваний вірус - грипозний діагностикум, отриманий з амніотичної або алантоїсної рідини курячих ембріонів у ліофільному стані.
3. Еритроцити курячі або людини (0-групи).
4. Фізіологічний розчин.
5. Штативи з пробірками або планшети з пластику.
6. Піпетки на 1 мл з грушами, або дозатори на 0,2-0,1 мл.
7. Воскові олівці.
8. Колбочки, стакани мірні для приготування робочих розбавлень сироватки та вірусу.

ЗАНЯТТЯ 6. РЕАКЦІЯ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ І ГАЛЬМУВАННЯ ГЕМАДСОРБЦІЇ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН

Мета заняття: Ознайомитися з принципом постановки реакції нейтралізації й областю її застосування.

Реакція нейтралізації застосовується для ідентифікації виділених вірусів, тобто їх типирования і для серодіагностики. При ідентифікації вірус визначається по взаємодії з відомою специфічною імунною сироваткою (діагностичної), що запобігає появі цитопатогенної дії (у культурі клітин), загибель сприйнятливих тваринних чи курячих ембріонів, чи розвиток у них визначених ознак поразки.

У серодіагностиці реакція нейтралізації застосовується для виявлення наростання титру нейтралізуючих антитіл до визначеного (відомому) вірусу в парних сироватках.

Принцип методу: Реакція нейтралізації заснована на властивості імунної сироватки при додаванні до відповідного вірусу, блокувати його здатність до репродукції в чуттєвій біологічній системі. Здатність імунної сироватки інактивувати інфекційну активність вірусу, є наслідком взаємодії нейтралізуючих антитіл з визначеними антигенними детермінантами поверхневих вірусних білків.

У лабораторній діагностиці вірусних інфекцій як чуттєві системи, використовуються культури клітин, організм сприйнятливих тварин і курячі ембріони.

Реакція нейтралізації проводиться в два етапи:

1. зараження культури клітин вірусом для визначення 100 ТЦД₅₀ (за схемою ЦПД);
2. постановка реакції нейтралізації.

Умови проведення реакції:

1. культура кліток повинна бути чуттєва до дії використовуваного вірусу;
2. для зараження культури клітин використовуються флакони з добре сформованим моношаром.

Практичне завдання

1. заразити культуру кліток вірусом грипу для визначення 100 ТЦД₅₀;
2. визначити титр віруснейтралізуючих антитіл у реакції нейтралізації.

Методика постановки реакції нейтралізації. При постановці реакції нейтралізації з метою серодіагностики беруть постійну дозу вірусу рівну 100 ТЦД₅₀ і послідовні дворазові розведення досліджуваної сироватки. Тому на першому етапі необхідно провести титрування вірусу грипу (за схемою ЦПД), а потім титрування сироватки (табл.6).

Для постановки реакції нейтралізації в культурі клітин, необхідно провести ряд підготовчих дій у пробірках з метою одержання дворазових розведень сироватки і взаємодії сироватки з вірусом. Для цього в 6 пробірок вносять починаючи з першої 0,6 мол і в наступні по 0,4 мол середовища 199. Потім методом перекочування готують дворазові розведення сироватки від 1:4 до 1:128. Після цього в кожному пробірці додають по 0,4 мол 100 ТЦД₅₀ віруси грипу.

Для контакту АГ з АГ залишають пробірки на 1-2 години при 37⁰С в термостат. Потім для постановки реакції у флаконах, з добре сформованим клітинним моношаром, беруть розведення сироватки від 1:16 до 1:128. Для кожного розведення використовують не менш п'яти флаконів. Крім цього ставлять два контролю: контроль клітин, контроль вірусу. У контроль клітин вносять 1 мол середовища 199, а в контроль вірусу 0,1 мол вірусу і 0,9 мол середовища 199. Крім того в досліджені флакони вносять по 0,2 мол суміші вірусу із сироваткою і по 0,8 мол середовища 199. Флакони поміщають у термостат при 37⁰С на 5-7 днів.

Облік результатів проводять, починаючи з контролів:

1. контроль вірусу – 50-100% дегенерації клітинного моношару;
2. контроль клітин – клітинний моношар має вид луски цибулі.

Таблиця 6

Схема постановки реакції нейтралізації

Інгредієнт	Розбавлення сироватки						Контроль		
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	До клі-ток	До вірусу	
У пробірках									
Середовище 199	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-	-
Досліджувана сироватка	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-	-
Вірус 100 ТЦД ₅₀	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-	-
Контакт 1-2 години при 37 ⁰ С									
У флаконах									
Середовище 199	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-
Суміш вірусу і сироватки	-	-	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	1	0,9
Вірус 100 ТЦД ₅₀	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1

Титр вируснейтрализующих антител відповідає граничному розведенню сироватки, що запобігла дегенерацію клітинного моношару не менш чим у половині флаконів, у яких вона була додана.

Матеріали та обладнання

1. Досліджувана сироватка.
2. Вірус грипу.
3. Фізіологічний розчин.
5. Штативи з пробірками або планшети з пластику.
6. Піпетки на 1 мл з грушами, або дозатори на 0,2-0,1 мл.
7. Колбочки, стакани мірні для приготування робочих розбавлень сироватки та вірусу.
8. Пеніцилінові флакони з моношаром культури клітин.
9. Середовище 199.

ЗАНЯТТЯ 7. РЕАКЦІЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ (РЗК)

Мета заняття: Ознайомитися з принципом та сферою застосування реакції зв'язування комплементу; опанувати методику постановку РЗК.

Класична реакція зв'язування комплементу вперше була описана у 1901 році Борде та Жангу.

РЗК відноситься до непрямих двохсистемних гетерологічних 5-компонентних реакцій. У ній беруть участь дві системи АГ-АТ різної специфічності та комплемент. Перша система АГ-АТ є дослідною, друга - індикаторною (гемосистема АГ₁ - АТ₁).

Сфера застосування. РЗК отримала широке визнання для лабораторної діагностики багатьох бактеріальних та вірусних захворювань (для серодіагностики гонореї - реакція Борде-Жангу, сифілісу - реакція Вассермана, ехінококозу - реакція Вейнборга). Ця реакція часто застосовується для диференційної діагностики риккетсіозів, зокрема епідемічного та ендемічного (щурячого) висипного тифу. РЗК не дає міжгрупових перехресних реакцій, тому її використовують для визначення роду та виду виділеного штаму риккетсій.

РЗК може бути застосована у двох напрямках: 1 - для виявлення у сироватці хворого специфічних антитіл за допомоги відомих антигенів (серодіагностика бактеріальних, вірусних, риккетсіозних, спірохетозних та інших інфекцій; діагностика аутоімунних станів тощо); 2 - для виявлення та ідентифікації в досліджуваному матеріалі специфічного антигену (колоїдного або корпускулярного) за тих самих хвороб за допомогою імунної сироватки, яка містить специфічні антитіла.

Принцип методу. РЗК ґрунтується на тому, що при взаємодії в дослідній системі АГ та АТ утворюється специфічний комплекс АГ+АТ, який адсорбує (зв'язує) комплемент. За відсутності специфічної спорідненості між АГ та АТ утворення комплексу (АГ-АТ) не відбувається і комплемент залишається вільним. Проте, процес взаємодії комплементу з дослідною системою є невід'ємним, тому на другому етапі до реакції вводять другу, завідомо специфічну, індикаторну гемосистему АГ₁ + АТ₁, яка свідчить про результати РЗК. Якщо у першій системі зв'язування комплементу відбувається (позитивний результат), в індикаторній відзначається відсутність (затримка) гемолізу. Якщо адсорбція комплементу у дослідній системі не відбувається (негативний результат РЗК), в індикаторній з'являється гемоліз (мал.5.).

Умови проведення реакції зв'язування комплементу.

Для постановки РЗК необхідні такі інгредієнти:

- 1) еритроцити барана;
- 2) гемолітична сироватка - гемолізін;
- 3) комплемент;
- 4) антиген;
- 5) контрольні сироватки (серонегативна та серопозитивна);
- 6) фізіологічний розчин;
- 7) досліджуваний біоматеріал: сироватка крові, плазма, спинномозкова рідина.

Практичне завдання: провести серодіагностику епідемічного висипного тифу з застосуванням реакції зв'язування комплементу.

1. Провести титрування гемолізіну, комплементу, антигену, досліджуваної сироватки з метою визначення робочих доз.
2. Відмити еритроцити барана та приготувати гемолітичну систему.
3. Поставити і зробити облік основного дослідження РЗК.

Методика постановки реакції зв'язування комплементу. Досліджуваним матеріалом є сироватка крові. Схема проведення РЗК передбачає постановку ряду дослідів у наступному порядку: титрування і визначення робочої дози гемолітичної сироватки; титрування і визначення робочої дози комплементу; титрування імунної сироватки на антикомплементаційність; основний дослід РЗК.

Приготування суспензії еритроцитів. В реакції можуть бути використані еритроцити будь-яких лабораторних тварин та людини. Проте переважно поширення отримали еритроцити барана. Їх отримують шляхом пункції яремної вени здорової тварини віком від 1 до 5 років. Кровопускання у баранів можна робити не частіше одного разу на 10 днів.

Кров відбирають у велику колбу з намистом. Колбу з кров'ю струшують протягом 5-6 хв. для дефібринування крові з метою попередження зсідання, після чого її центрифугують при 1500-2000 об/хв. протягом 10 хв. Супернатант (плазму) відбирають, а осад еритроцитів промивають 2-3 рази з п'ятьма об'ємами фізрозчину. В реакції застосовуються 3 % суспензія еритроцитів, яку готують з осаду відмитих еритроцитів (1 мл еритроцитів суспендують у 33 мл фізрозчину).

Титрування гемолітичної сироватки. Її отримують шляхом 3-4 кратної внутрішньовенної імунізації кролів 50% суспензією еритроцитів барана у кількості 2-5 мл з проміжками 2-3 дні. Отриману сироватку прогрівають при 56 °С протягом 30 хв., для консервації додають до 0,5 % сухої борної кислоти, титрують, розливають у ампули і зберігають у холодильнику при 4 °С. Сухі препарати гемолітичної сироватки розводять стерильним фізрозчином згідно з інструкцією. Титрування роблять для отримання нової серії сироватки, а також з метою контролю її придатності при довготерміновому зберіганні - 1 раз на 3-4 місяці. Для визначення титру гемолітичної сироватки (гемолізіну) ставлять реакцію гемолізу з розбавленнями сироватки, що зменшуються, та комплементом, взятим у розбавленні 1:10 (табл. 7,8).

За титр гемолітичної сироватки приймають те максимальне її розведення, яке здатне розчинити протягом 1 год. при 37 °С 3 %-ну суспензію еритроцитів у присутності комплементу, взятих у рівнооднакових об'ємах.

Таблиця 7

Схема розбавлення гемолітичної сироватки

Інгредієнт, мл	Розбавлення сироватки							
	1:1 00	1:4 00	1:8 00	1:1 000	1:12 00	1:15 00	1:18 00	1:21 00
Гемолітична сироватка в розбавленні (1:10)	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Фізрозчин	1,8	3,9	7,9	9,9	11,9	14,9	17,9	20,9

Таблиця 8

Визначення титра гемолізину

Інгредієнт, мл	Розбавлення гемолізину, мл						Контроль		
	1:1 00	1:4 00	1:8 00	1:1 000	1:1 200	1:14 00	ГС	К	КЕ
Гемолітична сироватка	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
Еритроцити барана (3% суспензія)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Комплемент в розбавленні(1:10)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-
Фіз. р-н*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4
Результат	+++	++ +	++ +	++ +	++ +	+	-	-	-

Примітка: *Інкубацію проводять при 37 °С протягом 45-60 хв. (через 30 хв. струсити пробірки).

Позначення: +++ - повний гемоліз; “+” - неповний гемоліз; “-” - відсутність гемолізу;

Контроль: ГС-контроль гемолітичної сироватки на гемотоксичність; К-контроль комплекменту на гемотоксичність; Ке - контроль еритроцитів на стабільність у фізрозчині.

У вказаному досліді за титр гемолізину буде розбавлення сироватки 1:1200 (повний гемоліз). Для РЗК гемолітичну сироватку використовують у робочій дозі, рівній потроєному титрові сироватки 1:1200 розбавлення робочої дози буде 1:1400).

Приготування гемолітичної системи (гемосистеми). Вона являє собою суміш еритроцитів барана і гемолітичної сироватки. Готують її у день постановки досліді. Для цього до першого об'єму 3 %-ної суспензії

еритроцитів у колбі швидко приливають рівний об'єм гемолітичної сироватки, взятий у робочому розбавленні. Суміш витримують при 37 °С в термостаті 30 хв. для сенсibiliзації еритроцитів і після цього використовують в роботі.

Титрування комплементу. Як комплемент використовують свіжу сироватку, отриману від трьох - п'яти морських свинок, або сухий препарат комплементу, який виготовляють біофабрики.

Для визначення дози комплементу, в котрій його слід застосовувати в реакції, комплемент титрують. У допоміжному ряду пробірок готують розведення комплементу (табл.9). Потім їх розливають каліброваною піпеткою по 0,1 мл в дослідні пробірки, туди ж додають фізрозчин по 0,2 мл та гемосистему по 0,2 мл. Штатив з пробірками струшують і направляють у термостат при 37 °С на 1 год.

Таблиця 9

Титрування комплементу

Інгредієнт, мл	Розбавлення комплементу, мл							
	1:10	1:15	1:20	1:25	1:30	1:40	1:60	1:80
Комплемент	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Фізрозчин	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Гемосистема сенсibiliзована*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Результат	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-

Примітка: *Інкубація при 37° протягом 1 год.

Позначення: +++ - повний гемоліз; "+" - неповний гемоліз; "-" - відсутність гемолізу;

Контроль: ГС-контроль гемолітичної сироватки на гемотоксичність;

К - контроль комплементу на гемотоксичність;

КЕ - контроль еритроцитів на стабільність у фізрозчині.

Результати реакції оцінюють візуально за 3-плюсовою системою. Титр комплементу установлюють по пробірці з мінімальним вмістом комплементу, в котрій спостерігається повний гемоліз. За робочу дозу беруть попередню пробірку з більш високим вмістом комплементу, приблизно на 25-30 %.

Титрування антигену. За антиген в РЗК слугують убиті вірусні, бактеріальні та інші біологічні корпускулярні антигени, а також біологічні корпускулярні агенти, а також отримані з них колоїдні антигени.

Для диференціальної діагностики епідемічного та ендемічного (щурячого) висипного тифу використовують два антигену: з рикетсій Провачека та Музера.

Для визначення робочої дози антигену, тобто максимальної кількості антигену, в котрій він сам по собі не виявляє антикомплементаційної дії, проводять його титрування. З цією метою у допоміжному ряду пробірок роблять розведення антигену на фізрозчині рН 7,3.

У дослідний ряд пробірок градуйованою піпеткою переносять по 0,1 мл кожного розбавлення антигену (табл.10). Потім у кожен пробірочку додають по 0,1 мл комплементу, взятого у робочій дозі, і по 0,1 мл фізрозчину. Пробірки струшують і інкубують 1 год. в термостаті при 37 °С. Після інкубації в усі пробірки додають по 0,2 мл сенсibiliзованої гемосистеми. Пробірки знову струшують і термостатують при 37 °С ще одну годину. По закінченні цього терміну читають результати і визначають, за якої максимальної кількості антигену відбувається гемоліз. Ця кількість являє собою “розчинну” дозу антигену, котру і приймають за титр.

Для титрування сироватки використовують робочу дозу антигену, яка у два рази менша за титр АГ. В таблиці, де наведена схема титрування АГ, титр АГ дорівнює 1:16 (повний гемоліз), а його робоча доза буде 1:32. З установленою робочою дозою АГ можна працювати 2-3 дні, після цього АГ необхідно протитрувати знову.

Таблиця 10

Титрування антигену

Інгредієнт, мл	Розбавлення антигену								
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Антиген	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Комплемент (робоча доза)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Фізрозчин*	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Гемосистема**	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Результат	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Примітка: *Суміш антигену, комплементу та фізрозчину струшують, інкубація при 37 °С протягом 1 год. **Додають гемосистему, струшують, інкубація при 37° С протягом 1 год.

итрування сироватки на антикомплементарність. Імунна (досліджувана) сироватка. Для її отримання у хворого беруть з вени кров у об'ємі 5-10 мл, зазвичай натщесерце або через 6 год. після прийому їжі. Отриману сироватку інактивують прогріванням при 56 °С протягом 30 хв. Досліджувані сироватки людини і тварин у великих концентраціях можуть мати антикомплементарну дію. У зв'язку з цим під час роботи з такими сироватками необхідно визначити, які розбавлення її не мають антикомплементарних властивостей (табл.11).

З таблиці видно, що сироватка у розбавленнях 1:5 - 1:10 має антикомплементарну дію. З розбавлення 1:20 і вище сироватка не має антикомплементарності (повний гемоліз у пробірках).

Титрування досліджуваної сироватки на антикомплементарність

Інгредієнт, мл	Розбавлення досліджуваної сироватки						
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Досліджувана сироватка	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Комплемент (робоча доза)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Фізрозчин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Гемосистема* (робоча доза)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Облік рез.	-	+	+++	+++	+++	+++	+++

Примітка: *Інкубація при 37° протягом 1 год.

Позначення: “+++” - повний гемоліз; “++”, “+” - неповний гемоліз; “-” - відсутність гемолізу.

Для усунення антикомплементарності у досліджуваних сироваток застосовують такі методи: а) прогрівання на 1-2° вище необхідної температури, тобто інактивацію проводять не за температури 56 °С, а за 57-58 °С; б) однократне заморожування сироватки за температури -15 °С, -20 °С або -70 °С.

Постановка основний дослід РЗК. Перед постановкою реакції спочатку змішують досліджувану сироватку, антиген і комплемент. Суміш витримують у термостаті за температури 37 °С протягом години. По закінченню указанного терміну у пробірку додають сенсibiliзовану гемолітичну систему (табл.12). Пробірки знову струшують і термостатують за тієї ж температури годину, а потім оцінюють результати реакції зв'язування комплекменту.

Коли у дослідній системі відбувається специфічна реакція антигену і антитіла, в пробірках відзначається затримка гемолізу. В таблиці затримка гемолізу спостерігається у розбавленні сироватки 1:80, часткова затримка - 1:160.

За титр досліджуваної сироватки приймають максимальне її розбавлення, за якого ще спостерігається затримка гемолізу на “ххх”. За відсутності специфічної реакції, коли АТ не відповідає АГ, спостерігається повний гемоліз в усіх дослідних пробірках з досліджуваною сироваткою.

Схема постановки основного дослідження РЗК

Інгредієнт, мл	Розбавлення досліджуваної сироватки							Контроль		
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	ГС	АГ	К
Досліджувана сироватка	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-
Анти-ген (робоча доза)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-
Комплемент (робоча доза)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1
Фізрозчин*	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,1	0,2
Гемосистема (робоча доза)*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Облік рез.	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	x	-	xxx	-	-

Примітка : *Інкубація при 37° протягом 1 год.

Позначення: “xxx” - затримка (відсутність) гемолізу, “xx” - часткова затримка гемолізу (рідина забарвлена, на дні осад еритроцитів), “x” - слабка затримка гемолізу (рідина інтенсивно рожева, незначний осад еритроцитів), “-” - гемоліз (“лакова кров”, відсутність осаду), ГС - контроль гемосистеми на стабільність; АГ - контроль антигена на антикомплементальність; К - контроль активності робочої дози комплементу.

Матеріали та обладнання

1. Досліджуваний матеріал: сироватка крові, плазма.
2. Фізіологічний розчин.
3. Еритроцити барана.
4. Гемолітична сироватка.
5. Комплемент.
6. Специфічний та неспецифічний антиген.
7. Серопозитивна та серонегативна сироватка.
8. Сляні пробірки.
9. Градуйовані піпетки.
10. Воскові олівці.
11. Термостат.
12. Штатив для пробірок.

ЗАНЯТТЯ 8. РЕАКЦІЯ ПРЕЦИПІТАЦІЇ

Мета заняття: Ознайомитися з принципами та галуззю застосування реакції преципітації, опанувати методику постановки реакції преципітації.

Вперше реакція описана у 1897 р. німецьким вченим Краусом та російським мікробіологом Ф.Я. Чистовичом, які відзначили, що фільтрати бульйонних культур бактерій у присутності певних сироваток, що мають імунні гомологічні антитіла, дають утворення візуально помітного осаду.

Реакцію преципітації використовують:

- у судовій медицині для визначення видової приналежності кров'яних плям, сперми;
- у санітарній експертизі - виявляють домішки молока тварин одного виду до молока тварин іншого виду, домішки штучного меду до натурального, фальсифікацію м'ясних, рибних, борошняних виробів;
- у біології - визначають генетичні зв'язки споріднених тварин, рослин;
- в імунології - для виявлення та кількісного визначення імуноглобулінов у крові;
- у вірусології - для виявлення антигенів та антител до різних вірусних захворювань, а також для вивчення антигенної структури вірусів, наприклад вірусів кіру, ящура, віспи, поліомієліту та ін.
- у бактеріології - для визначення антигенів у діагностиці ряду інфекцій (дизентерії, сибірської виразки, менінгіту, пневмонії), а також для виявлення бактеріальних токсинів (наприклад у вивченні токсиноутворення у збудника дифтерії). Реакція преципітації - надзвичайно специфічна і чутлива імунологічна реакція, яка дає можливість виявити антигени у кількості 10^{-6} г білка.

Принцип реакції. В основі реакції преципітації лежить утворення, агрегація та утворення осаду комплексів антиген-антитіло. При цьому антиген має назву преципітиногена, антитіло - преципітин, утворюється комплекс - преципітат (рис.5). Відрізняє реакцію преципітації від реакції аглютинації те, що у першій - антиген розчинний, у другій - корпускулярний.

Антигеном можуть слугувати екстракти та лізати мікроорганізмів, тканин, органів, складні високомолекулярні сполуки та хімічно чисті речовини. Преципітуючу сироватку отримують шляхом гіперімунізації тварин (коней, овець, кролів) відповідним антигеном. Така сироватка має високий титр антител (не менш 1:100000).

Феномен реакції: антитіла, з'єднуючись з антигенами викликають їх агрегацію, що візуально виявляється помутнінням прозорих рідин та утворенням осаду. Осадження з рідин комплексів АГ-АТ відбувається тільки у діапазоні еквівалентних співвідношень концентрацій взаємодіючих молекул. У разі надмірної кількості одного з реагентів утворюється розчинний комплекс і феномен реакції не проявляється. Основні методи проведення реакції преципітації: реакція кільцепреципітації та реакція преципітації в агарі (гелі).

Практичне завдання: визначити кількісний вміст імуноглобулінів класів G, A, M, в сироватці крові людини за методом радіальної імунодифузії в гель (метод Манчіні).

1. Поставити реакцію Манчіні з метою визначення рівня імуноглобулінів у досліджуваній сироватці крові.

2. Побудувати калібровочну криву і визначити кількість імуноглобулінів класів G, A, M.

Методика визначення імуноглобулінів методом радіальної імунодифузії у гелі (метод Манчіні). Визначення імуноглобулінів у нормі і при патології в сироваткових препаратах та в біологічних рідинах проводять за допомогою реакції преципітації. Для якісного дослідження імуноглобулінів за допомогою моноспецифічних сироваток використовуються методи імуноелектрофорезу (ІЕФ) та преципітації в гелі за методом Оухтерлоні. Кількісний вміст імуноглобулінів визначають за методом радіальної імунодифузії (РІД) у гелі (метод Манчіні), який має високу специфічність та чутливість.

Принцип методу. Метод РІД ґрунтується на вимірюванні діаметра кільця преципітації, що утворюється при внесенні досліджуваної сироватки у виямки, вирізані у шарі агару, у котрий попередньо внесена моноспецифічна сироватка. За стандартних умов досліду діаметр кільця преципітації прямо пропорціональний концентрації досліджуваного імуноглобуліну. Вміст імуноглобулінів визначають відносно контрольної сироватки крові людини з відомою концентрацією імуноглобулінів.

Методика постановки РІД

1. Приготування веронал-мединалового буферу: Розчин А: 1,03 г мединалу розчиняють у 100 мл дистильованої води;

Розчин Б: 0,05 М HCl готують наступним чином: 0,15 мл HCl вносять в 100 мл дист. води;

Робочий розчин: до 30 мл розчину А додають 6 мл розчину Б і доводять загальний об'єм до 200 мл дистильованою водою.

2. Приготування агару: 3,75 г агару Дифко розчиняють в 150 мл буфера і розплавляють на водяній бані протягом 1-2 годин. Розливають по 6 мл у пробірки і зберігають у холодильнику.

3. Розведення моноспецифічних сироваток. У кожену ампулу з ліофілізованою моноспецифічною сироваткою вносять по 1 мл дистильованої води. Потім сироватки розбавляють буфером до 1/2 титру, вказаного на етикетці. Наприклад, при титрі сироватки 1:24 робоче розбавлення складає 1:12. Розбавлені сироватки поміщують у термостат при 37 °С.

4. Розбавлення стандартної контрольної сироватки. Контрольна сироватка являє собою суміш сироватки крові донорів (не менше, ніж від 500) з певним вмістом імуноглобулінів, розлита по 1 мл у ампули та ліофілізована. Ампулу відкривають, додають 1 мл дистильованої води, відбирають 0,5 мл сироватки і готують розбавлення 1:2, 1:4, 1:8.

5. Агар, розплавлений та охолоджений до 56 °С, змішують з попередньо прогрітою у термостаті при 37 °С сироваткою і виливають рівномірним шаром на поверхню платівки, установлені чітко горизонтально.

6. Після того, як агар затужавіє, пробійником, який має діаметр 2 мм, роблять виїмки на відстані 15 мм за схемою (рис. 2)

	Ц	1:2	1:4	1:8
1	○	○	○	○
2	○	○	○	○
3	○	○	○	○
4	○	○	○	○

Рис.2. Схема постановки реакції преципатації по Манчїні

7. У виїмки першого ряду вносять по 2 мкл контрольної сироватки нерозведеної та у розбавленні 1:2, 1:4, 1:8. Виїмки наступних рядів заповнюють дослідними сироватками (по 2 мкл). Сироватку для визначення вмісту IgM вносять нерозбавленою, для IgA та IgG - розбавляють 1:2.

8. Платівки інкубують у вологій камері при 4 °С 24 години для IgA та IgG; 48 годин для IgM.

9. Облік та оцінка результатів.

По закінченню експозиції лінійкою вимірюють діаметр кілець приципатації. Рівень імуноглобулінів визначають за калібровочною кривою, яка виражає залежність між рівнем імуноглобулінів та діаметром кілець преципатації. Для цього на осі абсцис відкладають діаметр кілець преципатації (8 мм) контрольної сироватки з відповідною моноспецифічною сироваткою, а на осі ординат - відому концентрацію імуноглобуліну у МЕ/мл або мг/мл, яка присутня у контрольній сироватки кожного розбавлення (мал 8.). Знайдені точки перетину з'єднуються прямою, нахил якої не повинен перевищувати 40-50 °. Для визначення рівня Ig у досліджуваній сироватці на осі абсцис відкладають діаметр кільця преципатації досліджуваної сироватки, встановлюють перпендикуляр до перетину з кривою із точки перетину роблять проекцію на вісь ординат. Вміст Ig виражають у МЕ/мл або мг/мл.

Матеріали та обладнання

1. Досліджувана сироватка.
2. Моноспецифічні сироватки проти імуноглобулінів G, M, A людини.
3. Стандартна сироватка людини.
4. Агар.
5. Веронал-мединаловий буфер.
6. Полістиролові планшети.
7. Водяна баня.
8. Ексикатор.
9. Термостат.
10. Піпетки на 1 мл.
11. Мікрошприці та дозатори.

ЗАНЯТТЯ 9. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Мета заняття: Ознайомитися з принципом, методичними варіантами та галуззю застосування імуноферментного аналізу; опанувати непрямий метод імуноферментного аналізу ELISA.

На початку 70-х років ХХ сторіччя пошуки простих чутливих методів виявлення і кількісного визначення антигенів та антитіл привели до розробки твердофазного імуноферментного аналізу ELISA (від англ. enzyme-linked immunosorbent assay) - виявлення з використанням імуносорбентів, зв'язаних з ферментами. Таким чином, особливістю методів ІФА являється використання функціонально активної біологічної молекули ферменту.

Основні принципи твердофазного ІФА (ELISA).

Можливість проведення твердофазного ІФА незалежно від модифікації ґрунтується на 4-х принципах:

1. Різні ферменти, найпоширеніші з котрих пероксидаза хрому та лужна фосфатаза, можна ковалентно приєднувати до антигенів або антитіл різними хімічними методами за таких умов, коли обидва компоненти кон'югату зберігають свою біологічну активність (здатність до взаємодії з субстратом, антигенність, антигензв'язуючу активність).

2. Більшість антигенів, у тому числі білки, ліпополісахариди та бактеріальні ліпополісахариди, самочинно сорбується на поверхні пластику (наприклад, у виїмках полістиролової панелі для мікротитрування). Антитіла, що мають білкову природу, також сорбуються на пластику, зберігаючи при цьому антигензв'язуючу активність. Саме на цьому принципі ґрунтується перший етап реакції, що полягає у іммобілізації панелей антигенами або антитілами. Адсорбовані на твердій фазі антигени або антитіла уже не змиваються буфером, який містить детергент, тоді як реагенти, що не зв'язалися легко видаляються відмиванням.

3. При інкубації на другому етапі в змобілізованих виїмках досліджуваного зразка та стандартних реагентів на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси, що складаються з одного або кількох шарів. Компоненти, що не зв'язалися, на кожному етапі видаляються відмиванням, що дає можливість добитися високої специфічності аналізу у реакції ферменту, який входить до складу кон'югату, з індикаторним субстратом.

4. При зв'язуванні кон'югату антитіло-фермент або антиген-фермент з іммобілізованим імунним комплексом активний центр ферменту залишається доступним для взаємодії з субстратом.

Інкубація субстраті з іммобілізованим кон'югатом, як правило, приводить до розвитку кольорової реакції. На певній стадії реакцію зупиняють, а інтенсивність забарвлення оцінюють візуально, порівнюючи із стандартом, або за оптичною густиною (фотометрія за певної довжини хвилі). Деякі варіанти методу припускають забарвлення самої твердої фази. У цих випадках використовують хромогенні субстрати, що дають продукти у вигляді нерозчинних, іммобілізованих на твердій фазі забарвлених преципітатів.

Реакція характеризується високою специфічністю, яка властива імунореагентам і чутливістю, що забезпечується діями ферменту.

Всього декілька молекул кон'югованого ферменту, який присутній у системі, здатні розщепити безліч молекул субстрату з утворенням продуктів, які легко виявляються, що дає можливість, в решті решт, реєструвати та обчислювати кількісно взаємодію всього декількох молекул імунореагента, наприклад, антитіл з гомологічним антигеном.

Матеріали та методичні заходи, які використовуються в ІФА. Як тверду фазу використовують речовини різного хімічного складу: полістирен, поліпропілен, полівініл, гелі декстрина, агарози, поліакриламід, целюлозу, нітроцелюлозу, нейлон. За фізичними ознаками це можуть бути гелі, кульки, листи, диски, спеціальні титраційні панелі. Зв'язуюча поверхня панелей покрита спеціальними реагентами, що сприяють адсорбції антигенів і антитіл.

Зв'язування речовин та клітин з твердою фазою відбувається нековалентно (адсорбція), завдяки утворенню гідрофобних або йонних зв'язків, або ковалентних (кон'югація) за допомогою ціанброміда, глутарового альдегіда, полілізіна. Ступінь адсорбції залежить від фізико-хімічних властивостей молекул: ізоелектричної точки, рН, молекулярної маси, конформації, а також від концентрації в розчині, терміну та температури інкубації тощо. Оптимальна концентрація чистих білкових агентів складає 1-10 мкг/мл; полісахаридних - близько 500 мкг/мл.

Ферменти для ІФА повинні задовольняти низці вимог: мати в структурі реакційні групи, завдяки яким можливе зв'язування їх з імунореагентами; зберігати високу ферментативну активність у кон'югованому стані протягом тривалого терміну; бути чистими, стабільними в реакційній суміші. Застосовують тільки ті ферменти, котрі розщеплюють субстрати з утворенням продуктів, що легко визначаються тим або іншим способом.

Методи ТФ ІФА адаптовані для роботи з корпускулярними агентами-хромосомами, вірусами, бактеріями (bacto-ELISA), клітинами еукаріот (cell-ELISA). Клітини бактерій можна прикріпити до поверхні пластикових платівок висушуванням.

Після зв'язування будь-якого імунореагента вільні місця на ТФ блокують, щоб відвернути неспецифічне зв'язування з нею імунореагентів на подальших етапах аналізу. Застосовують різноманітні білки та неіонні детергенти: бичачий сироватковий альбумін (1% розчин), желатин (0,2-0,5%-ні розчини), нормальні сироватки (1-5%-ні розчини), бичачий γ -глобулін (1%-ний розчин), тритон X-100 та твін 20 (0,05-0,5 %-ні розчини).

Методичні варіанти ТФ ІФА

- ELISA. Прямий варіант, що передбачає утворення двох шарів імуних комплексів.

При здійсненні цієї найпростішої модифікації ІФА виїмки панелей сенсibiliзують (імобілізують) антигенами (антитілами), а потім інкубують з антитілами (антигенами), міченими ферментом. Зв'язування кон'югату, що містить фермент, з твердою фазою відбувається лише у тому разі, коли обидва компоненти системи взаємно комплементарні.

Модифікацією цього варіанту є конкурентний аналіз, у якому Аг(Ат), мічений ферментом, конкурує з неміченим Ат(Аг). У цьому випадку ферментативна активність утвореного комплексу Ат-Аг-Ф (Аг-Ат-Ф) обернено пропорціональна кількості Аг(Ат) у досліджуваному зразку (рис.8,9).

Наприклад, виявлення сироваткових антитіл до чітко визначеного епітопу антигена по конкуренції з міченими стандартними антитілами, специфічними до цього ж епітопу.

- ”Сендвіч”-варіанти ELISA. Відповідно до схеми даного варіанту аналізу антитіла (звичайно моноклональні або високо афінні), адсорбовані на твердій фазі, інкубують з досліджуваним зразком. Після відмивання у виїмки вносять мічені ферментом антитіла до того ж антигена і далі проводять усі наступні етапи реакції так само, як і при відтворенні інших описаних модифікацій.

Єдине обмеження цього варіанту полягає у тому, що досліджуваний антиген повинен мати декілька епітопів, які зв'язують антитіла.

- Непрямий ELISA для виявлення антитіл та антигенів. Це варіант найзручніший для повсякденного аналізу сироваток на наявність специфічних антитіл. Найбільше поширення він має в епідеміології інфекційних захворювань. Для проведення реакції у виїмках панелей адсорбують антиген (звичайно екстракт з бактерій, паразитів та вірусів) і інкубують із зразками сироватки або іншого матеріалу (спинномозкової рідини, молока, слюни, витяжки фекалій). Специфічні до антигенів антитіла виявляють за допомоги антиглобулінового кон'югату. Основна перевага методу в “універсальності” кон'югату. Наприклад, один і той самий кон'югат, специфічний до імуноглобулінів людини, може слугувати для виявлення антитіл людини до найрізноманітніших антигенів у будь-яких зразках. Оскільки обидва реагенти, які застосовуються у цьому варіанті ІФА, можуть бути стандартизовані, реакція методично проста і легко контролюється.

Практичне завдання: Провести серодіагностику сифілісу визначити наявність антитіл до *Treponema pallidum* у сироватці крові людини непрямим методом ELISA з використанням тест-системи.

Тест-система являє собою набір інгредієнтів для проведення імуноферментного аналізу (ІФА) з метою виявлення специфічних антитіл до збудника сифілісу у сироватці крові людини.

Діючим елементом тест-системи є трепонемний ультразвуковий антиген, адсорбований на планшеті. Негативна та позитивна сироватки крові людини слугують для визначення специфічної активності тест-системи. Кон'югат необхідний для виявлення утвореного комплексу “антиген-антитіло”. Індикатором імуноферментної реакції є 5-АСК.

Сорбент готують із сухого концентрату сироватки молока та сухого ферментативного пептону. Детергент - поверхнево-активна речовина, додається до 0,9 %-ого розчину хлористого натрію та до сорбенту.

Розчин для приготування антигену готують з вуглекислого натрію та кислого вуглекислого натрію. Розчином для промивання планшетів слугує 0,9 %-ний розчин хлористого натрію. Розчином для розведення сироваток слугує сорбент. Розбавлення кон'югату готують у розчині, що містить рівні частини сорбенту та 0,9 %-ного розчину хлористого натрію. Сорбція розведених сорбентом сироваток крові необхідна під час проведення ІФА для попередження можливих неспецифічних результатів.

Приготування розчинів

Розчин №1. Карбонатно-фосфатний буферний розчин у концентрації 0,01 моль/л (рН $9,6 \pm 0,2$) готують розчиненням 118 мг вуглекислого натрію з флакону з етикеткою “Натрій вуглекислий безводний” та 346 мг кислого вуглекислого натрію з флакону “Натрій вуглекислий кислий” у 20 мл дистильованої води та наступним доведенням об'єму дистильованою водою до 100 мл. Зберігають не більше 2 тижнів при температурі 4-8 °С.

Розчин №2. Вміст флакону з етикеткою “Антиген трепонемний ультразвуковий, сухий” розчиняють у 5 мл розчину №3, без детергента. Робочий розчин готують, використовуючи розчин №1, розбавлений як зазначено на етикетці флакону. Залишки вихідного розчину антигена зберігають при температурі мінус 20-16 °С у пробірках по 0,5 мл протягом 2-х місяців.

Розчин №3. 0,9 % розчин хлористого натрію готують розчиненням 45 г солі з пакету з етикеткою “Натрій хлористий” у 5 л дистильованої води. Розчин зберігають при температурі 4-6 °С протягом 2-х тижнів. Перед застосуванням додають детергент з розрахунку 0,5 мл на 1 л розчину.

Розчин №4. Вміст флакону з етикеткою “Сироватка крові людини, що містить антитіла до *Treponema pallidum* суха” розчиняють у 0,5 мл стерильної дистильованої води, потім відбирають 0,1 мл і розчином №6 розводять до 1:10. З отриманого розчину відбирають 0,1 мл та розчином №6 розбавляють до 1:20, отримуючи при цьому розбавлення сироватки крові 1:200. Ретельно перемішують. Сорбцію сироватки крові проводять при температурі (37 ± 1) °С протягом 60 хв.

Не зберігають. Вихідний розчин сироватки крові, що залишився зберігають при температурі мінус 20-16 °С у пробірках по 0,1 мл протягом 2 місяців.

Розчин № 4А. Вміст флакону з етикеткою “Сироватка крові людини, що не містить антитіла до *Treponema pallidum* суха”, розбавляють у 0,5 мл стерильної дистильованої води, після чого відбирають 0,1 мл і розчином №6 розбавляють до 1:20, отримуючи при цьому розбавлення сироватки крові 1:200. Ретельно перемішують. Сорбцію сироватки проводять при температурі (37 ± 1) °С протягом 60 хвилин. Не зберігають. Залишки вихідного розчину сироватки крові зберігають при температурі мінус 20-16 °С у пробірках по 0,1 мл протягом 2 місяців.

Розчин №5. Вміст флакону з етикеткою “Антитіла діагностичні проти імуноглобулінів людини, мічені пероксидазою, сухі (кон'югат)” розводять у

0,5 мл стерильної дистильованої води. Робочий розчин готують використовуючи розчин, який складається з рівних об'ємів розчинів №6 та №3, містить детергент у розбавленні, яке зазначене на етикетці флакону. Не зберігають. Залишки вихідного розчину кон'югату зберігають при температурі мінус 20-16 °С у пробірках по 0,1 мл протягом 2-х місяців.

Розчин №6. Сорбент. Вміст флакону з етикеткою “Пептон ферментативний, сухий” розчиняють у 150 мл дистильованої води. До отриманого розчину додають вміст флакона з етикеткою “Біологічно активний концентрат сироватки молока, сухий” та 0,75 мл детергенту. Ретельно перемішують. Розчин зберігають при температурі 4-8 °С протягом 3-х діб.

Розчин №7. 0,05 %-ний розчин перекису водню готують з таблетки гідропериту. Для цього таблетку розчиняють у 50 мл дистильованої води (розчин А). Розчин А зберігають не більше 3-х тижнів у темному місці при температурі 4-8 °С. Робочий розчин перекису водню готують додаючи 0,5 мл розчину А до 9,5 мл дистильованої води. Отримують 0,05 %-ний розчин перекису водню, який зберігають не більше 3 днів при температурі 4-8 °С у захищеному від світла місці.

Розчин №8. Вміст флакона з етикеткою “5-аміносаліцилова кислота” розчиняють у 25 мл дистильованої води при температурі 58-62 °С. Якщо використовують роз'ємні планшети з числом виямок не менше 96, то необхідну кількість 5-АСК визначають від необхідної кількості субстрату, розчин №8 при цьому має утримувати 4 масових частини 5-АСК та 5000 масових частин дистильованої води (тобто готують 0,08 %-ний водний розчин 5-АСК). Розчин охолоджують до температури 18-22 °С та встановлюють рН 6,00±0,05 розчином №10. Розчин №8 готують не раніше, ніж за 30 хвилин до використання, зберігають у темному місці при температурі 18-22 °С.

Розчин №9. (субстратна суміш). Змішують розчин №8 та розчин №7 у відношенні 9:1. Субстратну суміш готують за 10 хвилин до використання при температурі 18-22 °С. Суміш не зберігають!

Розчин №10. Розчин натрія гідроксиду у концентрації 0,1 моль/л готують, розчиняючи вміст флакону з етикеткою “Натрія гідроксид” у 10 мл дистильованої води. Зберігати не більше 3-х місяців при температурі 4-8 °С.

Хід аналізу

Для проведення реакції використовують піпетки градуйовані (місткістю 0,1; 0,2; 1; 2; 5 мл) або дозатори піпеткові (місткістю 0,02; 0,1; 0,2; 1 мл). Можна використовувати автоматичні піпетки закордонних фірм “Gilson”, “Titertek” або аналогічних підприємств.

1. Планшети виймають з коробки та тричі промивають розчином №3 без детергенту (тобто фізіологічним розчином). Для цього виїмки заповнюють розчином, потім планшет перевертають і видаляють рідину з лунок сильним струшуванням, після чого закривають планшет фільтрувальним папером або марлею та витрушують залишки розчину.

2. У виїмки планшету вносять по 0,2 мл розчину № 2 робочого розбавлення (антиген трепонемний ультразвуковий).

3. Адсорбцію антигену на поверхні виїмок проводять протягом 18 ± 2 год. при температурі $18-22$ °C.

4. По закінченню адсорбції видаляють антиген з лунок планшета сильним витрушуванням і відмивають 5 разів розчином №3, що містить детергент, наступним чином: у лунки заливають 0,9 %-ний розчин хлористого натрію, що містить детергент, і витрушують (операцію повторюють 5 разів), після чого закривають планшет фільтрувальним папером або марлею і витрушують залишки розчину.

5. Досліджувані сироватки крові розбавляють у 200 разів розчином №6 та сорбують при температурі $18-22$ °C та ретельно перемішують.

У лунки планшета вносять 0,2 мл розчину досліджуваних сироваток у розбавленні 1:200 (по 2 виїмки кожної сироватки), по 0,2 мл розчинів №4 (4 виїмки), №4а (2 лунки).

6. Планшет витримують у термостаті при температурі 37 ± 1 °C протягом 30 хв.

7. Після витримування планшета в термостаті, видаляють витрушуванням рідину з лунок і відмивають планшет 5 разів розчином № 3 з детергентом, як зазначено у пункті 4.

8. У кожен лунку планшета вносять по 0,2 мл розчину № 5 у робочому розбавленні (антитіла діагностичні проти імуноглобулінів людини, мічені пероксидазою - кон'югат).

9. Планшет витримують у термостаті при температурі (37 ± 1) °C протягом 30 хв.

10. Видаляють рідину з лунок планшета витрушуванням і відмивають 5 разів планшет вносять по 0,2 мл субстратної суміші (розчин № 9).

11. У кожен лунку планшета вносять по 0,2 мл субстратної суміші (розчин № 9).

12. Планшет витримують 60 хв. при температурі $18-22$ °C у захищеному від світла місці.

13. У лунках планшета, де пройшла реакція, виникає забарвлення до коричневого кольору. У виїмках, де проводилось дослідження негативної сироватки, колір субстрату світло-бежевий.

14. Контролі при проведенні імуноферментного аналізу:

а) контроль кон'югату: проведення реакції у зазначеній послідовності, але замість сироватки крові вносять розчин № 6 (2 лунки) та розчин №3 з детергентом (2 лунки). Має бути негативний результат;

б) контроль субстратної суміші: проведені реакції у зазначеній послідовності, але замість кон'югату вносять розчин № 3 з детергентом (2 лунки). Має бути негативний результат;

в) визначення активності субстратної суміші з позитивною контрольною сироваткою (2 лунки), котрі проводять перед внесенням суміші у решту лунок. Різка зміна забарвлення протягом 10 хв. означає придатність субстратної суміші. Якщо колір не змінюється або змінюється слабо, необхідно більш ретельне повторне приготування суміші з наступною перевіркою її активності за допомоги позитивної контрольної сироватки крові.

Облік результатів

Результати реакції обліковують за забарвленням субстратної суміші інструментально, визначаючи поглинання при довжині хвилі 450 нм.

1. Візуальний облік реакції:

- у виїмках, в котрі вносили розчин № 3 з детергентом, субстратна суміш має бути безкольоровою або світло-бежевою;
- у виїмках, в котрі вносили негативну контрольну сироватку у розбавленні 1:200 (розчин №4а), субстратна суміш забарвлюється у світло-бежевий колір;
- у виїмках, у котрі вносили позитивну контрольну сироватку в розбавленні 1:200 (розчин №4), реакція має бути чітко вираженою, субстратна суміш забарвлюється інтенсивно, набуваючи забарвлення від коричневого до темно-коричневого.

Світло-бежевий колір відповідає заперечним результатам, бежевий - 1 плюсу, темно-бежевий - 2 плюсам, світло-коричневий - 3 плюсам, коричневий та темно-коричневий - 4 плюсам.

2. Облік реакції за допомоги вертикального спектрофотометра (рідера) типу "Мультискан" або "Уніскан":

- оптична густина (ОГ) субстратної суміші у виїмках, у котрі вносили розчин № 3 з детергентом, має бути не більше 0,25;

- ОГ субстратної суміші у виїмках, у котрі вносили розчин №6, має бути не більше 0,25;

- ОГ субстратної суміші у виїмках, у котрі вносили негативну контрольну сироватку (розчин; 4а), має бути не більше 0,35;

- ОГ субстратної суміші у виїмках, у котрі вносили позитивну контрольну сироватку (розчин № 4), має бути не більше 0,9.

Показники рідера відповідають: до 0,35 - заперечним результатам; 0,36 - 0,45 - 1 плюсу; 0,46 - 0,65 - 2 плюсам, 0,66 - 0,89 - 3 плюсам, 0,9 та вище - 4 плюсам.

Як при візуальній, так і при інструментальній оцінці, негативними вважають результати до 1 плюса включно, 2 плюси - слабопозитивна, 3 плюси - позитивна та 4 плюси - різкопозитивна.

Систему вважають специфічно активною при наявності виразної реакції з позитивною контрольною сироваткою крові та відсутністю реакції із заперечними контролями (розчин № 3 з детергентом, розчин № 6, негативна контрольна сироватка).

Можливі помилки

До найбільш типових помилок при проведенні імуноферментного аналізу, які приводять до отримання недостовірних результатів слід віднести: неправильне приготування розчинів, порушення режимів температури та терміну, невідповідність вимогам значення рН розчинів, погане перемішування розчинів, забруднення лабораторного посуду.

Посуд має бути ретельно вимитим та висушеним у сухожаровій шафі при температурі 140-150 °С протягом 30-50 хв. для руйнування біологічно активних субстанцій.

Матеріали та обладнання

1. Антиген трепонемний ультразвуковий, сухий - 1 фл.-5 мл.
2. Антитіла діагностичні проти імуноглобулінів людини, мічені пероксидазою, сухі (кон'югат)- 1 фл.- 0,5 мл.
3. Сироватка крові людини, яка має антитіла до *Treponema pallidum*, суха - позитивна контрольна сироватка - 1 фл.-0,5 мл.
4. Сироватка крові людини, яка не має антитіл до *Treponema pallidum*, суха - негативна контрольна сироватка - 1 фл. - 0,5 мл.
5. Сухий біологічно активний концентрат сироватки молока - 4 фл. - по 9 г.
6. Пептон сухий ферментативний для бактеріологічного застосування - 4 фл. по 6 г.
7. Кислота 5-аміносаліцилова - 5 фл.
8. Гідроперит - 6 табл. по 1,5 г.
9. Твин-20 або сорбіталь Л-20 детергент 1 фл. - 8 мл.
10. Натрій хлористий (для приготування промиваючого розчину) 1 пакет - 180 г.
11. Натрій вуглекислий кислий (для приготування буферного розчину) 1 фл. - 3,0 г.
12. Натрій вуглекислий (для приготування буферного розчину) 1 фл. - 1,5 г.
13. Натрію гідроокис 1 фл.- 0,4 г.
14. Планшети 4 шт.

ЗАНЯТТЯ 10. РАДІОІМУННИЙ АНАЛІЗ (PIA)

Мета заняття: Познайти з принципом і областю використання радіоімунологічних методів; опанувати методикою постановки IPMA-HBsAg – ^{125}I

Радіоімунологічний аналіз (PIA) уперше був описаний Ялоу і Берсон (Yalow, Berson, 1960) у США. За розробку цього методу Розалин Ялоу була визнана гідною Нобелівської премії в 1977 р. У 1958 р. Фарр запропонував методикою визначення єднальної здатності антисироваток, у принципі застосовну до усім Ag. Надалі широке застосування методу знайшов для підтвердження діагнозу системної червоної волчанки. Для його постановки необхідна наявність радіоактивних мічених Ag (ДНК).

Для радіоімунологічних методів характерна висока специфічність, так можливо виявити в 1 мол аналізованих зразків 10^{-9} - 10^{-12} м тестуемого речовини. За допомогою набору IPMA-HbsAg – ^{125}I мінімальна обумовлена концентрація HbsAg, складає 5×10^{-9} г/мл. Також відсутня необхідність оцінювати реакцію, що протікає, по вторинних проявах: аглютинація, преципітація і лізис еритроцитів. Крім того методи PIA придатні для виявлення практично будь-яких речовин, до яких можуть бути отримані Ат. У лабораторній діагностиці одержали широке поширення: Радіоімунологічний аналіз у рідкій фазі, радиоаллергосорбентный тест (RAST), Радіоімунологічний сорбентний тест (RIST і PRIST), иммунорадиометричний аналіз (IPMA) і ін.

PIA широко застосовується при вивченні і визначення:

- бактеріальних, вірусних (гепатиту В) і пухлинних Ag (канцероємбріонального);
- противірусних Ат і асоційованих з пухлинами Ат;
- у діагностиці аутоімунних захворювань (системна червона волчанка, ревматоїдний артрит, міастенія, Синдром Гудпасчера);
- циркулюючих імунних комплексів;
- канцерогенних похідних ДНК;
- кількісного визначення гормонів, простагландинів, ферментів, тканинних і плацентарних поліпептидів, циклічних полинуклеотидов і фармацевтичних препаратів.

Один з недоліків полягає в тому, що дані методи не дозволяють розрізняти активні білкові молекули і біологічно неактивні фрагменти, однак, що зберегли антигенні детермінанти. Крім того, важливим фактором, що обмежує застосування PIA, є нестабільність радіоізотопів – напіврозпад, наприклад ^{125}I – 60,04 доби і дотримання спеціального режиму безпеки експлуатації і збереження, використання дорогих лічильників. Проте інші методи поки не можуть витіснити PIA.

Принцип методу.

Метод ґрунтується на виявленні і кількісному визначенні чи антигену антитіл шляхом радіоактивного маркірування одного з двох компонентів. У якості мітки використовують радіоактивні ізотопи β -часток (^3H чи ^{14}C), або γ -

промені (^{125}I чи ^{131}I). Найчастіше застосовують ізотоп йоду ^{125}I . Радіоактивність Аг, використовуваних у РІА, звичайно складають 100-200 мкКи/мкг, радіоактивність Ат – 20 мкКи/мкг, а для модифікації РІА з подвійними Ат - 0,1 мкКи/мкг*. У залежності від умов експерименту розрізняють РІА конкурентний і не конкурентний у рідкій чи на твердій фазі (рис.10).

Класичний радіоімунологічний аналіз заснований на принципі конкурентного гальмування з використанням рідкої фази, тобто зв'язування відомого міченого радіоактивною речовиною антигену (Аг*) специфічними антитілами (Ат) залежить від концентрації досліджуваного неміченого антигену (Аг) (рис.3) Чим більше зв'язується немічених антигенів у комплекс [Аг-Ат], тим менше радіоактивність комплексу [Аг*-Ат].

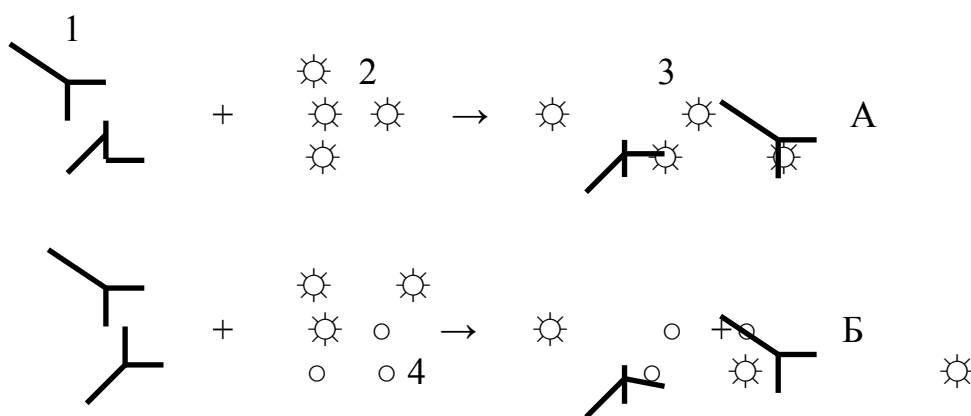


Рис. 3. Принцип РІА з використанням рідкої фази

1 - антитіло; 2 - радіоактивний антиген; 3 – комплекс [Аг*-Ат];

4 – обумовлений антиген;

Реакція проходить за наступною схемою:



Таким чином, співвідношення вільної і зв'язаної радіоактивності залежить від кількості доданого неміченого Аг і тому можна побудувати калібровану криву. Де на осі ОХ відкладені значення концентрації досліджуваного антигену, а на осі ОУ відкладений відсоток зв'язаної радіоактивності.

Після встановлення рівноваги в системі відокремлюють комплекс [Аг*-Ат] + [Аг-Ат] від вільних Аг* і Аг. Для того щоб процес поділу відповідав вимогам, до аналізу повинні дотримуватися наступні умови:

- 1) не повинно виявлятися впливу на стан рівноваги;
- 2) відділення зв'язаних Ат від незв'язаних повинно носити кількісний характер;
- 3) витрата часу і вартість процесу повинні бути незначними.

* - 1 микрорюри (мкКи) = $3,7 \times 10^4$ расп./с

Використовують наступні способи для поділу: розходження в заряді і відносній молекулярній масі дозволяють проводити електрофорез чи гель-хроматографію; селективна адсорбція Аг на тальку, кварці, целюлозі з'єднаних з активованим вугіллям; поділом у магнітному полі кон'югованих Ат із залізовмісними частками ензакріла. Осадження комплексу здійснюють також за допомогою 50% розчину амонію сульфату (метод Фарра) або шляхом преципітації його з відповідною антисироваткою (метод подвійних антитіл). У сучасних модифікаціях РІА не обов'язково проводити поділ вільного і зв'язаного антигену, через істотні відмінності вільної і зв'язаний з антитілами мітки Аг*.

Потім вимірюють, радіоактивність обложеного комплексу і по кривій простою екстраполяцією встановлюють кількість антигену.

Твердофазний радіоімунологічний аналіз використовується для більш простого відділення комплексу [Аг-Ат] від вільного компонента реакції. Один із двох компонентів реакції фіксується на твердій основі (частки сефадекса, сефароза, целюлоза, полістиролу, поліпропілену). Якщо ми адсорбували на носії Аг, то зміст Ат у досліджуваній сироватці можна визначити, додавши мічені анти-Ig, отримані від тварини.

ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ

1. Метод визначення аутоантитіл до ДНК при системній червоний волчанці. У мікропанель на стінках лунок якої раніше адсорбований антиген (ДНК) додають сироватку хворого. Аутоантитіла зв'язуються з антигеном, інші білки сироватки віддаляються промиванням. Потім додають мічені ¹²⁵I очищені антитіла кролика до Ig людини. Після промивання оцінюють рівень радіоактивності і роблять висновок про кількість аутоантитіл у сироватці хворого.

2. Радіоаллергосорбентний тест (radioallergosorbent test – RAST). Застосовується для визначення специфічних антитіл класу Ig у страждаючих алергією. Алерген (екстракт пилка), приєднаний ковалентно до носія (паперовий диск), інкубують із сироваткою хворого, промивають і з'єднують з міченою радіоактивною речовиною анти-Ig. Ступінь радіоактивності пропорційний змісту Ig у сироватці хворого.

3. Радіоімунологічний сорбентний тест (radioimmunosorbent test – RIST) застосовується для визначення Ig. Кролячі анти-IgE-антитіла, фіксують на твердій фазі мікрокристалічній целюлозі за допомогою ціаногенброміда і проводять реакцію з розведеннями стандартної сироватки (утримуючої мічений Ig) і досліджуваною сироваткою хворого. Кількість що зв'язались Ig потім визначають, додаючи мічені анти-Ig.

ВИЗНАЧЕННЯ АНТИГЕНУ

1. Радіоімунологічний сорбентний тест на папері (paper radioimmunosorbent test – PRIST). Застосовується для виявлення антигенів гепатиту У в сироватці хворого. Специфічні антитіла фіксуються на смужці папера, потім послідовно інкубуються із сироваткою хворого і зі

специфічними антитілами, міченими радіоактивною речовиною. Радіоактивність смужки папера пропорційнаї концентрації антигенів.

2. Імунорадіометричний аналіз відрізняється від класичного радіоімунологічного тим, що використовується надлишок міченого реагенту. Тверду фазу, наприклад пластик, навантажують Ат і додають досліджуваний розчин, у якому необхідно визначити Аг (рис. 4). Потім промиванням.

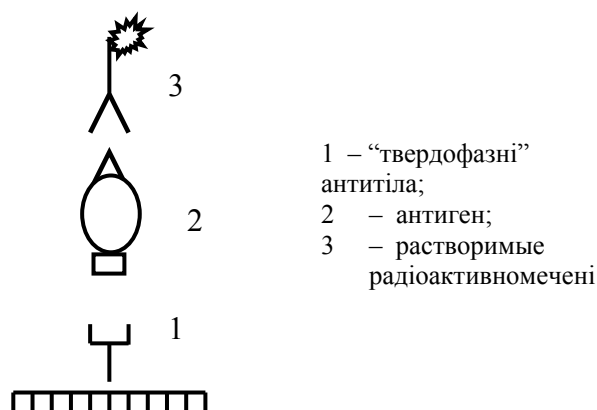


Рис 4. Твердофазне імунорадіометричне визначення антигену

видаляють не зв'язалися Аг і додають надлишок радіоактивно мічених Ат. Специфічність методу збільшується при використанні “твердофазних” і мічених антитіл, спрямованих до різних ділянок антигену. Метод використовується для визначення наявності поверхневого антигену гепатиту В в сироватці і плазмі крові людини.

Умови проведення імунорадіометричного аналізу HbsAg

- 1) досліджувана сироватка від чи донора від хворого з підозрою на гепатит У;
- 2) Ат до HbsAg, іммобілізовані на внутрішній поверхні пластмасових пробірок;
- 3) наявність ^{125}I -Ат до HbsAg;
4. температура 18-25 °C.

Практичне завдання: Провести лабораторну діагностику гепатиту В:

1. Виконати імунорадіометричний аналіз з метою виявлення поверхневого антигену гепатиту В в сироватці крові людини.
2. Зробити висновок про контамінацію вірусом гепатиту В донорській крові.

Методика постановки імунорадіометричного аналізу HbsAg з використанням радіонукліда ^{125}I :

Перед початком аналізу, витягають з набору реактивів ИРМА-НВsAg – ^{125}I флакони з позитивним і негативним контрольними зразками і пробірки, що витримують при температурі 18-25 °C протягом 30-40 хвилин тому що тест-система зберігалася в холодильнику при температурі 4-6 °C.

Маркують пробірки з розрахунку, що для позитивного контрольного зразка ДО(+) використовується 3 пробірки (N1-3), на негативний контрольний зразок ДО(-) - 7 пробірок (N4-10) і на кожен досліджувану сироватку по 2 пробірки (N 11 і 12). У пробірки, розміщені в штативі, дозатором додають реактиви: ДО(+), ДО(-) і досліджувану сироватку в обсязі 0,1 мол відповідно до схеми представленої в табл. 13.

Розчини з флаконів вносять таким чином, щоб наконечник насадки дозатора доторкався до внутрішньої поверхні стінки пробірки в самого дна. Горизонтального положення рівня рідини на дні домагаються легким постукуванням по пробірках.

Для запобігання висихання реагенту, пробірки закривають поліетиленовою стрічкою з липким чи шаром .

Таблиця 13

Схема постановки імунорадіометричного аналізу НbsAg з використанням радіонукліда ^{125}I

Інгредієнти	Номера контрольних і досвідчених пробірок											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
+ контр. зразок, мол	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- контр. зразок, мол	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
Досліджуваний Біоматеріал, мол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1
Експозиція 12-16 г при t = 18-25 °												
Промивання D_2O , мол (3 рази)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
НbsAg – ^{125}I , мол	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Експозиція 4-6 г при t = 18-25 °												
Промивання D_2O , мол (6 разів)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Вимір активності ^{125}I , хв	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Кількість зареєстрованих мпульсів	506 1	44 97	49 23	5 6 5	5 2 5	4 3 6	4 8 9	4 1 6	4 7 9	51 8	20 52	2793
Облік результату: Наявність HbsAg	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+

поліетиленовою плівкою. Перша експозиція проводиться протягом 12-16 годин при температурі 18-25 °С. Потім, використовуючи водоструминний насос з пасткою для збору рідини, видаляють уміст пробірок. Після цього проводиться промивання, дистильована вода (д₂О) порціями по 1,5 мол трьох разу зі скрупуюльозним видаленням рідини наприкінці кожної серії.

Флакони з реактивом ^{125}I -Аг до HbsAg витримують 30-40 хвилин при температурі 18-25 °С, після витягу з холодильника. При роботі з джерелом м'якого γ -випромінювання повинні дотримуватися правила безпеки (активність препарату знаходиться в межах 85-185 кБк).

У кожну пробірку вносять по 0,1 мол реактиву таким чином, щоб весь реактив горизонтально розподілився дні пробірки. Закривають пробірки поліетиленовою стрічкою з липким чи шаром поліетиленовою плівкою і витримують протягом 4-6 годин при температурі 18-25 °С. По витіканню другої експозиції видаляють реактив із пробірок і промиваються д₂О порціями по 1,5 мол шести разу з добором рідини наприкінці кожної серії. Останню порцію д₂О видаляють найбільше ретельно. За допомогою γ -лічильника вимірюють протягом 1 хвилини активність ^{125}I у кожній пробірці.

Облік і оцінку результатів аналізу починають з визначення кількості фонових імпульсів $N_{\text{ф}}$ регистрируемых лічильником за 1 хв. З цією метою на γ -лічильнику встановлюють режим роботи "Вимір" 5 хв (З) і без внесення радіоактивного зразка і проводять визначення. Тло лічильника ($N_{\text{ф}}$) обчислюють по формулі:

Після цього проводять вимір активності позитивних контрольних зразків у пробірках 1-3. Потім одержують результати активності негативних зразків у пробірках 4-10.

Для підтвердження правильності постановки аналізу обчислюють значення відносини ДО(+)/ДО(-). При цьому відношення повинне бути не менш 5. Якщо отриманий результат відносини відповідає установленій величині, тоді приступають до розрахунку нижньої границі позитивних результатів ($N_{\text{м}}$) для досліджуваних проб.

При інтерпретації отриманих результатів враховують, що якщо кількість зареєстрованих лічильником імпульсів при вимір активності ^{125}I у досліджуваній пробі перевищує величину N_m , то дана біопроба розглядається як утримуюча Hb_sAg .

У правильно експлуатованому кристалічному сцинтиляційному лічильнику тло не повинне перевищувати 100 імп/хв. Високе тло (100 імп/хв чи більше) може виникати з кількох причин:

- 1) неправильне налаштування електричної схеми;
- 2) забруднення кристала ізотопом;
- 3) забруднення гнізда для проб;
- 4) наявність джерела сильного випромінювання, розташованого неподалеку від кристала. Шляху усунення перешкод складаються в багаторазовому промиванні детергентом і етанолом кристала і гнізда й усунення сильного джерела випромінювання від γ -лічильника.

Помилка рахунка радіоактивності зразків приблизно пропорційна квадратному кореню з загального числа імпульсів. Так для 100 імпульсів помилка складає 10 імпульсів, чи 10%.

Розглянемо приклад обробки результатів аналізу. Допустимо кількість фонових імпульсів зареєстрованих γ -лічильником за 5 хвилин склало 490. Тоді використовуючи формулу (1) одержимо, що $N_f = 98$ імп. При вимір активності позитивних контрольних зразків кількість зареєстрованих імпульсів для номерів проб 1, 2, 3 склало відповідно 5061, 4497, 4923. Використовуючи формулу (2) одержуємо середні значення $\text{ДО}(+) = 4729$ імпульсів. При вимірі активності негативних контрольних зразків кількість зареєстрованих імпульсів склало для номерів проб: 4 - 565; 5 - 525; 6 - 436; 7 - 489; 8 - 416; 9 - 479; 10 - 518, використовуючи формулу (3) одержуємо середню величину $\text{ДО}(-) = 392$ імпульсів. Значення відносини $\text{ДО}(+) / \text{ДО}(-) = 4729/392$, склало $\text{ДО}(+) / \text{ДО}(-) = 12,1$, тобто > 5 , що підтверджує правильність постановки досвіду. Нижня границя позитивних результатів визначається за допомогою формули (4).

При підстановки значень у формулу одержуємо результат $N_m = 921$ імпульсів. Таким чином, усі значення зареєстрованих імпульсів при вимір у біопробах перевищуючі величину N_m розглядаються як утримуючі Hb_sAg .

Усі негативні результати, отримані за допомогою набору, є істинно негативними. Серед отриманих позитивних результатів, можливо, будуть представлені і "ложнопозитивні". Ймовірні причини розбіжностей можуть бути зв'язані з:

- забрудненням проб матеріалом позитивних зразків;
- радіоактивне забруднення пробірок;
- недостатнє промивання пробірок з $^{125}\text{I}-\text{Hb}_s\text{Ag}$ після інкубації;

Усі випадки відмінності результатів у дублікатах рекомендується перевіряти ще раз повторною постановкою аналізу. Якщо позитивні результати підтверджуються, то їх варто вважати істинно позитивними, а якщо не підтверджуються - "ложнопозитивні" і розцінювати як негативні.

Матеріали та обладнання

1. Досліджуваний біоматеріал: чи сироватка плазма, що містять вірус.
2. Піпетки на 1 мл із грушами, чи дозатори на 0,1 мл.
3. γ -лічильник для виміру активності радіонукліда ^{125}I .
4. Водострумний насос з пасткою для збору рідини.
5. Стрічка поліетиленова з липким чи шаром плівка поліетиленова.
6. Пробірки пластмасові з іммобілізованими Ат до Hb_sAg .
7. Штатив для пробірок.
8. Вода дистильована.
9. Воскові олівці.

ЗАНЯТТЯ 11. МЕТОД ФЛЮОРЕСЦИРУЮЧИХ АНТИТІЛ (МФА)

Мета заняття: Познайомитися з принципом і використанням методів імунофлуоресценції; опанувати методикою постановки прямої реакції імунофлуоресценції для виявлення *Rickettsia prowazekii*.

Пряма реакція імунофлуоресценції була запропонована А. Кунсом (Coons), Х. Кричем і Р. Джонсом у 1941 р. Надалі Р. Меллорс, Уилер і Кунс описали модифікацію методу - непряму реакцію імунофлуоресценції в 1954 р. Третім основним варіантом реакція імунофлуоресценції (РІФ) є метод сендвича. Варіанти методу РІФ не є кількісними. Д. Парк, Р. Харди і Л. Герценберг розробили проточний цитофлуориметр системи FACS у 1983 р. З його допомогою флуоресціюючі антитіла, зв'язані з поверхнею одиночних кліток, наприклад лімфоцитів, можуть бути визначені кількісним методом. Проточний цитофлуориметр складається з лазерного сортувальника кліток, з'єданого з комп'ютером. РІФ міцно ввійшла в лабораторну практику. Безсумнівними перевагами є простота методу, мала витрата часу і реагентів, висока чутливість і гнучкість аналізу. Для РІФ досить 10^5 мікробних кліток у 1 мол, тоді як для реакції аглютинації 10^7 - 10^8 кл/мол. При діагностиці риккетсиозних захворювань чутливість методу вище традиційних у 100-1000 разів. Метод дозволяє також виявити близько 10^5 молекул антигену при розподіл на клітині радіусом 12 мкм.

Подальший розвиток методу спрямований на приєднання Аг до твердої фази (сефадекс, пластикові поверхні), що дозволяє поліпшити кількісну оцінку методу. І підвищення чутливості методу без посилення неспецифічних реакцій. Наприклад, приєднання Ат до ліпосом (флуоресціюючих часточок).

РІФ широко застосовується при виявленні й ідентифікації:

- бактеріальних інфекцій (шигеллезів, колієнтеритів, черевного тифу, дизентерії, гонорей, сифілісу), хламідіозу, риккетсіозів;
- інфекцій викликаних вірусом грипу, респіраторно-сінцитіальним вірусом, вірусом Епстайна-Барр, цитомегаловірусом;
- зовнішніх структур мікроорганізмів (джгутіків, пілей, капсул);
- ізоантигенних варіантів у популяції соматичних кліток; рецепторів і антигенів тваринних кліток, Т- і В- лімфоцитів;
- злоякісних новотворів на клітинному і тихорецькому рівнях;
- аутоантитіл (антиядерного фактора, антимітохондріального фактора, до щитовидної залози, при пупирчатці і пемфігоїді), аналіз Аг, що викликають утворення аутоантитіл;
- вивчення біосинтезу Ig, транспорту, шляхів проникнення через слизуваті оболонки, противотрепонемних Ат у сироватці крові і спинномозкової рідини, Ат до правцевого анатоксину.

Для реакція імунофлуоресценції характерні недоліки, що полягають у власній флуоресценції бактерій, вірусів, кліток тварин і рослин в УФ і синіх променях, перехресних імунологічних реакціях, неспецифічному фарбуванні матеріалу міченими імунореагентами. Уникнути помилкових результатів

удається шляхом постановки відповідних контролів, адсорбції гомогенатом органів, заморожування і відтавання, промивання і цілого ряду інших методик

Принцип методу. Метод ґрунтується на візуальному спостереженні реакції антиген – антитіло, шляхом маркірування одного з двох компонентів флуорохромом без зміни його імунологічних властивостей. Реакцію відзначають, використовуючи флуоресцентний мікроскопом. Не зв'язалася мічену сироватку видаляють промиванням. У якості мітки застосовують флуоресцеїнізотіоціанат (ФІТЦ) - зелене світіння (520 нм) в УФ - світлі і тетраметілродамінізотіоціанат (ТРИТЦ) – оранжево-червоне світіння. Мічені антитіла повинні володіти фізико-хімічної гомогенністю, тому найбільше часто використовують моноклональні антитіла. Іg чи баранів кози офарблюються більш інтенсивно, чим кролячі, тому їх мітять ФІТЦ (1 молекула Іg приєднує 2-5 молекул барвника), а білки кролика – ТРИТЦ (1 молекула зв'язується з молекулою Іg). Застосування методу дозволяє установити наявність антигену і знайти антитіла. У залежності від умов експерименту розрізняють наступні варіанти постановки РИФ:

Пряма реакція імунофлуоресценції ґрунтується на взаємодії антитіл, мічених флуорохромом, з гомологічним антигеном, локалізованим у чи клітці на клітці, зрізах тканин, мікробах і вірусах (рис.5). Використання антисироваток (суміш анти-Іg і анти-Іg), з'єднаних із флуорохромами (ФІТЦ і ТРИТЦ) при різних довжинах хвиль, можна одночасно на тому самому препараті виявляти 2 різних

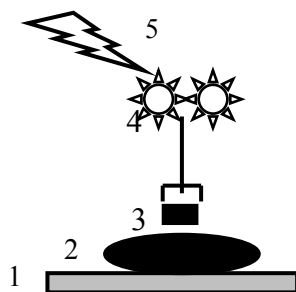


Рис.5. Принцип прямої реакції імунофлуоресценції:

предметне скло (1); мікроорганізм (2); Про-антиген (3); мічене флуоресцеїном антитіло (4); УФ-промінь (5).

антигену. Метод досить простий, однак вимагає мічення антитіл, специфічних до кожного нового антигену. Широке поширення одержало також маркірування антитіл біотином і наступне виявлення їх за допомогою флуоресцентно міченого авідіна.

Метод гальмування флуоресценції, заснований на конкурентному зв'язуванні антигену немаркованими і маркованими флуорохромом антитілами, що обумовлює зменшення флуоресценції в залежності від концентрації.

Непряма реакція імунофлуоресценції, ґрунтується на тім, що спочатку одержують антитіла першого порядку (Ат1), при імунізації антигеном, наприклад кроликів. У той же час повчають антитіла проти імуноглобулінів кроликів, при імунізації ними барана (Ат2). Антитіла другого порядку (Ат2) – мітять флуорохромом і одержують імунореагенти, за допомогою яких можна виявити локалізацію і кількість кролячих Ат1, що зв'язалися з гомологічним антигеном (рис.6).

Метод дозволяє використовувати обмежений набір мічених антисироваток. Наприклад, кролячі Ат1 різних специфічностей можна визначати за допомогою мічених флуорохромом Ат2 до імуноглобулінів кролика. З одним Ат1 може одночасно зв'язатися трохи мічених Ат2, що забезпечує більш інтенсивне світіння. Максимальне молярне співвідношення Ат1 до Ат2 – від 1:4 до 1:12.

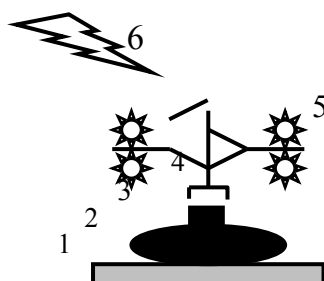


Рис.6. Принцип непрямой реакції імунофлуоресценції:

предметне скло (1); мікроорганізм (2); Про-антиген (3); немічене антитіло Ат1 (4); мічене флуоресцеїном анти-Ig Ат2 (5); Уф- промінь (6).

Застосування кон'югатів антисироваток до індивідуальних важких ланцюгів Ig, дозволяє напівкількісно оцінити розподіл антитіл по класах і підкласам. Метод найбільш адекватний при визначення наявності Ат (Ig, Ig і Ig) до протеїнів вірусу Епштайна-Барр.

- Непрямий метод гаптенізованих антитіл, ґрунтується на тім, що до молекул Ат1 (антиаллотипичної чи іншої специфічності) ковалентно приєднують трохи гаптенних угруповань (рис.14). Після приєднання специфічність і активність антитіл не змінюється. Гаптенні залишки кон'югують з антитілом, що не має загальних антигенних детермінант з Ат1. Потім проводять імунізацію тварин і одержують антитіла до гаптенних епітопів, що маркують флуорохромом (ФІТЦ чи ТРИТЦ) і використовують у якості Ат2.

За допомогою методу можна виявити антигени двох специфічностей на одній клітці. У лабораторній практиці використовується для дослідження рецепторів і аллоантигенів лімфоцитів, наприклад диференцировочних Ia, H-2K^K, Thy-1,2 аллоантигенов мишачих лімфоцитів.

- Непряма антикомплементарна реакція імуофлуоресценції, ґрунтується на індикації зв'язування комплементу. Для проведення реакції антиген обробляють імунною сироваткою і компліментом морської свинки. Потім промивають і наносять антикомплементарну сироватку, мічену ФІТЦ. Використовуючи люмінесцентний мікроскоп, відзначають пофарбований у жовто-зелений чи насичено-зелений колір імунний комплекс із комплементом. Труднощі, зв'язані з одержанням антикомплементарної сироватки і її мечення обмежують використання цього методу. Метод розроблений на моделі риккетсий Гольдвассером і Шепардом у 1958 р.

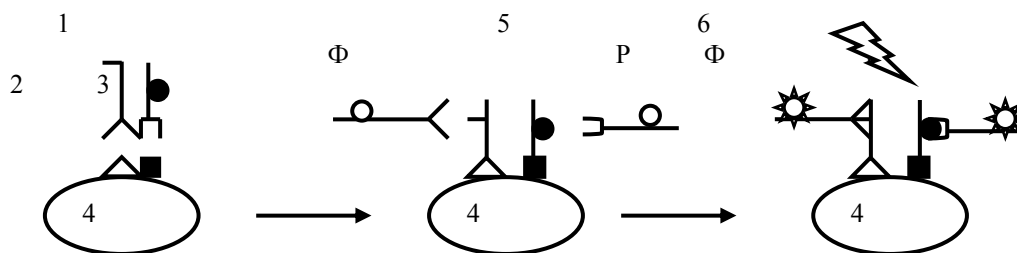


Рис. 7. Принцип непрямого методу гаптенизованих антитіл: гаптенизовані антитіла At1 (1); поверхневі антигени клітини (2 і 3); В-клітина (4); вторинні антитіла At2 (5), мічені ФІТЦ (Ф) чи ТРИТЦ (Р); УФ-лучи (6)

- FTA-200 чи тест флуоресцентний тест виявлення антитіл проти *Treponema pallidum*. Убиті і фіксовані на носії трепонеми інкубують із сироваткою хворого, а потім з маркірованим антигамаглобуліном. Результат оцінюють за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

Чутливість непрямої реакції імуофлуоресценції ще більш підвищується при використанні третіх антитіл. Однак якщо збільшується чутливість, то зменшується специфічність, і тому потрібно ретельна постановка контролів. Непрямі методики більш трудомісткі, вимагають більше часу і більшої кількості контрольних експериментів.

Метод сендвича розроблений для виявлення специфічних антитіл, наприклад, до полісахариду пневмококів (Рис. 8)

предметное стекло (1);
 плазматическая клетка (2); немеченое
 антитело (3);
 антиген (4); меченное
 флуоресцеином
 антиімунглобуліни (5);
 УФ-промінь (6).

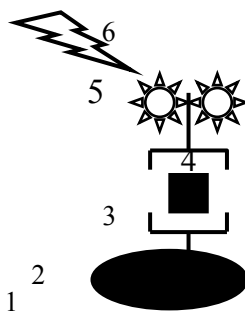


Рис. 8 Принцип методу сендвич

Молекули антигену розташовуються між антитілами, утвореними в клітках, і тими, котрі додані як другий шар. Антитіла другого шару мічені флуоресцеином.

Умови проведення прямої реакції імунофлуоресценції:

- 1) досліджуваний біоматеріал з підозрою на зміст риккетсій;
- 2) люмінесціюючи антитіла до *Rickettsia prowazekii*;
- 3) температура 18-25 °C;

Практичне завдання: Провести лабораторну діагностику риккетсій - виявити *Rickettsia prowazekii* прямим методом імунофлуоресценції у рідкому матеріалі (суспензії).

Методика постановки прямої реакції імунофлуоресценції:

Діагностикум рикетсіозний Провачека являє собою ліофілізовані риккетсії Провачека, інактивовані формаліном і очищені методом диференціального центрифугування в сполученні з ефірною обробкою. У день постановки РІФ діагностикум розчиняють у 2 мол 0,9% розчину NaCl. Час розчинення не повинний перевищувати 2 хвилини.

Мазки для дослідження готують на ретельно знежирених предметних стеклах. Рідкий матеріал (суспензію діагностикума) наносять на скло у виді краплі і розподіляють тонким рівним шаром. Після висушування на повітрі всі препарати фіксують протягом 15-20 хвилин етиловим спиртом 96^{про} і потім промивають водопровідною водою.

Приготовлені препарати офарблюють флуоресціюючими антитілами. У виді пофарбованої таблетки Ig укладені в ампулу. Вони являють собою висушену ліофільним способом глобулинову фракцію імунної сироватки, до якої хімічним шляхом приєднаний флуоресціюючий барвник (ФІТЦ).

Перед використанням сухі люм-антитіла розчиняють у 0,5 мол дистильованої води, а потім розводять 0,9% NaCl (р 7,2-7,4) до робочого розведення. Тому що робоче розведення може відрізнятись від зазначеного в паспорті, рекомендується визначити барвний титр заздалегідь. За барвний титр сироватки приймають те максимальне розведення, що ще забезпечує

флуоресцентне фарбування препарату з яскравістю на 3-4 хреста (критерій обліку дивися нижче). Робоче розведення в 2 рази менше барвного титру. Для визначення барвного титру і робочого розведення, оброблені мазки поміщають у вологу камеру, а потім пастерівською піпеткою наносять на них краплі флуоресціюючої сироватки в різних розведеннях. Час фарбування повинен бути відпрацьований експериментально, при фарбування мікроорганізмів звичайно застосовують 15 хвилинну експозицію у вологій камері. Після цього мазки ретельно тричі промивають розчином фізіологічного розчину по 10 чи хвилин проточною водопровідною водою і підсушують на повітрі. На мазок наносять краплю суміші (9 частин гліцерину + 1 частина 0,9% NaCl) і покривають покривним склом.

Наприклад, якщо паспортне значення титру антитіл складає 1:32, тоді готують ряд розведень 1:16; 1:8; 1:4; 1:2. У ході аналізу було встановлено, що інтенсивність флуоресценції на 4 плюси зареєстрований для барвного титру 1:8, тоді робоче розведення складає в цьому випадку 1:4. Розчин робочого розведення флуоресцентної сироватки можна зберігати при температурі +2 °C - +6 °C протягом 2-х тижнів.

Обов'язковою умовою є наявність трьох контролів. Обробляються флуоресціюючими антитілами суспензії:

- 1) гомологічних бактерій: “+” контроль;
- 2) гетерологічної культури: “-” контроль;
- 3) незараженого матеріалу: “-” контроль.

Облік і оцінку результатів аналізу починають з перегляду препаратів у падаючому світлі. Для цього використовують флуоресцентні мікроскопи будь-яких систем з порушенням світіння в синьо-фіолетовою область спектра. Для одержання яскравого світіння рикетсій необхідно ретельно центрувати освітлювальну систему мікроскопа і підібрати відповідні фільтри. При роботі на люмінесцентному мікроскопі (МЛ-2) використовують фільтри: ФС-1-2; СС-15-2; Б-С-82. Замикаючий фільтр Т-2-Н; об'єктив 90^x, апертура 1,25; окуляр 10^x, сила струму при мікроскопії 4,5А.

На предметне скло фіксованого препарату наносять краплю високоякісного не флуоресціюючого імерсійного чи олії х.ч. діметілфталат.

У позитивних випадках *Rickettsia prowazekii* мають чітке жовто-зелене світіння, що може локалізуватися по периферії клітини на темному тлі препарату.

При роботі з досліджуваними суспензіями необхідно мати як контроль мазок з корпускулярного антигену *Rickettsia prowazekii*, оброблений розведенням флуоресціюючих рикетсіозних антитіл.

Інтенсивність світіння оцінюють з використанням чотири хрестової системи:

“++++” – дуже яскрава флуоресценція по периферії мікробної клітки, чітко контрастує з тілом клітки,

“+++” – яскрава флуоресціююча периферія клітки,

“++” – слабке світіння периферії клітки,

“+” – дуже слабке світіння периферії клітки,

“–” – флуоресценція кліток відсутня.

Позитивними можуть вважатися препарати зі світінням рикетсій не нижче чим на “++”. Для підтвердження отриманих результатів препарати переглядають методом фазово-контрастної мікроскопії.

Найбільше що часто зустрічаються варіанти помилок наступні:

- довго зберігався кон'югат утворить випадання по всьому субстраті.
- при недоліку чи рідини при її випар з камери спостерігається крайовий ефект.
- Підсушування сироваток чи кон'югата викликає неспецифічну флуоресценцію.
- при роботі з іншими флуорохромами в лабораторії можливе забруднення препарату.
- використання при мікроскопії різних об'єктивів приводить до суб'єктивного сприйняття інтенсивності флуоресценції зв'язане з різною апертурою об'єктивів.
- суміші антитіл до різних антигенів препарату приводить до перекручувань у зв'язку з взаємним впливом антитіл.

Матеріали та обладнання

1. Диагностикум рикетсиозний Провачека корпускулярний сухий.
2. Піпетки на 1 мол із грушами, чи дозатори на 0,1 мол.
3. Фізіологічний розчин.
4. Люмінесціюючі антитіла до *Rickettsia prowazekii*.
5. Дистильована вода.
6. Пробірки.
7. Предметні стекла.
8. Водопровідна вода.
9. Етиловий спирт 96°.
10. Волога камера.
11. Покривні стекла.
12. Гліцерин.
13. Люмінесцентний мікроскоп (МЛ-2).
14. Не флуоресціююча чи олія х.ч. діметілфталат.

ЗАНЯТТЯ 12. ІМУНОЕЛЕКТРОФОРЕЗ

Мета заняття: Ознайомитися з принципом, основними модифікаціями й областю застосування імуноелектрофоретичних методів, освоїти методику проведення імуноелектрофореза.

Електрофорез - це переміщення заряджених часток у розчиннику під впливом електричного поля. Найбільше застосування знайшли три типи електрофореза:

1) з рухливою границею; 2) зональний; 3) стаціонарний чи рівноважний.

Імуноелектрофоретичні методи сполучають електрофорез з наступної імунодифузії у гелі, що дає можливість розрізнити подібні по електрофоретичній рухливості молекули за допомогою специфічної реакції преципітації між антигеном і відповідним антитілом.

Метод імуноелектрофореза (ІЕФ) створений П. Грабаром і К. Вільямсом у 1953р. Пізніше були розроблені різні варіанти і модифікації цього методу, чотири з яких одержали широке поширення: 1) імуноелектрофорез; 2) ракетний ІЕФ; 3) перехресний ІЕФ; 4) зустрічний ІЕФ.

Застосування методу. ІЕФ у першу чергу являє собою якісний метод дослідження антигенів і специфічності антитіл.

I. *Антигени.* Метод застосовується для: 1) визначення антигенного складу складних фізіологічних сумішей молекул, наприклад сироватки крові; 2) визначення природи домішок при очищенні антигенів; 3) аналізу гетерогенності і гомогенності індивідуальних антигенів, клінічного аналізу парапротеїнів; 4) імунохімічного аналізу широкого спектра білків; 5) дослідження антигенів інфекційних агентів, ракових антигенів, білків плазми й інших фізіологічних рідин людини і тварин; 6) первинного скринінгу при дослідженні недостатності імуноглобулінів і комплементу; 7) контролю імунних препаратів.

II. *Антитіла.* Звичайний тест на визначення специфічності антисироваток.

Як контроль ефективно антисироватки проти сумарного пула сироваткових білків.

Принцип методу. ІЕФ виконують у два етапи. Спочатку суміш антигенів розділяють електрофорезом у якому-небудь носії. Потім паралельно осі переміщення антигенів у тонкій пластинці носія вирізують жолобок і вносять у нього гомологічну антисироватку. Антитіла дифундують через пластинку носія латерально, і в той же самий час відбувається радіальна дифузія антигенних компонентів від місць їхньої локалізації в носії. Таким чином, антигени й антитіла мігрують у порах носія назустріч один одному і, з'єднуючись у зонах еквівалентності концентрацій, утворюють видимі дугоподібно скривлені преципітинові лінії, кількість, положення і форма яких дають сміть про кількісний і якісний склад вихідної суміші антигенів. Переважніше проводити ІЕФ на агарі, однак можна використовувати як носіїв також агарозу, ацетат целюлози, крохмальний і поліакриламідному гелі (рис.1)

Ракетний ІЕФ дозволяє швидко оцінити концентрацію індивідуального антигену в реакції з моноспецифічною антисироваткою. Антигени елетрофоретично мігрують з лунок, розташованих у підстави гелю, в агарозу, що містить нерухомі специфічні антитіла. В міру зв'язування антитіл мігруючим антигеном утворюються загострені дуги преципітації-ракети, висота яких пропорційна концентрації антигену. Метод дозволяє оцінити чистоту мігруючого антигену в реакції з поліспецифічною антисироваткою або підтвердити моноспецифічність антисироватки, використовуючи суміші антигенів.

Перехресний ІЕФ сполучає в собі елетрофоретичний поділ антигенів в одному напрямку на першій стадії і принцип ракетного ІЕФ в іншому напрямку (під кутом 90 градусів) на другій стадії. Розділені антигени мігрують в агарозу з поліспецифічними антитілами й утворюють візерунок з ракет-преципітатів. Метод має велике аналітичне значення для дослідження складу антигенів і, крім того, має деякі риси кількісних підходів.

Зустрічний ІЕФ— чуттєвий і швидкий метод визначення як антигенів, так і антитіл. Деякі антигени, знаходячись у гелі з високими ендосмотичними властивостями, здатні швидко мігрувати до анода назустріч антитілам, що переміщуються з протилежної лунки до катода. Використання цього явища дозволяє швидко одержати лінії преципітації між лунками з антигенами й антитілами за умови, що вони внесені у відповідних пропорціях. Метод широко застосовується для виявлення інфекційних антигенів у фізіологічних рідинах (наприклад, антигенів вірусу гепатиту В), змін концентрацій сироваткових білків (наприклад, α -фетопроतेїна), а також для тестування цілого ряду антитіл. Чутливість методу досягає 400нг/мол.

Практичне завдання

1)Провести імуноелектрофорез сумарних білків сироватки крові, Ig G і Ig M людини.

2) Визначити кількість виявлених антигенів у сироватці крові людини, приналежність їхній до визначеного класу.

3) Проаналізувати чистоту отриманих препаратів Ig G і Ig M.

Методика проведення імуноелектрофорезу

- Підготувати прилад для імуноелектрофорезу й установити його строго горизонтально. Закрити щілини між відсіками для агарових блоків і відсіками для електродних буферних розчинів.
- Приготувати необхідний обсяг 1,5% суспензії агару або 1,2% суспензії агарози у веронал-медіналовом буферному розчині (0,025 моль/л, р 8,6) і розплавити його на киплячій водяній лазні.
- Після зниження температури розчину до 50^{оc} внести його в агарові відсіки невеликими порціями. Електродні відсіки заповнити веронал-медіналовим буфером до висоти агарових блоків.

- Приготувати 50 мл 1,5% суспензії агару і розплавити полісахарід на водяній лазні. Остудити розчин до 50^oC. По краях двох чистих знежирених стекол (9x12) провести суцільні лінії. Скла розігріти над полум'ям спиртівки, помістити на горизонтальну поверхню і внести нагрітою мірною піпеткою на обкреслені площі до 15 мл розплавленого агару. Кінцем піпетки швидко розподілити агар рівним шаром по поверхні пластинок.
- Скляні пластинки з гелем покласти на паперовий трафарет (мал.2), пробійником вирізувати в гелі блоки діаметром 3мм, а спеціальним ножа-смужки довжиною 8-9 і шириною 1,5мм. Пронумерувати лунки і канавки зі зворотної сторони пластинок.
- Пластинки з гелем установити горизонтально в прилад для імуноелектрофореза. Останнім розплавленим і охолодженою до 50^oC агаром швидко з'єднати пластинки гелю з агаровими блоками. Розчин не повинний розтікатися по поверхні гелевих пластинок і підтікати в щіліні.
- Внести мікрошприцом у лунки А та У сироватку крові людини, а в лунки Б і Г-препарати виділених раніше імуноглобулінів класів G і M відповідно. Після внесення кожного реагенту шприц ретельно промивати. Для контролю за електрофоретичним фронтом руху заряджених антигенів до зразка додати 0,005% бромфенолового синього.
- Герметично закрити прилад, підключити до джерела постійного струму і провести електрофорез при напрузі 120-200В в плин 45-60хв.
- Відключити джерело харчування і перерізати агарові містки скальпелем. Скляні пластинки акуратно вийняти з приладу й установити на горизонтальну поверхню. Шприцом внести в канавки 2 і 5 однакові кількості полівалентної сироватки проти білків крові людини, у канавки 1, 3 і 4, 6—анти-Ig- і анти-Ig- сироватки відповідно. Пластинки установити горизонтально у вологу камеру ексикатора і інкубувати протягом 48 годин.
- Вийняти пластинки з ексикатора, розглянути і замалювати імуноелектрофореграми. Зробити висновки про кількість виявлених антигенів у сироватці крові людини, приналежності їхній до визначеного класу, чистоті отриманих препаратів, їхньому сумарному електричному заряді, електрофоретичної рухливості і про гетерогенність популяцій цих імуноглобулінів по ізоелектричних крапках.

Матеріали й устаткування

- 1.Сироватка людини, препарати IgG і IgM.
- 2.Препарати полівалентної сироватки проти білків крові людини і моноспецифічних сироваток проти Ig G і 3.Ig M людини.
- 4.Веронал-мединаловий буферний розчин (0,025 моль/л, рН 8,6).
- 5.Агар Діфко чи агароза.
- 6.Дистильована вода, азид натрію.
- 7.Скляні пластинки 9x12 див.

8. Мірні циліндри 100 і 500мол; мірні піпетки 1, 5, 10мол; піпетка Пастера.
9. Скляна паличка, препарувальна голка, мікрошприц 50-100мкл.
10. Ексикатор. Пробійники. Спеціальний ніж для вирізання канавок у гелі.
11. Прилад для імуноелектрофореза.
12. Джерело постійного струму (100 ма, 200В).
13. рН- метр.
14. Холодильник. Водяна лазня.

ЗАНЯТТЯ 13. МЕТОДИ ПЕРВИННОЇ ОЦІНКИ ІМУННОГО СТАТУСУ ЛЮДИНИ

Мета заняття: Ознайомитися методами первинної оцінки імунного статусу людини.

В теперішній час є переконливі дані про важливе значення порушень в імунній системі як для розвитку системних захворювань (неврологічна, ендокринологічна, онкологічна патологія, біодеградація системи з'єднуючої тканини), так і для ураження органів і тканин різного генезу (травми, опіки, інфекція). Імунодефіцитні стани організму (успадковані і набуті) ускладнюють тяжкість клінічного протікання патологічних процесів і значно погіршують прогноз захворювання. Для підбору оптимального методу лікування, контролю ефективності лікувальних заходів, обґрунтування проведення специфічного медикаментозного впливу на імунну систему організму необхідно застосування методів прискореної діагностики характеру порушень у стані імунологічної реактивності організму.

Своєчасно проведена імунодіагностика і адекватна імунокорекція виявлених порушень імунологічного статусу організму сприяє підвищенню ефективності лікування, попередженню рецидивування і хронізації патологічних процесів і таким чином визначають успішність вилікування та реабілітації хворих.

Застосування тестів первинного імунологічного обстеження, розроблених у лабораторії імунології Науково-дослідного інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. Філатова, дозволяє виявити грубі порушення у стані основних ланок імунітету (Т- і В- систем імунітету і фагоцитарну ланку) і виявляти людей з набутими і вродженими імунодефіцитами, що потребують проведення більш поглибленої специфічної імунодіагностики і призначення відповідного імунокорегуючого лікування. Проведення масових імунологічних досліджень в екологічно небезпечних зонах дозволяє виявити групи ризику для виникнення патології різного профілю і своєчасно здійснювати заходи по її профілактиці. Системний підхід до оцінки усього комплексу показників первинного імунологічного обстеження дає можливість проводити диференціальну діагностику і прогнозування протікання патологічних процесів, а також визначати ефективність комплексного лікування.

Методи первинної оцінки імунологічного статусу людини, з якими студенти знайомляться на практичних заняттях, можуть бути використані для :

1. динамічного контролю змін в імунній системі в процесі протікання різноманітних захворювань;
2. складання "імунного паспорту" людей;
3. виявлення людей з вродженими і набутими (наприклад, СНІД) імунодефіцитами;

4. виявлення імунологічної недостатності в періоди вікової перебудови організму (діти до 3-х років, ювенільний і похилий вік) з метою створення запобіжних умов життя і призначення імунокорегуючої терапії;
5. боротьби із сформованою імунологічною недостатністю, що полягає у призначенні імуномодуляторів під контролем імунологічного статусу.

Практичне завдання Провести оцінку імунного статусу людини по клітинним і гуморальним показникам неспецифікованої і специфікованої імунорезистентності:

А) Визначити фагоцитарну активність нейтрофілів периферичної крові людини.

1. Взяти кров для визначення показників клітинного імунітету і лізувати еритроцити.
2. Відмити пекарські дріжджі і приготувати 0.1 суспензію.
3. Поставити реакцію Д-фагоцитозу нейтрофілів.
4. Приготувати мазки-препарати Д-фагоцитуючих нейтрофілів, зафіксувати і забарвити гемотоксилін-еозином.
5. Розглянути препарати під мікроскопом. Визначити кількість Д-фагоцитуючих нейтрофілів.

Б) Визначити кількість Т- і В- лимфоцитів в периферичній крові людини методом спонтанного розеткоутворення.

1. Взяти кров для визначення показників клітинного імунітету і провести лізіс еритроцитів.
2. Відмити еритроцити миші та барана. Приготувати 0,1% суспензію еритроцитів миші та 0,1% суспензію еритроцитів барана.
3. Поставити реакції Е- та М- розеткоутворення.
4. Приготувати мазки-препарати розеткоутворюючих лимфоцитів, зафіксувати, забарвити гематоксилін –еозином.
5. Розглянути препарати під мікроскопом, визначити абсолютний вміст Е-РУЛ і М- РУЛ в 1 мкл периферичної крові.

В) Визначити абсолютний вміст поліморфно-ядерних лейкоцитів і лімфоцитів в периферичній крові людини.

Г) Визначити концентрацію імуноглобулінів класів М, G, А в сироватці крові людей в реакції преципітації по Манчїні.

1. Приготувати агаровий гель на веронал-медіналовому буфері.
2. Приготувати розведення моноспецифічних і стандартно-еталонної сироваток.
3. Поставити реакцію Манчїні.

4. Описати результат реакції Манчіні, побудувати калібрувальну криву і визначити рівень імуноглобулінів основних класів в досліджуваній сироватці крові людини.

Д) Визначити титр комплементу в сироватці крові людини.

Практичне завдання:

1. Приготувати 3 % суспензію еритроцитів барана.
2. Приготувати розведення гемолітичної сироватки і визначити її титр.
3. Приготувати гемсистему.
4. Поставити реакцію і визначити титр комплементу в досліджуваній сироватці крові

Методи постановки реакцій

1. Визначення абсолютного вмісту поліморфно-ядерних лейкоцитів і лімфоцитів в периферичній крові людини.

1.1. Відбір крові і підготовка матеріалу для дослідження.

Кров беруть з пальця будь-якої руки. Подушечку пальця обробляють ватним тампоном, після чого проколюють стерильним одноразовим скарифікатором.

1.1.1. Відбір крові для визначення показників клітинного імунітету і лізис еритроцитів.

В стерильну пластмасову трубочку, яка служить одноразовим наконечником автоматичної піпетки, 0,04 мл крові з пальця і швидко переносять її в лунку планшету, що містить 1,8 мл дистильованої води і ретельно перемішують. Через 60 секунд в лунку планшету доливають 0,2 мл розчину Хенкса 10-разової концентрації. Після закінчення забору і лізису партії крові планшет щільно закривають кришкою з м'якою поролоновою прокладкою. Одержана суспензія клітин крові може зберігатися в планшетах до 2,5 годин.

1.1.2. Відбір крові для визначення вмісту імуноглобулінів.

В стерильну пластмасову трубочку, оброблену гепарином і з'єднану з кінцем медичної очної піпетки, набирають 0,1 – 0,15 мл крові з пальця, після чого трубочку ставлять в планшет-штатив, дно якого вкрито пластичним матеріалом – пластиліном так, щоб її нижній кінець увійшов в пластичний матеріал. Після закінчення забору крові планшет-штатив накривають кришкою.

1.2. Визначення вмісту лімфоцитів і лейкоцитів в крові.

Суспензію, одержану в результаті з'єднання 0,010 мл крові і 0,1 мл 10%-го розчину оцтової кислоти в процесі забору крові (див п. 1. 1. 2) ретельно перемішують наконечником піпетки і наповнюють нею камеру Горяєва. Підраховують кількість лімфоцитів і лейкоцитів (клітини крові чітко

розрізняються за формою ядра (в 20 великих квадрантах з застосуванням об'єктиву x40)

Абсолютний вміст клітин в 1 мкл крові визначається за формулами:

$$\text{Лей} = \frac{K \cdot x \cdot a}{1000},$$

де Лей – вміст лейкоцитів в крові, тис./мкл,
а – кількість лейкоцитів, знайдених у 20 великих квадратах Горяєва.

$$\text{Лі} = \frac{K \cdot x \cdot б}{1000},$$

де Лі – вміст лімфоцитів в крові, тис./мкл
б – кількість лімфоцитів, знайдених в 20 великих квадратах камери Горяєва.

К – коефіцієнт перерахунку: тут К= 169.

1.3. Визначення комплексу показників розеткоутворення і фагоцитозу.

1.3. 1. Приготування суспензії лейкоцитів.

Лейкоцити, що містяться у суспензії, одержаній в результаті лізису еритроцитів в процесі забору крові (див. п. 1. 1. 1), осаджують центрифугуванням планшета при 2 000 об/хв. протягом хвилин. Надосадову рідину зливають з планшета. До одержаного осаду лейкоцитів доливають 0,2 мл середовища 199 і одержують суспензію лейкоцитів, яку використовують для постановки комплексу тестів розеткоутворення і фагоцитозу.

1. 3. 2. Постановка реакції розеткоутворення і фагоцитозу.

Реакції розеткоутворення і фагоцитозу ставлять в 96-луночних планшетах для імунологічних реакцій одноразового використання, що мають лунки об'ємом 0,2 мл з круглим дном. Для герметизації в кришку планшета вкладають поліетиленову прокладку, що її вирізають з упаковки планшета. Кришку закріплюють на планшеті за допомогою резинки.

1.3. 2. 1. Е-розеткоутворення (Т-лімфоцити).

В лунку планшета заливають 0,05 мл одержаної суспензії лейкоцитів. Приливають 0,05 мл 0,1 % -ної суспензії еритроцитів барана. Центрифугують при 2000 об/хвил. впродовж 5 хвилин, потім інкубують при +4 °С протягом 30 хвилин. (10 мл NaCl + 0,001 мл крові барана).

1.3. 2. 1. М-розеткоутворення (В-лімфоцити).

Тест М-розеткоутворення ставлять так само, як тест Е-розеткоутворення, тільки замість суспензії еритроцитів барана додають 0,05 мл 0,1 % -ї суспензії еритроцитів миші (10 мл NaCl + 0,001 мл крові миші).

1.3. 2. 3. Д-фагоцитоз нейтрофілів.

Тест Д-фагоцитозу нейтрофілів ставлять так само, як тест Е-розеткоутворення, тільки замість суспензії еритроцитів барана додають 0,05 мл 0,001 % -ї суспензії клітин пекарських дріжджів, вбитих нагріванням.

1.3. 2. 4. Е-розеткоутворення після інкубації клітин з теофіліном (теофілін - резистентні Е-розеткоутворюючі лімфоцити – субпопуляція, збагачена клітинами , що мають хелперну активність).

В лунку планшета заливають 0,05 мл одержаної суспензії клітин, доливають 0,05 мл 0,01 м розчину еуфіліну (теофіліну) в середовищі 199.

Інкубують при 37°C протягом 30 хвилин. Далі доливають 0,05 мл 0,001% суспензії еритроцитів барана і ставлять реакцію Е-розеткоутворення (див. п. 1. 3. 2. 1.).

1.3. 3. Фіксація і приготування мазків.

Після інкубації осаду при +4 +10°C (див. п. 1. 3. 2.) в лунки обережно , так, щоб не пошкодити осаду, додають 0,02 мл фіксатору , приготованого на основі глутарового альдегіду. Утримують при кімнатній температурі впродовж 5 хвилин. Після цього надосадову рідину видаляють одночасно з усіх лунок планшету швидким інтенсивним струшуванням. Потім в кожну лунку негайно заливають по 0,005 мл дистильованої води. Осад ресуспендують в процесі приготування мазків. Мазки готують на предметному склі у вигляді краплі, що займає квадрат розміром 9x9 мм. (Барвник - гематоксилін).

1. 3. 4. Приготування препаратів.

Висушені мазки фіксують у 96° спирті протягом 10 хвилин (або абсолютному етанолі 20 хвилин). Потім занурюють у розчин гематоксиліну. Через 10 хвилин мазки виймають, ополіскують водою і сушать.

1.3. 5. Підрахунок кількості розеткоутворюючих і фагоцитуючих клітин.

В препаратах перераховують кількість розеткоутворюючих лімфоцитів на 50 лімфоцитів і кількість фагоцитуючих нейтрофілів на 50 нейтрофілів з використанням об'єктиву x40, при правильному налаштуванні світла в мікроскопі по Келеру. Можна додатково підраховувати в цих препаратах кількість розеткоутворюючих нейтрофілів (див. вступ).

Розеткоутворюючою клітиною вважати таку, до якої прикріпилося 3 і більше еритроцитів. Фагоцитуючою клітиною вважати нейтрофіл, що захопив 1 або більше дріжджових клітин. Підраховують % розеткоутворюючих і фагоцитуючих клітин.

1.3. 6. Визначення абсолютного вмісту розеткоутворюючих клітин в 1 мкл крові.

$$E\text{-PUL тис/мкл} = \frac{Лі \text{ тис/мкл} \times E\text{-PUL} \%}{100\%}$$

$$M\text{-PUL тис/мкл} = \frac{Лі \text{ тис/мкл} \times M\text{-PUL} \%}{100\%},$$

де E-PUL – E -розеткоутворюючі лімфоцити, відповідно тис/мкл, % ;

M-PUL – M -розеткоутворюючі лімфоцити, відповідно тис/мкл, % ;

Лі – вміст лімфоцитів в крові, тис/мкл (див. п. 1. 2).

1.3. 7. Визначення кількості теофілін-чутливих E-PUL.

$$E_{\text{тф-ч}}\text{-PUL} = E\text{-PUL} - E_{\text{тф-р}}\text{-PUL}, \quad \text{де}$$

E-PUL – кількість розеткоутворюючих лімфоцитів (спонтанних), % (див. п. 1. 3. 2. 1.);

$E_{\text{тф-р}}$ -РУЛ – кількість теофілін-резистентних Е-РУЛ (див. п. 1. 3. 2. 4.) субпопуляція, збагачена клітинами з хелперною активністю;
 $E_{\text{тф-ч}}$ -РУЛ – кількість теофілін-чутливих Е-РУЛ, % - субпопуляція, збагачена клітинами з супресорною активністю.

1.4. Визначення вмісту імуноглобулінів.

Імуноглобуліни класів А, М, С – визначають в плазмі крові методом радіальної імунодифузії у гелі в модифікації методу Манчіні.

1.4. 1. Одержання плазми.

Планшет-штатив, що містить пласмасові трубочки із зразками крові (див. п. 1. 1. 3), центрифугують при 2000 об/хв. 10 хвилин. Верхню частину трубочки, що містить плазму, зрізають і переносять в інший аналогічний штатив в тому ж порядку. Одержану плазму можна довгостроково зберігати у замороженому стані. Перед постановкою реакції плазму розморожують і переносять в лунки планшету, де розводять фізіологічним розчином у 3 рази (співвідношення плазма – фізрозчин 1: 2).

1.4. 2. Приготування пластин, вкритих шаром агару.

На кришку 96-луночного планшета, що розміщена на нагрівальній підставці (температура 50°C) у суворо горизонтальному положенні, наливають 16 мл агару, що містить моноспецифічну сироватку до імуноглобулінів певного класу. Після охолодження на кришці одержують рівний шар гелю. В цьому шарі пробійником вирізають лунки діаметром 2 мм у відповідності з розміром лунок стандартного 96-лунокового планшету. Таким чином, на пластині одержують 96 лунок.

1.4. 3. Постановка реакції.

В лунки першого ряду пластини, вкритої шаром гелю, вносять стандартну сироватку: нерозведену і в розведеннях 1: 2, 1: 4, 1: 8 в такій кількості, щоб вона заповнювала лунку до рівня агару (орієнтовно 3-4 мкл). Лунки решти рядів заповнюють зразками досліджуваної плазми в розведенні 1: 2 (див. п. 1. 4. 1). Далі пластини інкубують при 37°C у вологій камері для визначення рівня IgG протягом 4-6 годин, IgA - протягом 12-24 годин, IgM - протягом 24-28 годин. Інкубацію припиняють тоді, коли розміри кілець преципітації будуть достатні для вимірювання діаметрів. Для створення вологої камери використовують герметично закритий ексикатор, на дно якого кладуть використаний 96-луноковий планшет з лунками, заповненими водою.

1.4. 4. Урахування результатів.

По закінченні інкубації на пластині вимірюють діаметри кілець преципітації.

1.4. 5. Побудова калібрувальної кривої і визначення вмісту імуноглобулінів.

Вміст імуноглобулінів в досліджуваній плазмі визначають за допомогою калібрувальної кривої, яку будують таким чином: по осі абсцис відкладають діаметри кілець стандартної сироватки; по осі ординат – відому кількість імуноглобулінів, що містяться у відповідному зразку стандартної сироватки, помножене на 3. Одержані точки з'єднують. Таким чином будують калібрувальні криві окремо для кожного класу імуноглобулінів.

Для визначення рівня імуноглобулінів в досліджуваній плазмі на осі абсцис відкладають діаметр кільця преципітації даної плазми, відновлюють перпендикуляр до перетинання з калібрувальною кривою, точку перетину проєктують на осі ординат і відраховують вміст імуноглобулінів відповідного класу.

1.5 Визначення титру комплементу.

Система комплементу, що включає 9 послідовно активуючих компонентів, відіграє важливу роль у захисті організму, особливо до інфекційних агентів. Для визначення окремих компонентів необхідні спеціальні антисироватки. В практичних умовах можливе дослідження титру комплементу в цілому, що дає загальне уявлення про його активність і в деякій мірі дозволяє скласти уявлення про рівень захисних сил організму.

Для визначення титру комплементу необхідні 3% суспензія еритроцитів барана і стандартна гемолітична сироватка до еритроцитів барана з відомим титром. Гемолітичну систему готують з рівних об'ємів розведеної по триразовому титру гемолітичної сироватки і 3% суспензії еритроцитів барана. Для роботи застосовують титр гемолітичної сироватки в три рази вищий за вказаний в паспорті.

Постановка реакції: досліджувану сироватку, розведену фізіологічним розчином 1 : 5 розливають у пробірки по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 мл. До сироватки додають фізіологічний розчин до об'єму 2,0 мл і гемолітичну систему в кількості 0,5 мл. Пробірки розміщують у термостаті при 37°С на 30 хвилин. Після інкубації в термостаті реєструють кількість сироватки, яка викликає повний гемоліз еритроцитів в гемолітичній системі. Одержаний результат ділять на 5 і отримують значення титру комплементу.

У практично здорових осіб середній рівень титру комплементу дорівнює – 0,02 – 0,08. Під час деяких захворювань відбувається зниження рівня комплементу.

Матеріали і обладнання

1. Устаткування багаторазового використання:

Мікроскоп бінокулярний будь-якої марки з об'єктивом x20, x40 і окулярами x10, x7 – 3 шт.

Термостат, що підтримує температуру + 37° С-80 – 1 шт.

Холодильник побутовий, що підтримує температуру в основній камері +4 + 10° С – 1 шт.

Центрифуга ОС-СМ чи ЦЛС-3 чи інша центрифуга з горизонтальним ротором, що має роторну камеру діаметром не менш як 40 см і забезпечує від 1 до 3 тисяч обертів на хвилину – 1 шт.

Автоматичні піпетки з кінцівками, що мають робочі об'єми: 0,2 мл – 4 шт. ; 0,1 мл – 1 шт. ; 0,05 мл – 4 шт. ; 0,02 мл – 2 шт.

Планшети для аглютинації з об'ємом лунок 2 мл – 4 шт.

Камери Горяєва – 5 шт.

2. Матеріали одноразового використання:

Скляні капіляри – для забору крові з метою підрахунку вмісту лімфоцитів нарізають з капілярів стандартного діаметра довжиною 25 мм. Шліфують з обох сторін. На кожному капілярі роблять позначку, що відповідає об'єму рідини 0,008 мл. Розфасовують по 25 штук у фольгу. Стерилізують.

Пластмасові трубочки для забору крові з метою постановки клітинних реакцій. З пластмасової соломки діаметром 2 – 4 мм нарізають трубочки довжиною 2 – 2,5 см. Розфасовують по 25 штук і стерилізують опромінюванням.

Пластмасові трубочки для забору крові з метою визначення імуноглобулінів. З пластмасової соломки діаметром 2 – 4 мм нарізають трубочки довжиною 3 см. Промивають розчином, що містить 500 од/мл гепарину, 0,1 % крохмалю, решта – дистильована вода, висушують при 50° С. Розфасовують в пластмасові ємності по 25 штук і стерилізують опромінюванням.

3. Основні реактиви і індикаторні частки

3.1. Основні реактиви:

- Гепарин для впорскувань(ін'єкцій) у флаконі 5000 од/мл; (0,1 мл + 10 мл NaCl);
- глутаровий альдегід 25%;
- формалін;
- еуфілін 24%;
- бальзам канадський чи піхтовий;
- барвник гематоксилін;
- буферний розчин;
- моноспецифічні сироватки для визначення імуноглобулінів А, М, G;
- середовище 199;
- еритроцити миші;
- еритроцити барана;
- дріжджі пекарські *Saccharomyces cerevisiae* ліофілізовані.
- стандартна еталонна сироватка крові людини,
- досліджувані сироватки людей,
- комплемент,
- фізіологічний розчин,
- дистильована вода.

3. 2. Приготування розчинів

3. 2. 1. Приготування розчину теофіліну

Готують безпосередньо перед використанням. Для приготування 0,01 М розчину 18 мг кристалічного теофіліну розчиняють в 10 мл середовища 199.

3. 2. 2. Приготування фіксатора

До 85 мл фосфатного буферу доливають 12 мл формаліну і 3 мл 25 % розчину глутарового альдегіду, перемішують, зберігають у щільно закритому посуді при 4° С.

Склад фосфатного буфера (рН 7,2 – 7,4):

NaCl 4,1 г

Na ₂ HPO ₄	0,8 г
NaH ₂ PO ₄	0,1 г
вода дистил.	до 500 мл

3.2.3. Приготування 10 – кратного розчину Хенкса

На 1 л розчину беруть

NaCl	80,0 г
KCl	4,0 г
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2,0 г
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	2,75 г
KH ₂ PO ₄	0,6 г
Na ₂ HPO ₄ · 2	1,53 г
H ₂ O	10,0 г
Глюкоза	

Розливають у невеликі щільно закриті ємності і зберігають у замороженому стані.

3. 3. Приготування індикаторних часток

3.3.1. Суспензія еритроцитів барана

Одержують від однієї і тієї ж самої тварини. Безпосередньо перед постановкою реакції еритроцити відмивають у фіз. розчині, центрифугуючи кожного разу при 4000 об/хвил. протягом 10 хвилин, доки надосадова рідина не стане безкольоровою (звичайно 2 –3 рази). Для приготування суспензії 0,01 мл відмитого залишку еритроцитів змішують з 10 мл середовища 199. Суспензію зберігають при температурі +4 +10°С не більше трьох годин, перед використанням збовтують. (0,001 мл крові барана + 10 мл NaCl)

3. 3. 2. Суспензія еритроцитів миші

Кров безпородної миші беруть в пробірку з гепарином. Відмивають і готують так само, як і суспензію еритроцитів барана. Зберігання таке ж, як і для суспензії еритроцитів барана.

3. 3. 3. Суспензія клітин пекарських дріжджів

Ліофілізовані або свіжі пекарські дріжджі розводять у фізіологічному розчині (співвідношення об'єм/ об'єм 1: 5) і витримують у фізрозчині в кип'ячій водяній бані впродовж 60 хвилин. Зберігають при температурі 0 – 4°С до 12 місяців. Перед постановкою реакції дріжджі відмивають розчином Хенкса в тому ж режимі, що і еритроцити, доки рН надосадової рідини не буде 7,2 – 7,4 (тобто доки розчин буде зберігати свій колір). Суспензію клітин дріжджів готують і використовують так само, як суспензію еритроцитів.

ЗАНЯТТЯ 14. МЕТОДИ ОЦІНКИ ІМУННОГО СТАТУСУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Метою цього блоку занять є ознайомлення студентів та отримання ними навиків дослідження стану та активності імунної системи експериментальних тварин. При виконанні завдань студенти повинні одержати знання про інтегративні показники стану імунної системи та активність окремих реакцій неспецифічного та специфічного імунітету.

ЗАНЯТТЯ 14.1. ВИВЧЕННЯ АНАТОМІЇ ТА МОРФОЛОГІЇ ОРГАНІВ ІМУННОЇ СИСТЕМИ МИШЕЙ. ВИЗНАЧЕННЯ ОРГАННИХ ІНДЕКСІВ ТА КЛІТИННОСТІ

Мета заняття: Ознайомлення з локалізацією в організмі основних органів и тканин імунної системи, їх анатомією та морфологією (тимус, селезінка, лімфатичні вузли, кістковий мозок, периферична кров). Визначення інтегральних показників стану лімфоїдних органів: абсолютної та відносної маси, клітинності.

В ході виконання роботи необхідно звернути увагу студентів на дифузний характер локалізації лімфоїдної тканини в організмі, розглянути морфологію основних типів клітин, що приймають участь в захисних реакціях (макрофаги, лімфоцити, нейтрофіли).

Доцільно також закріпити знання про існування популяцій та субпопуляцій лімфоцитів; функцій, які вони виконують в процесі розвитку імунної відповіді; уявлення про CD-молекули як маркери належності клітин до тих чи інших популяцій або субпопуляцій та їх функціонального стану.

Практичне завдання

- 1) Розглянути розташування тимуса, селезінки, лімфовузлів, печінки та тонкого кишечника у порожнині тіла миші. Визначити форму та колір основних лімфоїдних органів і зарисувати їх.
- 2) Виділити тимус, селезінку та правий і лівий пахвові лімфовузли, визначити їх масу та розрахувати органні індекси.
- 3) Отримати клітинні суспензії з цих органів, підрахувати кількість ядерних клітин в них та приготувати мазки.
- 4) Розглянути під мікроскопом гістологічні зрізи лімфоїдних органів (готові препарати) та мазки. Зарисувати будову тимуса, селезінки та лімфатичних вузлів, визначити клітинний склад досліджуваних органів та відсоток основних типів клітин в них.

Хід роботи

Мишей зважують і потім декапітують, одночасно збираючи кров у конічну пробірку. Краплину крові наносять на предметне скло та готують мазок. Тіло миші закріплюють на препарувальному столику черевцем догори і роблять

подовжній розтин. Знаходять тимус, селезінку, пахвові лімфовузли та виділяють їх, поміщаючи у фізіологічний розчин. Привертають увагу на розташування у черевної порожнині печінки та тонкого кишечника, як органів, що містять значну кількість макрофагів та лімфоїдної тканини.

Тимус, селезінку та лімфовузли зважують на торзійних вагах та розраховують відповідні органи індекси за формулою:

$$\text{МАСА ОРГАНА, МГ/ МАСА МИШИ, Г} \cdot 100 \%$$

Далі готують клітинні суспензії. Для цього поміщають орган у скляний гомогенізатор і додають необхідний об'єм фізіологічного розчину (4 мл для селезінки, 2 мл для тимуса, 1 мл для лімфовузлів). За допомогою скляного пестика обережно роздавлюють орган поки всі клітини не перейдуть у розчин. Суспензію фільтрують скрізь декілька шарів марлі у чисті пробірки і підраховують кількість ядерних клітин. Для цього 0,1 мл завіси додають до 1,9 мл 3% розчину оцтової кислоти підфарбованого метиленовим синім, перемішують і поміщають у камеру Горяєва. Рахують під мікроскопом кількість клітин у 5 великих квадратах камери по діагоналі (А). Розраховують кількість клітин у 1 мл суспензії за формулою:

$$A \cdot 20 \cdot 5 \cdot 10^4, \text{ де}$$

20 – коефіцієнт розведення суспензії розчином оцтової кислоти; 5×10^4 – коефіцієнт, що враховує об'єм камер Горяєва.

Для визначення кількості клітин у всьому органі отриману величину помножують на об'єм суспензії.

Результати представляють у вигляді таблиці (табл.14):

Таблиця 14

Абсолютна і відносна маса лімфоїдних органів та їх клітинність

Об'єкт	Абсолютна маса, г або мг	Відносна маса органів, %	Кількість ядерних клітин в органах $\times 10^6$
Миша			
Тимус			
Селезінка			
Пахвові вузли: лівий правий			

Потім розглядають під мікроскопом готові препарати гістологічних зрізів тимуса, селезінки та лімфовузлів і замальовують їх будову.

Матеріали та обладнання

- | | |
|---------------------------|---------------------------------|
| 1. Мікроскопи. | Пробірки, піпетки (1, 2, 5 мл). |
| 2. Скляний гомогенізатор. | Готові гістологічні препарати. |
| 3. Камери Горяєва. | Фізіологічний розчин. |
| 4. Пінцети, ножиці. | Миші. |

ЗАНЯТТЯ 14. 2. ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МАКРОФАГІВ

Мета заняття: Ознайомлення з методами дослідження стану макрофагально-фагоцитарної системи *in vivo* та *in vitro*. Вивчення поглинальної здатності перитонеальних макрофагів та їх активності в НСТ-тесті.

В ході виконання роботи слід звернути увагу на належність макрофагальних реакцій до неспецифічної ланки імунітету, на участь цих клітин у специфічних реакціях на первинному та заключному їх етапах. Важливо відзначити поліфункціональність макрофагів, їх роль у формуванні захисних реакцій організму. Розглянути можливість вільної та фіксованої локалізації в організмі.

Практичне завдання

- 1) Одержати перитонеальній ексудат із черевної порожнини мишей.
- 2) Виділити з нього макрофаги.
- 3) Визначити здібність макрофагів до поглинання клітин мікроорганізмів.
- 4) Визначити активність фагоцитів в НСТ-тесті.

Хід роботи

Тварину декапітують, кладуть на спинку. Внутрішньоочеревинно вводять холодний розчин Хенкса з гепарином в кількості 3,5 мл і 1,5 мл повітря. Ін'єкцію роблять трохи вище лівої пахової області і лівіше середньої лінії. При ін'єкції черевце тварини поступово розтягується і стає помітно опуклим. Присутність повітря в ін'єкційному середовищі сприяє ефективності вивільнення макрофагів.

Після ін'єкції тварину струшують, або швидко постукують по опуклій частині черевця не менш 1 хвилини. Розкривають черевну порожнину, вміст збирають у пробірку через марлевий фільтр. Пробірки поміщають на лід, щоб макрофаги не прикріпилися до скла. Вимірюють об'єм перитонеального ексудату (ПЕ) і розносять його по чашках Петрі по 1,5 мл, інкубують 1 годину при 37° С. Через годину макрофаги прикріплюються до скла або пластика і формують моношар. 0,1 мл ПЕ додають до 0,1 мл розчину метиленової синьки у оцтової кислоти та підраховують кількість макрофагів у камері Горяєва.

Визначення інтенсивності фагоцитозу

Клітини, які не прилипли змивають теплим розчином Хенкса. До моношару Мф додають 1,5 мл суспензії дріжджів ($4 \cdot 10^7$ кл/мл), інкубують 30 хв при 37°C . Нефагоцитовані дріжджі відмивають, занурюючи чашки в теплий розчин Хенкса, залишки розчину видаляють, перевертаючи чашки на фільтрувальний папір. Далі у кожену чашку додають 1,2 мл розчину NaCl, що містить у 1 мл 1,5 мг трипсину і 0,4 мг ЕДТА, залишають на 30 хв при 37°C . Після інкубації суспензію переносять у пробірки і залишають на ніч, контроль – 0,5 мл дріжджів і 1,5 мл розчину Хенкса; 0,2 мл дріжджів і 1,8 мл розчину Хенкса. Наступного дня кількість дріжджових клітин визначають за допомогою фотоелектроколориметра “Спекол-10” при довжині хвилі 510 нм. У контрольну кювету додають розчин Хенкса.

Інтенсивність фагоцитозу розраховують за кількістю клітин дріжджів ($\times 10^6$), поглинених 10^6 макрофагами.

Визначення активності у НСТ-тесті

До моношару макрофагів у другій чашці додають 1,5 мл теплового (37°C) розчину нітросинього тетразоліа (НСТ) і інкубують 30 хвилин при 37°C . Залишок фарби відмивають, занурюючи чашки в теплий розчин Хенкса, залишки розчину видаляють, перевертаючи чашки на фільтрувальний папір.

У кожену чашку додають 1,2 мл розчину Хенкса і м'яким пензликом знімають моношар клітин у пробірки. З отриманої суспензії по 1 мл відбирають у центрифужні пробірки. Пробірки центрифугують 15 хв при 1200 об/хв. Надосадову рідину зливають. До преципітату додають 1 мл діметилформаміду (ДМФ), ставлять на киплячу водяну лазню на 10 хв. Для посилення фарбування додають по 1 мл 10 н КОН, ретельно перемішують.

Фотометрують верхній шар при довжині хвилі 710 нм (контроль – ДМФ).

Активність у НСТ-тесті розраховують за кількістю діформозану (мкг) на 10^6 макрофагів.

Результати представляють у вигляді таблиці (табл.15):

Таблиця 15

Функціональна активність перитонеальних макрофагів мишей

№ миши	Кількість макрофагів на чашці $\cdot 10^6$	Фагоцитарна активність макрофагів		Активність макрофагів у НСТ-тесті	
		Е, $\lambda = 510$ нм	Кількість дріжджових клітин, поглинених 10^6 макрофагів, $\cdot 10^6$	Е, $\lambda = 710$ нм	Кількість мкг діформазану, утвореного 10^6 макрофагів

Матеріали та обладнання

- | | |
|------------------------------------|------------------------------|
| 1. Мікроскопи. | Чашки Петрі, Ø 35 мм. |
| 2. Скляний гомогенізатор. | Фізіологічний розчин. |
| 3. Камери Горяєва. | Розчин Хенксу. |
| 4. Пінцети, ножиці. | Розчин НСТ. |
| 5. Спектрофотометр. | Суспензія дріжджових клітин. |
| 6. Пробірки, піпетки (1, 2, 5 мл). | Гепарин, трипсин, ЕДТА. |

ЗАНЯТТЯ 14.3. ДОСЛІДЖЕННЯ РЕАКЦІЙ ГУМОРАЛЬНОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ

Мета заняття: Ознайомлення з методами визначення інтенсивності гуморальної відповіді на конкретний антиген і дослідження її клітинних основ.

В ході виконання роботи слід сформувати у студентів чітке уявлення про специфічність і конкретність цього типу імунних реакцій. Звернути їх увагу на необхідність попереднього введення в організм антигену, імунна відповідь на який розгортається на протязі декількох днів до досягнення максимуму. Для закріплення знань про механізми формування первинної відповіді дослідження доцільно проводити на не імунізованих тваринах (наявність фонового рівня В-лімфоцитів, здібних до реагування на даний антиген), та тваринах, що були імунізовані різними дозами антигену. При наявності достатньої кількості експериментальних тварин слід проводити дослідження у динаміці розвитку первинної імунної відповіді (з 1-ої по 5-ту добу після введення антигену). У якості антигену використовують еритроцити барана (ЕБ).

Практичне завдання

- 1). Проімунізувати мишей оптимальною ($5 \cdot 10^8$ ЕБ/мишу) і субоптимальною ($8 \cdot 10^6$ ЕБ/мишу) дозами антигену;
- 2). Одержати сироватку та визначити в неї титри гемаглютининів і гемолізинів;
- 3). Зважити тварин та їх лімфоїдні органи і розрахувати органічні індекси;
- 4). Визначити кількість антитіло утворюючих клітин (АУК) у селезінці;
- 5). Визначити кількість розеткоутворюючих клітин у тимусі, селезінці і лімфовузлах.

Хід роботи

Визначення кількості АУК

Основу методу становить здатність суспензованих в рідкому середовищі АУК, взятих від імунізованих ЕБ тварин виділяти у розчин гемолізину, які, в

присутності комплекменту спричиняють лізис розташованих поблизу еритроцитів барана.

Реакцію проводять на предметних скельцях у моно шарі суспензії, краплі якої накривають покривними скельцями. Інкують 45 хв. При 37 °С, а потім на протязі 1 –2 годин у холодильному шафі. Дані визначають кількість зон гемолізу під мікроскопом і підраховують число продуцентів антитіл на певну кількість спленоцитів ($\times 10^6$).

Варіанти (компоненти змішують у лунках пластикових планшетів об'ємом 2,5 мл):

- 1). 0,3 мл розчину Хенксу
0,05 мл (5×10^6 клітин) суспензії спленоцитів, що містить 100×10^6 клітин в 1 мл
0,05 мл 50% суспензії ЕБ
0,1 мл розчину комплекменту (1: 10)

- 2). Контроль без комплекменту
0,4 мл розчину Хенксу
0,05 мл суспензії лімфоцитів
0,05 суспензії ЕБ

- 3). Контроль без лімфоцитів
0,35 мл розчину Хенкса
0,05 мл суспензії ЕБ
0,1 мл розчину комплекменту (1 : 10)

Суспензії клітин добре перемішують і по 0,01 мл (10 мкл) вносять у камери, які попередньо готують на предметних скельцях з допомогою смужок лейкопластиру, і накривають покривними скельцями. Камери герметизують розплавленим вазеліном.

Визначення кількості РУК

РУК – це лімфоїдні клітини, які здатні зв'язувати на своїй поверхні чужорідні еритроцити. Т-лімфоцити людини і тварин мають специфічний рецептор до ЕБ і формують так звані спонтанні розетки. Після імунізації експериментальних тварин ксеногенними еритроцитами розеткоутворюючими стають також інші імуноцити: В-лімфоцити, макрофаги, нейтрофіли і т.д. В данному випадку зв'язування еритроцитів відбувається за рахунок сорбованих на поверхні клітин антиеритроцитарних антитіл.

Реакцію проводять в пробірках. В 1 мл розчину Хенкса змішують $5 \cdot 10^6$ лімфоцитів і $5 \cdot 10^7$ еритроцитів барана. Центрифугують при 500 об/хв. Протягом 1-2 хвилин і витримують у термостаті 45 хв при 37° С. Далі переносять пробірки у холодильну шафу. Через 1-2 години підраховують кількість розеток: ядерні клітини селезінки або іншого лімфоїдного органа, що зв'язали 5 або більше еритроцитів. Розрахунки ведуть на 10^6 лімфоцитів.

Визначення титрів гемаглютининів та гемолізинів

Гемаглютиніни – антиеритроцитарні антитіла, що викликають склеювання (аглотинацію) еритроцитів. Гемолізини теж є антиеритроцитарними антитілами, які в присутності комплементу руйнують (лізують) еритроцити.

Перед дослідженням сироватку декомплементують шляхом підігрівання при 56°C на протязі 30 хв. Потім готують ряд послідовних розведень у пластикових планшетах за допомогою змішувачів з мікротитратора Такачи. Для цього у кожен лунку планшета спочатку вносять по 0,05 мл фізіологічного розчину, потім змішувачем набирають сироватку і поміщають його у першу лунку. Після перемішування переносять змішувач у наступну лунку і т.д. Кожну сироватку розводять у двох планшетах: один з них використовують для визначення гемаглютининів, а другий – гемолізинів. У планшети, що призначені для виявлення гемаглютининів, додають 2% суспензію ЕБ у фізіологічному розчині по 0,05 мл у кожен лунку і витримують їх на протязі 45 хв у термостаті при 37°C , а потім 1-2 години у холодильнику. При позитивній реакції еритроцити, що аглотиновали, вистеляють дно лунки рівномірним шаром. При негативній реакції усі еритроцити збираються разом у вигляді крапки. Результати реакції виражають титром антитіл - величиною, зворотною останньому розведенню сироватки, яка ще аглотинує еритроцити (\log_2).

Для визначення титрів гемолізинів у відповідні планшети додають 1% суспензію ЕБ, що містить комплемент. Її готують із 2% шляхом розведення останньої вдвічі розчином комплементу (1:10) у фізіологічному розчині. Планшети витримують 45 хв у термостаті при 37°C , а потім 1-2 години у холодильнику. При позитивній реакції рідина у лунках офарблюється у червоний колір. При негативній реакції рідина у лунках безбарвна, а еритроцити зібрані разом на дні у вигляді крапки. Результати реакції виражають титром антитіл - величиною, зворотною останньому розведенню сироватки, яке спричиняє гемоліз еритроцитів (\log_2).

Визначення гемолітичної активності спленоцитів

Метод базується на здібності імунних спленоцитів виділяти у інкубаційне середовище антиеритроцитарні антитіла, які у присутності комплементу лізують еритроцити барана. Результати реакції в даному випадку оцінюються спектрофотометрично по кількості гемоглобіну, що потрапив у середовище внаслідок гемолізу. Такий підхід сприяє об'єктивності та уніфікації досліджень.

В 3 пробірки поміщають по 1 мл суспензії спленоцитів ($5 \cdot 10^6$ клітин/мл) і по 1 мл суспензії ЕБ ($5 \cdot 10^7$ клітин/мл). В дві із них додають 0,05 мл розчину комплементу (1:2), а в третю – 0,05 мл фізіологічного розчину (контроль на спонтанний лізис). Пробірки витримують 45 хв у термостаті при 37°C і 1 годину у холодильнику. Потім центрифугують 15 хв при 1000 об/хв. У надосадовій рідині визначають кількість гемоглобіну при $\lambda=412$ нм.

Розрахунки ведуть за допомогою калібровочного графіка, у разі високих значень у третій пробірці їх віднімають від показань у перших двох. Результати виражають кількістю ЕБ, що зруйновано 10^6 спленоцитами.

Результати дослідження реакцій гуморальної імунної відповіді оформлюють в вигляді двох таблиць(табл.16, 17). Після цього порівнюють їх інтенсивність у інтактних (не імунізованих) тварин і тварин, що було імунізовано різними дозами антигену.

Примітка: враховуючи великий обсяг досліджень у цьому розділі, визначення титрів антиеритроцитарних антитіл може бути проведено на наступному занятті. Сироватки в цьому випадку слід заморозити.

Таблиця 16

Стан імунокомпетентних органів мишей до і після імунізації

Показник	Неімунізовані миші	Імунізовані $8 \cdot 10^6$ ЕБ/мишу	Імунізовані $5 \cdot 10^8$ ЕБ/мишу
Маса миші, г			
Абсолютна маса,г Тимус Селезінка Лімфовузли			
Органні індекси,% Тимус Селезінка Лімфовузли			
Кількість клітин в органі, $\cdot 10^6$ Тимус Селезінка Лімфовузли			

Інтенсивність реакцій гуморальної імунної відповіді

Показник	Неімунізовані миші	Імунізовані $8 \cdot 10^6$ ЕБ/мишу	Імунізовані $5 \cdot 10^8$ ЕБ/мишу
Кількість АУК серед 10^6 спленоцитів			
Кількість РУК серед 10^3 Тимоцитів Спленоцитів Клітин лімфовузлів			
Титри антитіл, \log_2 Гемаглютиніни Гемолізину			
Гемолітична активність спленоцитів			

Матеріали та обладнання

- | | |
|------------------------------------|------------------------------|
| 1. Мікроскопи. | Мікротитратор Такачи. |
| 2. Скляний гомогенізатор. | Фізіологічний розчин. |
| 3. Камери Горяєва. | Розчин Хенксу. |
| 4. Пінцети, ножиці. | Предметні і покривні стекла. |
| 5. Спектрофотометр. | Еритроцити барана. |
| 6. Пробірки, піпетки (1, 2, 5 мл). | Комплемент мурчака. |

ЗАНЯТТЯ 14.4. ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУННИХ РЕАКЦІЙ КЛІТИННОГО ТИПУ

Мета заняття: Ознайомлення з методами визначення інтенсивності імунних реакцій клітинного типу.

В ході виконання роботи слід сформулювати у студентів чітке уявлення про специфічність і конкретність цього типу імунних реакцій. Звернути їх увагу на необхідність попереднього введення в організм антигену, імунна відповідь на який розгортається на протязі декількох днів до досягнення максимуму. Необхідно підкреслити, що реакції клітинного типу здійснюються Т-лімфоцитами ефекторами (Т-кілери, Т-ефектори ГСТ), які безпосередньо реагують з антигеном та знешкоджують його. Слід також звернути увагу на участь у реакціях клітинного імунітету численних медіаторів, що продукуються сенсibiliзованими лімфоцитами.

Практичне завдання

- 1). Ввести дослідним тваринам сенсibiliзуючу дозу антигену

- (еритроцити барана).
- 2). Ввести дослідним і контрольним тваринам завершальну дозу антигену.
 - 3). Провести оцінку інтенсивності реакції ГСТ.

Хід роботи

При відтворенні реакції **гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ)** дослідних мишей масою 18-22 г імунізують одноразовим внутрішньо очеревинним введенням антигену в дозі 10^7 ЕБ/мишу в об'ємі 0,5 мл фізіологічного розчину. Через чотири доби після сенсibiliзації дослідним (імунізованим) и контрольним (неімунізованим) тваринам вводять завершальну дозу антигену – 10^8 ЕБ/мишу в об'ємі 0,02 мл в підошву задньої лівої лапи (Д, дослідна лапа). В праву (К, контрольна) лапу вводять фізіологічний розчин в такому ж об'ємі.

Оцінку реакції проводять через 24-48 годин за різницею мас дослідної (Д) і контрольної (К) лап. Для цього обидві лапки відрізають одразу вище п'яточного суглоба після евтаназії тварин. Індекс реакції (ІР) обчислюють для кожної тварини за формулою:

$$IP = (D - K) / K \cdot 100 \%$$

Модифікація методу полягає в тому, що індекс реакції визначають за різницею мас регіонарних лімфатичних вузлів, або за різницею в кількості клітин в них.

Результати роботи оформлюють в вигляді таблиці (табл.18).

Таблиця 18

Інтенсивність реакцій клітинного імунітету

Варіант	Д, маса лівої лапи, мг	К, маса правої лапи, мг	ІР, %	Кількіст ь клітин в лівому лімфову злі $\cdot 10^5$	Кількість клітин в правому лімфовуз лі $\cdot 10^5$	ІР, %
Контрольні тварини						
Дослідні тварини						

Матеріали та обладнання

- | | |
|--------------------------|------------------------|
| 1). Еритроцити барана. | Скляний гомогенізатор. |
| 2). Фізіологічний розчин | Камера Горєва. |
| 3). Торзійні ваги. | Пробірки. |
| 4). Ножиці, пінцети. | |

ЗАНЯТТЯ 14.5. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРИРОДНИХ КІЛЕРІВ

Мета завдання. Ознайомлення студентів з методами дослідження активності природних (нормальних) кіперних клітин.

В ході роботи необхідно закріпити знання про природу і функціональну активність цих клітин. Студенти повинні знати, що природні кілери є окремою популяцією лімфоцитів і не належать ні до В-, ні до Т-клітин. Вони здійснюють реакції **неспецифічного захисту** і відповідають за розпізнавання та знищення клітин деяких пухлин, а також клітин, інфікованих вірусами. Природні кілери руйнують клітини-мішені лише при безпосередньому контакті з ними.

Практичне завдання

- 1). Підготувати до реакції клітини мішені.
- 2). Виділити із селезінки мишей суспензію лімфоїдних клітин, що містить у своєму складі природні кілери.
- 3). Вивчити здібність природних кілерів лізувати клітини-мішені.

Хід роботи

Методи визначення активності природних кілерів базуються на їх здатності лізувати чужерідні для організму клітини-мішені, мічені будь-яким способом: радіоактивними солями хрому $\text{Na}(\text{}^{51}\text{Cr})\text{O}_3$, або вітальними (прижиттєвими) барвниками. В даній роботі використовують останню модифікацію. В якості клітин-мішеней використовують макрофаги щурів, які попередньо офарблюють нейтральним червоним. Джерелом природних кілерів слугує суспензія спленоцитів мишей.

З черевної порожнини щурів отримують перитонеальний ексудат і виділяють з нього макрофаги як наведено у завданні до заняття 14. Макрофаги, що прилипли до дна чашки Петри, знімають за допомогою м'якого пензлика, осаджують центрифугуванням при 500 об/хв на протязі 5 хвилин. Осад ресуспендирують у 3 мл 0,04% розчину нейтрального червоного і витримують 15 хв при 37° С. Макрофаги тричі відмивають від барвника шляхом центрифугування і розводять розчином Хенкса до концентрації $5 \cdot 10^5$ клітин/мл. Суспензію макрофагів вносять по 0,2 мл у лунки пластикових планшетів і поміщають на 45 хв для прикріплення клітин до пластика у термостат (37° С). Потім надосадову рідину зливають і у лунки додають суспензію спленоцитів мишей у об'ємі 0,2 мл, що містить таку кількість

лімфоцитів, щоб співвідношення ефекторних клітин і клітин-мішеней становило: 10 : 1, 20 : 1, 40 : 1 і 100 : 1. На кожен варіант роблять три повторності.

Планшети витримують у термостаті при 37° С на протязі 45 хв, Далі відмивають лунки від клітин-ефекторів шляхом занурення планшетів у теплий (37° С) розчин Хенксу. Залишки рідини струшують на фільтровальний папір. У кожен лунку планшету вносять по 0,02 мл 0,01 % розчину Тритону Х-100 і залишають на 30 хв при кімнатній температурі для лізису незруйнованих макрофагів. Рідину з кожної лунки повністю відбирають за допомогою пастерівської піпетки і переносять в окремі пробірки, в які додають фізіологічний розчин до кінцевого об'єму 1 мл. Кількість барвника визначають спектрофотометрично при $\lambda = 540$ нм. Результати порівнюють з контрольними значеннями. Останні отримують, лізуючи макрофаги у лунках, в які замість суспензії спленоцитів мишей додають розчин Хенксу.

Процент зруйнованих клітин-мішеней розраховують за формулою:

$$(E_1 - E_2) / E_1 \cdot 100 \%, \text{ де}$$

E_1 - середня екстинція контрольних проб,

E_2 - середня екстинція дослідних проб.

Результати оформлюють у вигляді таблиці (табл.19).

Таблиця 19

Активність природних кілерів селезінки мишей

Співвідношення ефектори : мішені	E_1	E_2	% зруйнованих макрофагів
0 : 1, контроль		0	0
10 : 1			
20 : 1			
40 : 1			
100 : 1			

Матеріали та обладнання

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Мікроскопи. | Чашки Петри, скляні, великі. |
| 2. Скляний гомогенізатор. | Фізіологічний розчин. |
| 3. Камери Горяєва. | Розчин Хенксу. |
| 4. Пінцети, ножиці. | Пластикові планшети. |
| 5. Спектрофотометр. | 0,01% розчин Тритону Х-100. |
| 6. Пробірки, піпетки (1, 2, 5 мл). | 0,04% розчин нейтрального червоного. |

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Що таке BSL?
2. Назвіть основні відмінності у розташуванні та організації роботи в лабораторіях 1-4 рівня біобезпеки.
3. Дайте визначення лінійних, коізогенних, рандомбредних та мутантних тварин.
4. Перелічіть види тварин, що використовуються в імунологічних дослідженнях.
5. Правила утримання лабораторних тварин.
6. Принципи відбору тварин для імунологічних досліджень.
7. Назвіть методи імунізації тварин.
8. Поясніть принцип реакції аглютинації.
9. Види та способи постановки реакції аглютинації (пряма, пасивна, платівчаста, розгорнута).
10. Дайте визначення аглютиногену, аглютиніну та аглютинату.
11. Опишіть процес отримання стандартних діагностикумів та стандартних антисироваток для реакції аглютинації.
12. Сфера застосування реакції аглютинації.
13. Які бувають види аглютинату? Коли вони утворюються?
14. Реакція гемаглютинації. Принцип, сфера застосування.
15. Реакція гальмування гемаглютинації. Принцип та сфера застосування.
16. Опишіть принцип реакції преципітації.
17. Опишіть принцип імуноферментного аналізу.
18. Види імуноферментного аналізу.
19. Сфера застосування ІФА.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.И., Фрейдлин И.С. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии Учеб.пособие. -М.: Медицина,1993.-240 с.
2. Вершигора А. Е. Общая иммунология учеб пособие. – К. : Вища школа, 1989. – 736 с.
3. Доклінічне вивчення імунотоксичної дії лікарських засобів. Методичні рекомендації. К.: Здоров'я, 2000. – 22 с.
4. Буркин А.А., Лосев А.С. Метод определения гемолитической активности лимфоидных клеток и сыворотки иммунизированных животных для отбора иммунотропных агентов // Хим.-фарм. журн. – 1976. – Т. 10, № 11. – С. 41-45.
5. Иммунологические методы / Под.ред. Г.Фримеля - М.: Медицина, 1987.- 472 с.
6. Кресюн В. И. , Бажора Ю. И. , Рыбалова С. С. Клинические аспекты иммунофармакологии. – Одесса, 1993. – 208 с.
7. Кохан І. Імунологія. Підручник імуності, серології, імунохімії, імунобіології, імуногенетики для студентів медичних і біологічних інститутів. - Київ - Торонто: Кобза, 1994. - 443 с.
8. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология. -М.: Медицина, 1983. - 368 с.
9. Кузовкова Н.А. Оценка активности естественных киллеров колориметрическим методом // Иммунология. – 1991. - № 4. – С. 59-61.
10. Никитин В.М. Справочник серологических реакций. - Кишнев.: Штиинца, 1977. - 206 с.
11. Пастер Е. О. , Овод В. В. , Позур В. К. , Вихоть Н. Е. Иммунология: практикум. – К. : Вища школа, 1989. – 304 с.
12. Петров Р.В. Иммунология. - М.:Медицина, 1983. - 368 с.
13. Петров Р.В., Лопухин Ю.М., Чередеев А.И. Оценка иммунного статуса человека: Методические рекомендации. - М.: Минздрав СССР, 1984. - 36 с.

- 14 Петров Р.В., Борисова А.М., Пересадин И.А. Иммуная система и проблемы хронизации заболеваний. - М.: Минздрав СССР, 1991. - 26 с.
- 15 Ройт А. Основы иммунологии. – М. : Мир, 1991. – 328 с.
- 16 Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир, 2000. – 582 с.
- 17 Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных заболеваний. -М: Медицина, 1989. - 697 с.
- 18 Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике вирусных инфекций: Учебное пособие /Гирин В.М., Букринская А.Г., Порохницкий В.Г. и др. - К.: Вища школа, 1992. - 303 с.
- 19 Ускоренная первичная оценка иммунологического статуса человека. Методические рекомендации. /Ваничкин А.А., Бушуева Н.Н., Дегтяренко Т.В., Усов Н.И., Лебедев К.А., Понякина И.Д. - Одесса: Од.НИИ глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова, 1990. - 23 с.
- 20 Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения. Методические рекомендации. - Киев: Минздрав. УССР, 1988. -20 с
- 21 Фролов А.Ф., Шевченко Л.Ф., Широбоков В.П. Иммунология: Практикум. - К.: Здоров'я, 1989. - 245 с.
- 22 Alföldy P., Lemmel E.M. Reduction of nitroblue tetrazolium for functional evaluation of activated macrophages in the cell-mediated immune reaction // Clin. Immunol. and Immunopathol. – 1979. – V. 12, N 3. – P. 263-270.
- 23 Cunningham F., Sceenberg A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells // Immunol. J. – 1967// - V. 14, N 4. – P. 599-600.
- 24 Kaminsky N.E., Roberts J.F. A rapid spectrophotometric method for assessing macrophage activity // Immunol. Lett. – 1985. - V. 10, N 6. – P. 329-331.
- 25 Lagrange P.H., Mackanes G.B. A stable form of delayed-type hypersensitivity // J. exp. Immunol. – 1975. – V. 141, N 1. – P. 82-96.
- 26 Zaalberg O.B. A simple method for detecting single antibody-forming cells // Nature. - 1969. – V. 202, N 8. – P. 1231-1235.

Навчальне видання

Філіпова Тетяна Олегівна
Гудзенко Тетяна Василівна
Галкін Микола Борисович
Зінченко Оксана Юріївна.
Ямборко Ганна Валентинівна
Русакова Марія Юріївна

ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до проведення лабораторних занять
з курсу «Імунологія»

Для студентів біологічного факультету ОНУ
спеціальностей: «Біологія» і «Біотехнології та біоінженерія»

В авторській редакції

Підп. до друку 20.12.2018. Формат 60x84/16.
Ум.-друк. арк.5,46. Тираж 20 пр.
Зам. № 1855.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р. Р 51