



**А.Й. МАЗУРКЕВИЧ, Ю.О. ХАРКЕВИЧ,  
М.О. МАЛЮК, В.В. КОВПАК, Т.Л. САВЧУК**

# **ПРАКТИКУМ З ВЕТЕРИНАРНОЇ ІМУНОЛОГІЇ**

*Друге видання*

**Київ – 2025**

УДК 619:577.27  
ББК 48.47:52.7я73  
Ве26

*Рекомендовано до друку Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України  
(витяг з протоколу засідання Вченої ради № 10 від 25 квітня 2025 року)*

Рецензенти:

**Ушкалов В. О.** – доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН України, професор кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України;

**Галатюк О. Є.** – доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології Поліського національного університету;

**Панченко Л.М.** – кандидат медичних наук, завідувачка лабораторії імунології ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України».

**Ве26 Практикум з ветеринарної імунології [навчальний посібник, 2 видання] /**  
А. Й. Мазуркевич, Ю. О. Харкевич, М. О. Малюк, В. В. Ковпак,  
Т.Л. Савчук. – К.: НУБіП України, 2025 – 175 с.

ISBN

Зміст посібника відповідає навчальній програмі дисципліни «Ветеринарна імунологія». Посібник буде корисний студентам, аспірантам та викладачам закладів вищої освіти.

**УДК 619:577.27**

ISBN

© Мазуркевич А. Й., Харкевич Ю. О.,  
Малюк М. О., Ковпак В. В., Савчук Т. Л., 2025  
© НУБіП України, 2025

## ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

### МАЗУРКЕВИЧ АНАТОЛІЙ ЙОСИПОВИЧ



Доктор ветеринарних наук, професор, академік Національної академії аграрних наук України, заслужений діяч науки і техніки України, професор кафедри ветеринарної хірургії ім. акад. І.О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни: «Ветеринарна імунологія», «Патофізіологія тварин». Напрямок наукових досліджень: біологічні властивості стовбурових клітин тварин залежно від їх видової приналежності, а також від умов отримання, культивування, зберігання та застосування в клітинній терапії для відновлення структури патологічно змінених тканин тваринного організму. Автор і співавтор понад 350 наукових та навчально-методичних праць. Електронна адреса: [a.mazurkevich@nubip.edu.ua](mailto:a.mazurkevich@nubip.edu.ua).

### ХАРКЕВИЧ ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ



Кандидат ветеринарних наук, доцент, доцент кафедри ветеринарної хірургії ім. акад. І.О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни: «Ветеринарна імунологія», «Патофізіологія тварин». Напрямок наукових досліджень: властивості стовбурових клітин тварин, клітинно-регенеративна терапія, механізми реалізації імунітету у тварин. Автор і співавтор понад 100 наукових та навчально-методичних праць. Електронна адреса: [kharkevych\\_iurii@nubip.edu.ua](mailto:kharkevych_iurii@nubip.edu.ua).

### МАЛЮК МИКОЛА ОЛЕКСІЙОВИЧ



Доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри ветеринарної хірургії ім. акад. І.О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни: «Ветеринарна імунологія», «Ветеринарна трансфузіологія». Напрямок наукових досліджень: біологічні властивості стовбурових клітин тварин, клітинно-регенеративна терапія у відновленні втрачених функцій органів і тканин. Автор і співавтор понад 150 наукових та навчально-методичних праць. Електронна адреса: [nikolai\\_malyuk@nubip.edu.ua](mailto:nikolai_malyuk@nubip.edu.ua).



### **КОВПАК ВІТАЛІЙ ВАСИЛЬОВИЧ**

Доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри ветеринарної репродуктології Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни: «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології», «Методологія наукових досліджень». Напрямок наукових досліджень: властивості стовбурових клітин тварин, біотехнологія. Автор і співавтор понад 130 наукових та навчально-методичних праць. Електронна адреса: [vitkovpak@nubip.edu.ua](mailto:vitkovpak@nubip.edu.ua).



### **САВЧУК ТАРАС ЛЮБОМИРОВИЧ**

Кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри ветеринарної хірургії ім. акад. І.О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни: «Патофізіологія тварин», «Ветеринарна трансфузіологія». Напрямок наукових досліджень: властивості стовбурових клітин тварин, клітинно-регенеративна терапія у відновленні втрачених функцій органів і тканин. Автор і співавтор понад 40 наукових та навчально-методичних праць. Електронна адреса: [t\\_sav4uk@nubip.edu.ua](mailto:t_sav4uk@nubip.edu.ua).

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕДМОВА</b>	<b>8</b>
<b>1. ЗАГАЛЬНА ЧАСТИНА</b>	<b>10</b>
<b>Заняття 1. ІМУНОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ ТА ВІВАРІЙ, ЇХ ОБЛАДНАННЯ І ПРАВИЛА БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС РОБОТИ В НИХ</b>	<b>10</b>
<i>Завдання 1.</i> Ознайомитися з роботою імунологічної лабораторії, її обладнанням та правилами безпеки під час проведення імунологічних досліджень	10
<i>Завдання 2.</i> Ознайомитися з облаштуванням віварію, його обладнанням та правилами утримання тварин	20
<b>Заняття 2. ВИДІЛЕННЯ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН</b>	<b>25</b>
<i>Завдання 1.</i> Виділити лімфоцити з крові щурів за методом А. Воуіт	25
<i>Завдання 2.</i> Виділити нейтрофіли з крові щурів у градієнті щільності фікол-тріомбразу	28
<i>Завдання 3.</i> Приготувати суспензію еритроцитів тварин	30
<i>Завдання 4.</i> Отримати лейкоконцентрат шляхом гемолізу еритроцитів цільної крові (мікрометод)	31
<i>Завдання 5.</i> Отримати лейкоконцентрат шляхом осадження еритроцитів за допомогою розчину желатину (макрометод)	32
<i>Завдання 6.</i> Отримати перитонеальні макрофаги у мишей	33
<i>Завдання 7.</i> Виділити Т-лімфоцити (тимоцити) з тимусу у мишей	34
<i>Завдання 8.</i> Виділити клітини селезінки (спленоцити) у мишей	35
<i>Завдання 9.</i> Виділити лімфоцити із лімфатичних вузлів у мишей	36
<i>Завдання 10.</i> Визначити життєздатність імунокомпетентних клітин	38
<b>САМОСТІЙНА РОБОТА</b>	<b>39</b>
<b>Тема 1. МЕТОДИ ФІКСАЦІЇ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН</b>	<b>39</b>
<i>Завдання 1.</i> Ознайомитися з різними методами фіксації лабораторних тварин	39
<b>Тема 2. МЕТОДИ ВЗЯТТЯ КРОВІ У ТВАРИН ДЛЯ ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>41</b>
<i>Завдання 1.</i> Відібрати кров у лабораторних тварин	41
<i>Завдання 2.</i> Відібрати кров у коней, великої і дрібної рогатої худоби	43
<i>Завдання 3.</i> Відібрати кров у дрібних домашніх тварин	44
<i>Завдання 4.</i> Відібрати кров у свиней	45
<i>Завдання 5.</i> Відібрати кров у кролів	46
<i>Завдання 6.</i> Відібрати кров у сільськогосподарської птиці	47
<i>Завдання 7.</i> Отримати дефібриновану кров	48
<i>Завдання 8.</i> Отримати плазму крові від тварин	49
<b>Тема 3. ОТРИМАННЯ КОРПУСКУЛЯРНИХ АНТИГЕНІВ. МЕТОДИ ВВЕДЕННЯ АНТИГЕНУ ТВАРИНАМ</b>	<b>49</b>
<i>Завдання 1.</i> Розглянути принципи та відпрацювати методику	51

отримання корпускулярних антигенів <i>Escherichia coli</i>	
<i>Завдання 2.</i> Відпрацювати методику підшкірного та внутрішньом'язового введення антигену тваринам	53
<b>Питання для самоконтролю</b>	<b>56</b>
<b>2. МЕХАНІЗМИ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ</b>	<b>58</b>
<b>Заняття 3. ОЦІНКА ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ЛЕЙКОЦИТІВ КРОВІ ТВАРИН</b>	<b>59</b>
<i>Завдання 1.</i> Дати оцінку функціональної активності нейтрофілів крові кролів в реакції відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест)	61
<i>Завдання 2.</i> Визначити функціональну активність нейтрофілів крові кролів на прикладі постановки опсоно-фагоцитарної реакції	62
<i>Завдання 3.</i> Визначити функціональну активність перитонеальних макрофагів миші	63
<i>Завдання 4.</i> Змодельовати фагоцитоз <i>in vivo</i>	64
<i>Завдання 5.</i> Визначити активність пероксидази (мієлопероксидази) у нейтрофільних гранулоцитах крові кролів	66
<b>Заняття 4. ГУМОРАЛЬНА НЕСПЕЦИФІЧНА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ</b>	<b>67</b>
<i>Завдання 1.</i> Визначити бактерицидну активність сироватки крові собаки фотонейфелометричним методом	68
<i>Завдання 2.</i> Визначити лізоцимну активність сироватки крові собаки фотоелектроколориметричним методом	69
<i>Завдання 3.</i> Визначити активність комплементу сироватки крові корови за 50 % гемолізом еритроцитів барана	71
<i>Завдання 4.</i> Визначити титр гетерофільних аглютинінів у сироватці крові кролів	75
<i>Завдання 5.</i> Визначити титр гемолізинів у сироватці крові кролів	76
<i>Завдання 6.</i> Визначити вміст циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щурів	77
<b>САМОСТІЙНА РОБОТА</b>	<b>79</b>
<b>Тема 4. МОРФОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ КРОВІ ТВАРИН У РАЗІ ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>79</b>
<i>Завдання 1.</i> Розглянути будову камери Горяєва та методику її підготовки для підрахунку клітин крові тварин	83
<i>Завдання 2.</i> Визначити загальну кількість лейкоцитів у крові тварин	89
<i>Завдання 3.</i> Приготувати мазки та вивести лейкограму крові тварин	90
<i>Завдання 4.</i> Визначити кількість еозинофілів у крові собак	92
<i>Завдання 5.</i> Визначити кількість природних клітин-кілерів у крові щурів	93
<b>Питання для самоконтролю</b>	<b>95</b>
<b>3. КЛІТИННІ ТА ГУМОРАЛЬНІ ФАКТОРИ АДАПТИВНОГО ІМУНІТЕТУ</b>	<b>97</b>
<b>Заняття 5. ДОСЛІДЖЕННЯ Т- ТА В-КЛІТИННОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ</b>	<b>98</b>

<i>Завдання 1.</i> Визначити інтенсивність реакції гіперчутливості сповільненого типу після повторного введення антигену	99
<i>Завдання 2.</i> Визначити кількість Т-лімфоцитів у крові щурів методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана за методикою, запропонованою Jondal M. et al.	101
<i>Завдання 3.</i> Визначити кількість теофілінчутливих та теофілінрезистентних Т-лімфоцитів у крові щурів методом розеткоутворення з еритроцитами барана	103
<i>Завдання 4.</i> Визначити кількість «активних» Т-лімфоцитів у крові щурів методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана за методикою, запропонованою Kerman R. et al.	104
<i>Завдання 5.</i> Визначити кількість В-лімфоцитів у крові щурів за методикою, запропонованою Bianco C. et al.	105
<i>Завдання 6.</i> Визначити інтенсивність реакції бласттрансформації лімфоцитів під впливом Т- та В-клітинних мітогенів	107
<b>Заняття 6. АНАЛІЗ КРОВІ ТВАРИН НА ВМІСТ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ</b>	<b>109</b>
<i>Завдання 1.</i> Визначити загальну кількість білка у сироватці крові собак з допомогою біуретової реакції	111
<i>Завдання 2.</i> Визначити вміст $\gamma$ -глобулінів та інших фракцій білків у сироватці крові собак рефрактометричним методом	112
<b>Заняття 7. СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИГЕНІВ ТА АНТИТІЛ</b>	<b>115</b>
<i>Завдання 1.</i> Визначити стійкість антитіл і комплекта до температури 56 °С	116
<i>Завдання 2.</i> Вивчити явище адсорбції антитіл (гемолізинів) на поверхні антигену (еритроцитів) (дослід Даніша)	117
<i>Завдання 3.</i> Розглянути механізм протікання реакції аглютинації та її модифікації	118
<i>Завдання 3.1.</i> Провести перехресний тест на відповідність крові тварини-донора та реципієнта (метод з використанням мікропробірок)	121
<i>Завдання 3.2.</i> Визначити сумісність крові при трансфузії у тварин (метод з використанням предметних скелець)	123
<i>Завдання 3.3.</i> Визначити групи крові у котів	124
<i>Завдання 3.4.</i> Визначити групи крові у собак	126
<i>Завдання 3.5.</i> Визначити наявність антитіл до збудника бруцельозу великої рогатої худоби з допомогою роз-бенгал проби (РБП)	128
<b>Заняття 8. МЕТОДИ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ</b>	<b>129</b>
<i>Завдання 1.</i> Розглянути види імуноферментного аналізу та принципи його проведення	130
<i>Завдання 1.1.</i> Виявити специфічні антитіла проти антигенів у сироватці крові собак з допомогою імуноферментного аналізу	135
<i>Завдання 1.2.</i> За допомогою імуноферментного аналізу визначити у	137

сироватці крові жуйних глікопротеїни, асоційовані з вагітністю	
<b>САМОСТІЙНА РОБОТА</b>	<b>139</b>
<b>Тема 5. РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ Й МЕТОДИ, ЗАСНОВАНІ НА РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ</b>	<b>139</b>
<i>Завдання 1.</i> Розглянути механізм протікання реакції преципітації (імунодифузії) та її модифікації	139
<i>Завдання 1.1.</i> Визначити кількість антигену у сироватці крові тварин за методом Манчіні	144
<i>Завдання 1.2.</i> Визначити наявність антигену у сироватці крові тварин за методом Оухтерлоні	145
<b>Тема 6. РЕАКЦІЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ. ІМУНОХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ</b>	<b>146</b>
<i>Завдання 1.</i> Розглянути механізм протікання реакції зв'язування комплекменту за діагностики хвороб тварин	146
<i>Завдання 1.1.</i> Визначити наявність антитіл у сироватці крові тварин за допомогою реакції зв'язування комплекменту	149
<i>Завдання 2.</i> Визначити наявність вірусу панлейкопенії у біологічних рідинах кошенят з використанням експрес-тесту	150
<i>Завдання 3.</i> Визначити наявність вірусу імунодефіциту та лейкемії у котів з використанням експрес-тесту	153
<b>Тема 7. МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ ХВОРОБ, ЯКІ ПРОТІКАЮТЬ ЗА ПРИНЦИПОМ АЛЕРГІЧНИХ РЕАКЦІЙ</b>	<b>154</b>
<i>Завдання 1.</i> Вивчити особливості перебігу анафілаксії у морських свинок	156
<i>Завдання 2.</i> Виявити імуноглобуліни класу Е у сенсibiliзованих бензилпеніциліном тварин методом пасивної шкірної анафілаксії	157
<i>Завдання 3.</i> Змодельовати гіперчутливість сповільненого типу на прикладі постановки туберкулінової проби	158
<b>Тема 8. ОТРИМАННЯ ІМУННИХ СИРОВАТОК. ПОНЯТТЯ ПРО ГІБРИДОМИ ТА МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА</b>	<b>160</b>
<i>Завдання 1.</i> Отримати імунну сироватку від кроля	160
<i>Завдання 2.</i> Розглянути принципи отримання гібридом і моноклональних антитіл	162
<b>Питання для самоконтролю</b>	<b>168</b>
<b>АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК</b>	<b>172</b>
<b>СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b>	<b>173</b>

## ПЕРЕДМОВА



Ветеринарна імунологія – дисципліна, яка, використовуючи досягнення багатьох фундаментальних біомедичних наук, дозволяє краще зрозуміти патогенез великої кількості патологічних явищ в організмі тварин, а також покращити їх діагностику та лікування. З огляду на це, роль вивчення ветеринарної імунології та її методів у підготовці лікарів ветеринарної медицини будь-якого спрямування досить вагома. Сьогодні ні в кого немає сумнівів, що ветеринарна імунологія вносить істотний внесок у вирішення багатьох проблем охорони здоров'я тварин. Разом з тим, викладання даної дисципліни у закладах освіти при підготовці ветеринарних фахівців досить обмежене кількістю годин, а, отже, і об'ємом інформації, що подається слухачам. Це призвело до випуску покоління лікарів ветеринарної медицини, знання яких з ветеринарної імунології є мінімальними. При цьому дана дисципліна залишається ключовою наукою у переліку дисциплін з підготовки ветеринарних лікарів, оскільки допомагає їм у пошуку шляхів розв'язку основних проблем ветеринарної медицини, пов'язаних, зокрема, з особливостями імунодіагностики інфекційних та неінфекційних хвороб тварин, розробкою терапевтичних підходів у лікуванні тварин, у механізмі розвитку яких присутній імунний компонент.

Таким чином, навчальна дисципліна «Ветеринарна імунологія» займає одне із провідних місць в циклі фундаментальних дисциплін підготовки студентів за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина». Після вивчення анатомії, гістології, фізіології та інших передуючих дисциплін «Ветеринарна імунологія» розглядає коло питань, пов'язаних із виникненням, розвитком та функціонуванням в організмі тварин системи забезпечення сталого антигенного складу організму шляхом імунного нагляду та за потреби включення в дію імунних реакцій по відношенню до власних змінених антигенів або антигенів чужорідного походження, які можуть потрапити ззовні (бактерії та продукти їх життєдіяльності, паразити, чужорідні клітини тощо).

Без знання сновних закономірностей розвитку та становлення органів імунокомпетентної системи, розуміння механізмів імуної відповіді на антиген неможливо адекватно оцінити імунний статус тварини та спрогнозувати подальший розвиток і характер імунної реакції організму.

Знання, отримані майбутніми фахівцями ветеринарної медицини з ветеринарної імунології, є важливим надбанням для використання цих знань і умінь в лабораторній імунологічній діагностиці – основі діяльності діагностичних лабораторій. Розуміння студентами взаємодії макро- та мікроорганізмів, характеру реакцій у відповідь організму тварин на проникнення певного біологічного матеріалу з чужорідними антигенними властивостями (тканин, клітин біологічних сполук тощо) дає можливість виявити прогалини у ланцюгу імунних реакцій організму на чужорідний

антиген та обрати високоспецифічний орієнтир для оцінки клінічного стану тварини під час хвороби та прогнозування її перебігу. В основі проведення імунних досліджень лежить використання фізичних, хімічних, імуногістохімічних та інших методів на молекулярному, клітинному рівні та рівні цілісного організму, які дають змогу оцінити функціональний стан імунної системи, специфічність реакцій за участі антигенів та антитіл, а також визначити імунофенотипові характеристики окремих її клітин та кооперації цих клітин при імунній відповіді. Все це визначає важливість та необхідність вивчення студентами особливостей проявів імунологічної реактивності у тварин у вигляді імунних реакцій гуморального та клітинного характеру, методів ветеринарної лабораторної імунологічної діагностики та корекції імунної реакції в організмі тварин у випадку появи в ньому чужорідних антигенів різного походження.

Практикум складається із трьох частин. У першій його частині розглядаються питання роботи персоналу в імунологічній лабораторії та віварії, методи виділення імунокомпетентних клітин тварин. Самостійна робота даного розділу містить завдання, що стосуються методів фіксації лабораторних тварин, взяття крові для імунологічних досліджень, отримання корпускулярних антигенів та методів введення антигенів тваринам. До другої частини («Механізми вродженого імунітету») посібника включені лабораторні роботи, в яких описуються методи оцінки функціональної активності лейкоцитів крові тварин, а також гуморальної неспецифічної резистентності. Самостійна робота даного розділу містить завдання, що стосуються проведення морфологічного аналізу крові тварин під час проведення імунологічних досліджень.

У третій частині посібника («Клітинні та гуморальні фактори адаптивного імунітету») розглядаються методи дослідження Т- та В-клітинної ланки імунітету, аналізу крові тварин на вміст імуноглобулінів, серологічні методи визначення антигенів та антитіл, методи імуноферментного аналізу. Самостійна робота даного розділу містить завдання, що стосуються проведення реакцій преципітації, зв'язування комплементу, імунохроматографічного аналізу, методів виявлення хвороб, які протікають за принципом алергічних реакцій, отримання імунних сироваток, гібридом та моноклональних антитіл.

Даний навчальний посібник не є первинним джерелом інформації з імунологічних методів діагностики та досліджень, тому більш розширену та уточнюючу інформацію, викладену в його розділах, можна отримати, скориставшись додатковими первинними літературними джерелами.

Представлений посібник розрахований на студентів факультетів ветеринарної медицини закладів вищої освіти. Він також буде корисним для лікарів ветеринарної медицини та наукових працівників, зайнятих вирішенням питань, пов'язаних з імунітетом та імунними реакціями у тварин.

Мазуркевич А.Й. брав участь у підготовці підручника як редактор та у написанні розділу 1; Харкевич Ю.О. – розділів 1–3; Малюк М.О. – розділів 2, 3; Ковпак В.В. – розділів 1, 2; Савчук Т.Л. – розділу 1.



## 1. ЗАГАЛЬНА ЧАСТИНА



### **Заняття 1. ІМУНОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ ТА ВІВАРІЙ, ЇХ ОБЛАДНАННЯ І ПРАВИЛА БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС РОБОТИ В НИХ**



### **Завдання 1. Ознайомитися з роботою імунологічної лабораторії, її обладнанням та правилами безпеки під час проведення імунологічних досліджень**

**Мета роботи:** ознайомити студентів із вимогами під час роботи в імунологічній лабораторії, її обладнанням, правилами безпеки під час проведення імунологічних досліджень, а також принципами оцінки результатів імунологічних досліджень.

**Обладнання та матеріали:** презентатор, слайди, нормативні матеріали, які регламентують організацію та діяльність імунологічної лабораторії та віварію, сферу охорони праці при роботі з біологічними об'єктами, в тому числі Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження», Європейська конвенція щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях.

### **1. Належна лабораторна практика у імунологічній лабораторії**

«Належна лабораторна практика», іменована коротко стандартом GLP (від англійського «Good Laboratory Practice») – система якості стосовно організації процесу та умов планування, проведення, моніторингу, реєстрації даних, надання результатів та зберігання матеріалів доклінічних досліджень щодо безпек лікарського засобу для здоров'я людини та довкілля. Особливо важливим етапом належної лабораторної практики є надійна обробка первинних даних дослідження, оскільки будь-які маніпуляції з даними сприяють процесу видачі допуску або прискорюють його. До подібних маніпуляцій вдаються для того, щоб витрачений робочий час і понесені витрати на «неклінічні» дослідження не виявилися марними. Ці ж самі вимоги стосуються і імунологічних лабораторій, оскільки імунологічна діагностика хвороб людини і тварин безпосередньо впливає на виявлення причин захворювання та визначає підходи в їх лікуванні.

Належна лабораторна практика регламентує не тільки вимоги, що пред'являються до персоналу, приміщень та спеціального обладнання, а й сфери відповідальності під час імунологічних досліджень і після них.

Основоположним є принцип контролю декількома фахівцями. Тому під дозвільною документацією повинно стояти кілька підписів.

Лише при наявності допуску проводиться наукова оцінка, для якої потрібно подати повний комплект документів. Якщо комплект документів неповний, допуск видається з затримкою або не видається зовсім, адже відсутність документів, що підтверджують проведення аналізів або досліджень, розцінюється як не проведення таких. Тому для отримання допуску вкрай важливо подавати весь комплект документації.

Стандарт GLP був впроваджений в 1978 році, але ще за кілька років до цього Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA) завдяки даному стандарту змогло виявити суттєві порушення під час проведення хіміко-токсикологічних досліджень. Це вимагало створення системи контролю якості, яка регламентує питання організації та управління, а також типові умови неклінічних досліджень безпеки. Під неклінічними дослідженнями маються на увазі будь-які лабораторні дослідження, що проводяться без участі людини. Крім того, належна лабораторна практика поширюється лише на певні речовини, так звані «регульовані» речовини. До таких належать лікарські препарати, пестициди і хімікати. У сфері розробки лікарських препаратів в першу чергу потрібне проведення екотоксикологічної оцінки, хіміко-токсикологічних досліджень і фармацевтичних досліджень безпеки в суворій відповідності з принципами належної лабораторної практики. Таким чином, належна лабораторна практика має застосовуватися у всіх випадках підготовки документації для отримання допуску.

Належна лабораторна практика першочергово була впроваджена для забезпечення надійності даних, а також для їх визнання в усьому світі. Основне завдання – забезпечити можливість простеження і відтворення ходу дослідження, а також розподіл сфер відповідальності і зберігання документації. Наукова оцінка проводиться тільки після отримання допуску. Відповідно до цього належна лабораторна практика регламентує вимоги, що пред'являються до персоналу і приміщень, а також інші організаційні вимоги, що стосуються, наприклад, оснащення дослідного центру. Дана система контролю якості охоплює також аспекти планування і проведення досліджень за правилами належної лабораторної практики.

*Організація. Структура персоналу.* Для організації робіт за правилами належної лабораторної практики потрібна певна структура персоналу з метою забезпечення і дотримання встановлених вимог. Структура персоналу не залежить від ієрархії в компанії або інституті.

Адміністрація дослідного центру (лабораторії) несе повну відповідальність за організацію і роботу дослідного центру (лабораторії). Поряд з цим керівник дослідження управляє проведенням відповідного дослідження за правилами належної лабораторної практики та відповідає за відповідність дослідження встановленим принципам. Це має на увазі в першу чергу проведення самого дослідження і складання звіту.

Виконуючий дослідження персонал також відповідає за якість і надійність даних. При цьому особлива увага повинна бути приділена точній реєстрації первинних даних дослідження відразу після їх отримання.

Для забезпечення певної об'єктивності персонал служби контролю якості та відповідальні за архів не повинні брати участь в дослідженнях за правилами належної лабораторної практики. Їх обов'язки можуть бути передані також стороннім підприємствам.

Дана вимога є непростим завданням з точки зору розподілу персоналу, особливо в невеликих установах. Крім того, повинен бути визначений порядок заміщення посад, який обумовлює залучення додаткового персоналу. Рішенням для невеликих установ може стати покладання декількох обов'язків на одну людину.

Крім того, потрібно вести облік персональних даних, наприклад досвіду роботи, посадових інструкцій і регулярного навчання персоналу, що має підтверджуватися сертифікатами. Така документація підлягає регулярному оновленню.

*Приміщення та обладнання.* Поряд з персоналом вимоги пред'являються також до приміщень та обладнання. Згідно належної лабораторної практики необхідно виділити і відзначити спеціальні зони. Це потрібно для зберігання предметів постачання для лабораторних тварин і утримання самих тварин, а також поширюється на самі лабораторні приміщення.

Певні вимоги пред'являються також до використовованого устаткування, особливо до комп'ютеризованих систем. Шляхом регулярної перевірки, очищення, техобслуговування і калібрування необхідно забезпечити належну працездатність обладнання.

Якщо в рамках належної лабораторної практики задіяно додаткове обладнання, потрібне ведення реєстраційних журналів, за якими можна відстежити використання обладнання і перевірки його працездатності. Крім того, в наявності має бути відповідне керівництво по експлуатації, а також документація щодо проведення техобслуговування і ремонту.

Використовувані комп'ютеризовані системи повинні бути розроблені та затверджені згідно з принципами належної лабораторної практики. Ці ж вимоги поширюються на їх експлуатацію і техобслуговування. При цьому повинен бути передбачений захист від стороннього доступу: фізичний або логічний (у вигляді пароля).

Крім того, особливі вимоги пред'являються до архіву, що проявляється, наприклад, в суворому захисті даних від стороннього доступу, що дає право доступу тільки відповідальному за архів і його заступнику. При необхідності в архів може потрапити будь-яка людина, але тільки в супроводі відповідного співробітника. Це суворе правило покликане виключити будь-які маніпуляції з документацією. Термін зберігання документів становить на сьогоднішній день не менше 15 років, тому розмір архіву повинен визначатися кількістю досліджень, що проводяться за правилами належної лабораторної практики.

*Досліджувані зразки і реактиви.* При виконанні робіт в лабораторіях важливо, щоб всі реактиви мали належне маркування, в тому числі з терміном придатності та датою відкриття упаковки. Поряд з цим повинні бути нанесені стандартні вказівки з безпеки і символи небезпеки.

У разі перевищення терміну придатності досліджуваній зразок підлягає утилізації. У виняткових випадках фахівець може продовжити термін придатності, зробивши відповідну позначку на зразку. Продовження терміну придатності можливо після проведення аналізу, який також підлягає точному документуванню.

*Робочі інструкції.* Всі роботи в рамках належної лабораторної практики виконуються у відповідності зі стандартними робочими інструкціями. Ці інструкції містять опис загальних процедур, важливих з точки зору належної лабораторної практики. Кожен дослідний центр розробляє свої власні робочі інструкції, які потребують регулярної перевірки та постійного оновлення.

До такої стандартної робочої інструкції (стандартної робочої процедури, англ. «Standard Operating Procedure») пред'являються певні вимоги належної лабораторної практики. Тому робоча інструкція повинна бути в наявності на кожному робочому місці в письмовому вигляді у самій останній редакції.

Робочі інструкції розробляються для кожного конкретного дослідницького центру і вимагають конфіденційного звернення. При цьому існують певні шаблони, якими дозволено користуватися, але вони потребують відповідного доопрацювання і затвердження адміністрацією дослідницького центру. Таким чином, стандартна робоча інструкція є обов'язковою для персоналу, який задіяний у проведенні досліджень.

Щоб уникнути затримок при видачі допуску в цих інструкціях повинно бути відображено кілька аспектів:

- ✚ досліджувані зразки і реактиви;
- ✚ устаткування, матеріали та реактиви;
- ✚ ведення записів, складання звітів, зберігання та доступ;
- ✚ біологічні дослідні системи;
- ✚ методи контролю якості;
- ✚ порядок дій під час проведення досліджень / аналізів;
- ✚ комп'ютеризовані системи;
- ✚ сполучні ланки із сторонніми організаціями (за необхідності).

Після розробки стандартна робоча інструкція повинна бути підписана автором і перевіряючим. Після цього вона схвалюється службою контролю якості, а потім затверджується керівником дослідницького центру. Документ підлягає поширенню серед співробітників тільки при наявності цих чотирьох підписів.

*Хід проведення дослідження за правилами належної лабораторної практики.* При підготовці до дослідження за правилами належної лабораторної практики повинен бути призначений керівник дослідження, який потім складає план дослідження. План дослідження повинен бути наданий перед проведенням експериментально-дослідницьких робіт і схвалений керівником дослідницького

центру, службою контролю якості та замовником. Тільки після цього дозволено починати дослідження.

План дослідження має містити хронологічний опис порядку проведення дослідження, а також методів і частоти проведення дослідження. Після затвердження плану дослідження ці відомості є обов'язковими і підлягають зміні лише в крайніх випадках. Будь-яка зміна оформляється у вигляді доповнення до плану дослідження. При цьому розрізняють: поправки до плану дослідження, які потрібні при наявності доповнень, змін, оновлень або коригувань відомостей, і відхилення від плану дослідження, які потрібні в непередбачених випадках, при наявності несправностей або людського фактора.

Дослідження в рамках належної лабораторної практики проводиться на підставі плану дослідження і документується в установленому порядку. Документування повинно бути виконано таким чином, щоб документацію можна було завжди точно і цілком співвіднести з відповідним дослідженням. Крім того, всі дані повинні мати позначку з ініціалами перевіряючого і датою, та подальшій зміні не підлягають. Таким чином забезпечується відстеження даних в ході всього дослідження і після його закінчення. Поряд з цим можливі перевірки з боку служби контролю якості, яка стежить за дотриманням принципів належної лабораторної практики.

Будь-яке дослідження за правилами належної лабораторної практики завершується складанням заключного звіту. Короткий звіт потрібен також у разі припинення дослідження. Такий звіт складається керівником дослідження та потім схвалюється службою контролю якості, яка доповнює його поясненнями і результатами своєї перевірки.

*Висновок.* Отримання висновку за результатами проведених досліджень можливо при наявності повного комплексу оформлених і архівованих документів. Лише після цього проводиться наукова оцінка дослідження. В ході процедури видачі висновку все, що не задокументовано, вважається непроведеним.

Така система контролю якості покликана не допустити поспішної видачі висновків, при якій не були враховані всі нюанси. Належна лабораторна практика являє собою міжнародний стандарт, що виключає будь-які маніпуляції і забезпечує уніфіковану процедуру проведення імунологічного дослідження.

## **2. Вимоги щодо безпеки при виконанні робіт в імунологічній лабораторій та її документація**

Кожен працівник лабораторії має закріплене за ним робоче місце.

Робота в лабораторії вимагає наявності у працюючому спецодягу, який зберігається в індивідуальних шафах, окремо від верхнього одягу. В спецодязі забороняється виходити за межі лабораторних приміщень.

## **Порядок роботи з біологічним матеріалом**

У приміщенні, де проводяться роботи з використанням біологічного матеріалу, заборонено здійснювати інші види діяльності, не пов'язані з проведенням тих чи інших досліджень.

Приміщення, де проводяться роботи з біологічним матеріалом, має бути обладнане вентиляцією.

Кожен працівник імунологічної лабораторії зобов'язаний:

- ✚ мати необхідні професійні знання та навички безпечного поводження із дослідними тваринами;
- ✚ знати та виконувати вимоги правил, нормативних актів про охорону праці, інструкції роботи з дослідними тваринами;
- ✚ користуватися засобами індивідуального захисту;
- ✚ надавати першу допомогу потерпілим від шкідливих факторів;
- ✚ додержуватись вимог чинних інструкцій щодо охорони праці, передбачених правилами внутрішнього розпорядку в лабораторії.

Кожен працівник несе персональну відповідальність за:

- ✚ стан робочого місця з дослідними тваринами;
- ✚ вчасне, якісне та безпечне виконання робіт;
- ✚ охорону власного здоров'я та здоров'я оточуючих працівників.

Кожен працівник має право на:

- ✚ забезпечення робочого місця умовами щодо охорони праці під час виробничої діяльності;
- ✚ соціальне страхування від нещасних випадків і професійних захворювань;
- ✚ отримання спецодягу, інших засобів індивідуального захисту та змиваючих засобів;
- ✚ компенсацію працівнику з боку адміністрації вартості збитків, нанесених від втрати ним працездатності внаслідок професійної діяльності.

### **Вимоги безпеки перед початком роботи**

Всі види робіт із дослідним матеріалом мають виконуватись у спецодязі.

Перед початком роботи необхідно оглянути робоче місце, підготувати обладнання, прилади та необхідні матеріали до роботи.

### **Вимоги безпеки під час проведення робіт**

При роботі з потенційно небезпечним матеріалом хімічної природи та біологічного походження (кров, секрети та екскрети, інші біологічні рідини) і особливо у випадках, коли він може стати причиною зооантропонозного захворювання дослідника чи розповсюдження збудника у навколишньому середовищі, необхідно слідкувати, щоб даний матеріал не потрапив на

незахищені ділянки тіла, одяг чи інші предмети, окрім тих, які передбачені методикою дослідження.

При роботі з піддослідними тваринами необхідно використовувати гумові рукавички.

Матеріал біологічного походження повинен зберігатися у щільно закритому посуді. Посуд, у якому зберігалися біологічні зразки від піддослідних тварин, необхідно спочатку знезаразити і тільки після цього помити.

Хімічні розчини та дезактивуючі рідини слід зливати у спеціально призначену для цього тару. Зливати їх в каналізацію без попередньої нейтралізації чи знезараження заборонено. Всю роботу з концентрованими кислотами та лугами необхідно проводити у витяжній шафі при включеній вентиляції, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом. При митті посуду хромовою сумішшю потрібно запобігати попаданню її на шкіру, одяг та взуття.

У випадку потрапляння хімічних речовин на незахищену ділянку шкіри, її необхідно негайно промити під проточною водою.

Після розтину трупів тварин, що загинули внаслідок дії біологічного чинника, столи, інструменти, раковини, підлогу необхідно промити холодною, а потім гарячою водою з миючими засобами, передбаченими для дезінфекції у лабораторіях імунології.

Трупи тварин, що загинули від інфекційних хвороб, після розтину необхідно знезаразити 5 %-им розчином хлораміну, 2,5 %-им освітленим розчином хлорного вапна чи іншим придатним для цієї мети дезінфекційним засобом.

Використовують дезінфекційні засоби, які відповідають вимогам ефективності та безпечності, внесені до «Облікового переліку засобів в Україні», а також мають додану інструкцію (методичні вказівки) щодо застосування та відповідне посвідчення про можливість застосування в Україні.

Кімнату, у якій проводили розтин трупа дослідної тварини, слід провентилувати та провітрити. Вентиляційна і каналізаційна системи повинні бути оснащені засобами очищення та недопущення витоку інфікованого матеріалу за межі лабораторії.

### **Вимоги безпеки після закінчення роботи**

Після закінчення роботи необхідно вимкнути вентиляцію. Використаний хімічний посуд та прилади, які містять небезпечні речовини, необхідно звільнити від залишків цих речовин, знежирити і помити.

Робоче місце слід прибрати та виконати заходи особистої гігієни.

Перед виходом з приміщення імунологічної лабораторії необхідно переконатися, що усі прилади вимкнуті, а крани закриті.

## **Документація лабораторії, яка регламентує її діяльність**

Для здійснення відповідної діяльності імунологічна лабораторія має мати наступну документацію:

- ✚ Положення про лабораторію, затверджене керівником установи.
- ✚ Паспорт лабораторії, затверджений керівником установи.
- ✚ Свідоцтво(а) про акредитацію.
- ✚ Організаційно-розпорядчу документацію (накази, інструкції та інші документи, що регламентують діяльність лабораторії).
- ✚ Нормативну документацію, яка регламентує вимоги до об'єктів досліджень та методи досліджень.
- ✚ Документацію на систему забезпечення якості досліджень.
- ✚ Документи на обладнання та засоби вимірювальної техніки (реєстраційні документи на обладнання (журнал, картки та ін), паспорт на кожну одиницю обладнання та засобів вимірювальної техніки, графіки та посвідчення повірок засобів вимірювальної техніки).
- ✚ Документацію щодо персоналу лабораторії (посадові інструкції, документи з питань підвищення кваліфікації та атестації персоналу (свідоцтва, атестати та ін.).
- ✚ Журнали реєстрації інструктажів з питань біологічної безпеки (протиепідемічного режиму), безпеки праці та пожежної безпеки.
- ✚ Положення щодо етики поводження із піддослідними тваринами в процесі їх утримання та використання в дослідах.

### **Порядок роботи з лабораторним посудом та приладами**

Роботу з кров'ю (плазмою чи сироваткою), суспензією клітин крові необхідно проводити з використанням стерильних пластикових пробірок одноразового використання. За їхньої відсутності використовують стерильний скляний лабораторний посуд, який попередньо варто обробити силіконом, оскільки клітини мають здатність прилипати до скла, що позначається на втраті значної кількості клітини у досліджуваному зразку. Для цього внутрішню поверхню лабораторного посуду змочують протягом 2–3 хвилин приготуванням 4 %-им диетилефірним розчином силікону. Потім силікон зливають, а його надлишок відмивають дистильованою водою. Оброблений таким чином лабораторний посуд висушують у перевернутому положенні впродовж 24 годин за кімнатної температури, а потім витримують 2 години у сушильній шафі за температури 120–140 °С.

Роботу з іншим біологічним матеріалом також слід проводити з використанням стерильного лабораторного посуду, уникаючи його контамінації з інфекційними агентами та їх розповсюдження.

Залежно від завдань, які виконує імунологічна лабораторія, вона облаштовується відповідними приладами і обладнанням (ІФА-рідер, ПЛР-система, мікроскоп з флуоресцентним блоком тощо).

Усі прилади та обладнання, які використовуються для імунологічних досліджень, повинні бути повіреними та стандартизованими, а імунологічна лабораторія – мати свідоцтва про їх повірку. Робота з приладами та обладнанням лабораторії має здійснюватись компетентними висококваліфікованими фахівцями у відповідності до вимог інструкції щодо їх експлуатації.

Мінімальний перелік обладнання імунологічної лабораторії:

- ✚ Кабінет біологічної безпеки.
- ✚ ІФА-рідер з наборами реагентів.
- ✚ Центрифуга клінічна для пробірок об'ємом 1–100 мл.
- ✚ Термостат з діапазоном робочих температур від 25 до 100 °С.
- ✚ Холодильник з камерами, що підтримують температуру плюс 2–6 °С та мінус 18 °С (при необхідності – мінус 70 °С).
- ✚ Сушильна шафа з діапазоном робочих температур від 100 до 160 °С.
- ✚ Лабораторний стіл та шафа для зберігання лабораторного посуду.
- ✚ Набір автоматичних піпеток змінного об'єму (мінімум 3 піпетки: до 20 мкл, до 200 мкл і до 1000 мкл).
- ✚ Одноразові поліпропіленові центрифужні пробірки з кришками, що загвинчуються або щільно закриваються, об'ємом 1–15 мл.
- ✚ Одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму до 20, 200 та 1000 мкл.
- ✚ Штативи для наконечників та пробірок.
- ✚ Ємність з дезінфекційним розчином.
- ✚ Лабораторний посуд.
- ✚ Реактиви для імунологічних досліджень.

Усі реактиви, які використовуються для імунологічних досліджень, відповідно маркуються та зберігаються згідно інструкції щодо їх використання.

### **Фактори, які впливають на результати імунологічної лабораторної діагностики**

В даний час діагностика будь-якого захворювання не може бути проведена без різноманітних імунологічних досліджень, результати яких можуть бути загальними або специфічними для розвитку тієї чи іншої хвороби чи патологічного процесу. Існує певна кореляція між клінічними показниками, активністю та стадією патологічного процесу і даними, одержуваними з імунологічної лабораторії.

Предметом імунологічного дослідження з діагностичної точки зору можуть бути:

- ✚ клітинні чи неклітинні утворення, які містяться у біологічних рідинах (діагностичне значення можуть мати кількісні та деякі якісні їх зміни);
- ✚ ендогенні хімічні компоненти (наприклад, парапротеїни, аутоантитіла);
- ✚ екзогенні хімічні компоненти (антигени, гаптени).

З огляду на це, елементами інформації про стан організму в складі біологічних рідин є: а) структурні характеристики (форма і будова клітин, наявність хімічних сполук певної структури); б) кількісні характеристики (розміри і співвідношення структурних компонентів, число певних клітинних елементів, концентрації хімічних речовин, співвідношення структурно близьких клітин); в) функціональні характеристики (цикл розвитку і дозрівання клітин).

Результат імунологічного лабораторного дослідження є точним результатом, але може бути і випадковою величиною, оскільки відображає вплив ряду факторів. До них відносяться:

- ✚ біологічні фактори, які визначають біологічну варіацію – результат лабораторного дослідження в межах нормальних величин;
- ✚ діагностичні і лікувальні маніпуляції, які проводились над хворою твариною і визначають ятрогенну варіацію;
- ✚ умови забору, зберігання та транспортування біологічної проби;
- ✚ умови лабораторного аналізу (вимірювання) – аналітична варіація;
- ✚ патологічні фактори, що визначають відхилення результатів лабораторних досліджень за межі нормальних величин, тобто патологічну варіацію.

Особливо слід звернути увагу на вплив умов лабораторного аналізу на результат дослідження. В роботі імунологічної лабораторії можна відмітити похибки 3-х типів: випадкові, систематичні і грубі.

Випадкові – це одиничне значення, яке не виходить за межі області, встановленої для даного досліджуваного компонента. В їх появі не спостерігається будь-яких закономірностей. Величина випадкової похибки обумовлена властивостями самої проби (негомогенна, нерівномірна); неякісним інструментарієм (неточність піпеток, мірних колб і т.д.); неточної роботи персоналу лабораторії (неточне піпетування, неправильне зчитування результатів досліджень, помилки, втомлення, помилка зчитування та ін.). Величина випадкової похибки характеризує відтворюваність результатів дослідження.

Систематична похибка: це огріхи, однакові за знаком, які виникають від певних причин, впливають на результат лабораторного дослідження в сторону збільшення або зменшення його. Найбільш характерні такі види систематичних похибок: методичні – залежать від особливостей методу, який використовується (наприклад, від певного протікання реакції, від часткової розчинності осаду та ін.); помилки, що залежать від приладів та реактивів, які використовуються (недостатня точність ваг, забруднення розчинів продуктами

розпаду скла, фарфору, пластмаси та ін.); помилки індивідуальні – залежать від індивідуальних особливостей дослідника (нездатність точно вловити момент переходу забарвлення та ін.).

Грубі похибки – це одиночне значення досліджуваного компонента, що виходить за межі встановленої для даного компонента області (за допустимі межі похибки). Причина – халатність в роботі (неправильне дозування, помилка в розрахунку).

Відтворюваність вимірювань – якість вимірювання, яка відображає близькість вимірювань один до одного, хоча і виконуються у різних умовах (в різний час, різних місцях, різними методами). Розрізняють відтворюваність у серії, у часі і міжлабораторну.

Правильність вимірювань – якість вимірювань, що відображає близькість до систематичних похибок і їх результатів, тобто відповідність середнього значення результатів вимірювань.

Збіжність результатів вимірювання – якість вимірювань, що відображає близькість один до одного результат вимірювань, виконаних в однакових умовах (відтворюваність в серії).

Результати імунологічних лабораторних досліджень повинні бути представлені в цифровій формі.



## **Завдання 2. Ознайомитися з облаштуванням віварію, його обладнанням та правилами утримання тварин**

**Мета роботи:** ознайомити студентів із вимогами під час роботи у віварії, його обладнанням, правилами утримання та використання піддослідних тварин,

**Обладнання та матеріали:** презентатор, слайди, нормативні матеріали.

### **1. Основні вимоги до облаштування віварію**

Система розведення лабораторних тварин, їх утримання та використання має відповідати вимогам загально визнаних нормативів, які передбачають забезпечення необхідних умов для лабораторних тварин у відповідності до її фізіологічних потреб. Лабораторні тварини різних видів утримуються ізолювано у віварії. Для цього територію віварію, де утримують і доглядають тварин, поділяють на дві зони: «чисту» і «брудну» (рис. 1.1).

До «чистої» зони відносять приміщення для утримання лабораторних тварин і догляду за ними; склади для окремого збереження стерильних кормів, підстилки, кліток та іншого інвентарю і матеріалів. В «брудній» зоні проводять миття і дезінфекцію інвентарю, видалення використаних матеріалів, загиблих тварин, окреме збереження партій нестерильних матеріалів, інвентарю та ін. Відповідно до цього забезпечується так званий одnobічний рух персоналу, тварин, матеріалів, устаткування, що виключає перетинання «чистих» та

«брудних» потоків, а також бар'єрний захист тварин від зовнішньої контамінації.

Протягом усього року, незалежно від зовнішніх кліматичних умов, у приміщеннях для лабораторних тварин повинні підтримуватися на необхідному рівні основні показники мікроклімату – температура і вологість повітря, кратність повітрообміну, тиск і швидкість руху повітря, вміст у ньому шкідливих газів, рівень шуму, освітленість, які повинні постійно контролюватися і при необхідності – коригуватися (табл. 1.1). Показники приладів реєструються у спеціальному журналі.



Рис. 1.1. Загальний вигляд «чистої» зони віварію

Внутрішній тиск у приміщеннях бар'єрного типу повинен перевищувати зовнішній тиск на 10–15 мм водяного стовпа. При роботі з інфекційним матеріалом у приміщеннях з тваринами створюють тиск повітря на 5–10 мм водяного стовпа нижчий за тиск у суміжних приміщеннях і коридорах.

Режим освітлення в приміщеннях для лабораторних тварин підтримується автоматично. Рекомендується поступовий перехід (30–60 хв) від світла до темряви і навпаки. Під час роботи персоналу інтенсивність освітлення треба збільшувати до 300–400 лк.

У приміщеннях з експериментально інфікованими тваринами передбачається система фільтрів грубого і тонкого очищення повітря, як на приточній, так і на витяжній системах вентиляції. За допомогою фільтрів грубого очищення з повітря видаляється 80–95 % часток розміром більше 5 мкм. Фільтри тонкого очищення затримують до 99,97 % всіх аерогенних часток розміром менше 5 мкм. У приміщеннях для утримання лабораторних тварин повітря повинне очищатися, як мінімум, фільтрами грубого очищення.

Таблиця 1.1. Основні параметри мікроклімату у віварії

Вид тварин	Температура, °С	Відносна вологість, %	Освітленість, лк (1 м від підлоги)	Фотоперіод (світло:темрява)	Рівень шуму, дБ (не більше)	Повітрообмін, кратн. за годину	Швидкість руху повітря, м/с	Вміст аміаку, ррм	Вміст вуглекислого газу
Миші	20–24	55	200	12:12	40–50	10–15	0,3	10	0,15 % до об'єму повітря
Щури	20–24	55	200	12:12	40–50	10–15	0,3	10	–/–
Хомяки	20–24	55	200	14:10	40–50	10–15	0,3	10	–/–
Мурчаки	20–21	55	200	12:12 16:08	40–50	10–15	0,3	10	–/–
Кролі	15–21	55	200	16:08 12:12	40–50	10–15	0,3	10	–/–
Кішки	15–21	55	150	12:12	40–50	10–15	0,2	10	–/–
Собаки	15–21	55	200	12:12	40–50	8–12	0,3	10	–/–

## 2. Основні вимоги до утримання лабораторних тварин

Науково-дослідні, науково-виробничі, навчальні і виробничі установи, що використовують у своїй роботі лабораторних тварин, організації-споживачі, незалежно від відомчої підпорядкованості і форми власності, повинні бути зареєстровані офіційним державним контролюючим органом і одержати від нього дозвіл на право проведення робіт з використанням лабораторних тварин. Лабораторні тварини – різні види тварин, яких спеціально розводять в умовах лабораторій або розплідників і використовують з експериментальною чи виробничою метою: для діагностики захворювань, моделювання різноманітних фізіологічних і патологічних станів, вивчення фармакологічної активності та токсичності лікувально-профілактичних препаратів, хімічних та фізичних факторів, контролю якості виробництва діагностичних сироваток, вакцин, культур тканин тощо. Використання тварин у досліджах має здійснюватись у відповідності до чинних біоетичних норм і вимог, передбачених ЗУ «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей»

В дослідженнях найчастіше використовують:

- ✚ лабораторні тварини – кролі, мурчаки, білі миші, щури, рідше – земноводні;
- ✚ домашні тварини – птахи, собаки, кішки, свині, вівці, кози, рідше – велика рогата худоба, коні тощо.

Частіше використовують лабораторних тварин. Доведено, що результативність біологічного дослідження у великій мірі залежить від правильного підбору піддослідних тварин. Вимоги до використання лабораторних тварин постійно

зростають як при організації розведення та утримання лабораторних тварин, так і їх використання відповідно до чинних вимог. Ці вимоги залежать від завдань, які поставлені перед дослідником. Якщо для проведення дослідів, які вимагають отримання надзвичайно точних результатів, то в досліді підбирають лінійних тварин, які відповідають міжнародним стандартам. За цих умов вдається отримати високо достовірних результатів за використання порівняно невеликих груп тварин, що важливо в дотриманні принципу гуманного поводження з лабораторними тваринами. Проте вартість таких тварин і, відповідно, проведеного дослідів з їх використанням, зростає.

Лабораторні тварини у віварії повинні бути забезпечені:

- + повноцінні годівля та догляд;
- + підтримка нормального стану здоров'я;
- + утримання у відповідних для кожного виду нормативних умовах;
- + можливість задоволення фізіологічних і поведінкових потреб;
- + щоденний контроль умов утримання;
- + швидке усунення недоліків і факторів, що можуть викликати стрес і страждання тварин.

У кожному приміщенні рекомендується утримувати тварин тільки одного виду. На кожній клітці (боксі, вольєрі) повинна бути етикетка з наведеними даними про тварину та інша спеціальна інформація (рис. 1.2).



Рис. 1.2. Бокс для утримання лабораторних тварин (мишей, щурів, мурчаків)

Обслуговування одним працівником тварин різного виду в розпліднику забороняється. У випадку, коли одним працівником обслуговуються невеликі групи тварин різних видів, слід дотримуватися наступної послідовності у роботі: мурчаків, миші, щури, кролі.

Багато постійне закріплення персоналу за визначеними приміщеннями і для виконання визначених технологічних процедур. На кожен секцію чи однорідну групу приміщень призначається відповідальна людина, що несе адміністративну відповідальність за дотриманням правил утримання і режиму роботи.

Персонал, що обслуговує тварин, повинен систематично виконувати наступні види робіт:

- ✚ щодня до початку робіт оглядати клітки з метою виявлення хворих чи загиблих тварин, пологів; реєструвати народження і усі випадки загибелі тварин у формах (журнал) первинного обліку; вибракувати хворих тварин; загиблих і вибракуваних хворих тварин передавати на дослідження в контрольню-дослідну лабораторію;
- ✚ систематично вибракувати племінних і підсисних тварин, поповнювати вибракуваних племінних тварин;
- ✚ проводити вилучення від самки-матері молодняку по закінченні підсисного періоду (миші, щури – 28–31 день; хом'яки – 21–28 днів; мурчаки – 27–29 днів; кролі – 40–45 днів; кішки – 52–56 днів; собаки – 45 днів) і формувати групи з молодняку за статтю;
- ✚ щотижня міняти брудні клітки на чисті (при необхідності частіше);
- ✚ заповнювати свіжою водою пляшки для поїння з таким розрахунком, щоб тварини були постійно забезпечені питною водою;
- ✚ заповнювати кормом годівниці з таким розрахунком, щоб була забезпечена постійна наявність кормів досхоchu;
- ✚ щодня записувати показники температури і вологості повітря в приміщенні;
- ✚ щодня проводити вологе прибирання приміщення з використанням деззасобів;
- ✚ щодня дезінфікувати обладнання, яке використовується в роботі: підсобні візки, ваги, відра, бачки для корму (після випорожнення), кормороздавальні лопатки, пінцети і ножиці (після кожного використання);
- ✚ щодня заповнювати етикетки і зведення про рух поголів'я.

Підстилка для лабораторних тварин повинна відповідати вимогам технічних умов. У якості підстилки використовують стружку чи дрібну щепу з екологічно чистої деревини листяних порід; форма і розмір часточок можуть бути різними: довжина – 5–20 мм, товщина – 1–2 мм, максимальна вологість – 12 %.

Живлення тварин є найважливішим чинником для підтримки нормального стану здоров'я і стандартності лабораторних тварин, а також для одержання порівнянних і відтворюваних результатів експерименту. Годівля лабораторних тварин усіх категорій (мишей, щурів, хом'яків, мурчаків, кішок, собак) повинна здійснюватися повнораціонним гранульованим комбікормом, виготовленим у відповідності зі стандартами, для забезпечення фізіологічних потреб організму в поживних, мінеральних речовинах, вітамінах, мікроелементах, енергії і виключає необхідність введення у корм додаткових інгредієнтів. Дієти розраховують з урахуванням видових і фізіологічних

(розведення, дорощування, дорослий стан) особливостей тварин. Для кожного виду тварин спеціально виробляються і використовуються стандартні повнораціонні гранульовані корми. Для годівлі мишей і щурів використовують той самий корм, що й для годівлі хом'яків. Часом використовують дієти, що враховують генетичні особливості метаболізму окремих ліній тварин. Годівля тварин повинна здійснюватися однаковим кормом при їх розведенні і використанні в експериментах.



## **Заняття 2. ВИДІЛЕННЯ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН**

### **Теоретичні положення**

Основа функціонування імунної системи тварин полягає у забезпеченні двох процесів: утворенні імунокомпетентних клітин і секреції гуморальних продуктів для розпізнавання і знищення усього чужорідного.

Головною клітиною організму тварини, яка визначає неспецифічні і специфічні функції та загалом роботу імунної системи, є лейкоцит у всьому різномаятті його популяцій і субпопуляцій.

Усі імунокомпетентні клітини ссавців і птиці утворюються і дозрівають у центральних органах імуногенезу. Їх родоначальником є гемопоетична стовбура клітина, яка володіє властивістю до самовідновлення. Гемопоетичні стовбурові клітини кісткового мозку залежно від шляху розвитку можуть диференціюватися у двох напрямках: у попередників лімфоїдних (Т-, В-лімфоцити і натуральні кілери) або міелоїдних (моноцити, нейтрофіли, еозинофіли і базофіли) клітин. Тому морфологічно розрізняють п'ять типів лейкоцитів: лімфоцити, моноцити, нейтрофіли, еозинофіли і базофіли.



### **Завдання 1. Виділити лімфоцити з крові щурів за методом А. Воуна**

### **Теоретичні положення**

З огляду на те, що імунопатологічні зміни в ході розвитку запальної реакції чи якогось іншого патологічного процесу досить інформативно характеризуються змінами абсолютної кількості окремих субпопуляцій лімфоцитів та їх функціонального стану, першим етапом багатьох імунологічних досліджень у ветеринарії є виділення цих клітин з крові тварин.

Лімфоцити, зокрема, використовуються для визначення співвідношення та загальної кількості їх субпопуляцій (метод розеткоутворення з еритроцитами барана чи миші), диференціальних антигенів клітинної мембрани, головного комплексу гістосумісності (змішана лімфоцитарна реакція) тощо.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою виділення лімфоцитів з крові тварин у градієнті щільності.

**Обладнання та матеріали:** стабілізована антикоагулянтами кров щурів, світловий мікроскоп, камера Горяєва, 3 %-ий розчин оцтової кислоти, розчин фікол-тріомбразу, стерильні пластикові чи скляні пробірки різного об'єму, піпетки, автоматичні дозатори, стерильне середовище 199 чи фізіологічний розчин.

**Принцип методу.** Метод отримання лімфоцитів з допомогою градієнта щільності ґрунтується на тому, що лімфоцити, на відміну від еритроцитів та гранулоцитів (нейтрофілів і еозинофілів), які мають високу щільність, не здатні пройти крізь шар градієнту, який має більшу щільність, ніж самі клітини. Під час центрифугування вони зависають у пробірці над шаром градієнту у вигляді тонкого кільця (рис. 1.3).

Лімфоцити крові щурів отримують шляхом центрифугування проб стабілізованої гепарином крові у фікол-тріомбразовому градієнті щільності з показником  $\rho = 1,077$ .

Фікол-тріомбразовий градієнт щільності готують шляхом змішування розчинів фіколу (А) та тріомбразу (Б). Розчин А готують додаванням 8,64 г фіколу в колбу з 96 мл дистильованої води, підігрітої до 50–70 °С. Колбу поміщують у водяну баню до повного розчинення фіколу. Розчин Б: 20,28 мл 76%-ого розчину тріомбразу доводять дистильованою водою до 42 мл. Після змішування розчинів щільність отриманої суміші визначають з допомогою аерометру. У випадку високої щільності суміш розводять дистильованою водою, низької – додають тріомбраз.

### **Хід роботи.**

1. У центрифужні пробірки об'ємом 15 см<sup>3</sup> налити 3 мл розчину фікол-тріомбразу, пробірки об'ємом 50 см<sup>3</sup> – 20 мл.

2. На суміш фікол-тріомбразу обережно автоматичним дозатором з пластиковим наконечником нашарувати залежно від об'єму пробірки 6 – 20 мл гепаринізованої крові, розведену 1:1 середовищем 199 чи фізіологічним розчином.

3. Зразки центрифугувати в горизонтальній центрифuzі протягом 25 хв при відцентровій силі 300 g. Після центрифугування еритроцити і гранулоцити осідають на дно пробірки, над ними знаходиться шар фіколу-тріомбразу. На верхній його межі утворюється кільце білого кольору, яке складається в основному з лімфоцитів (мононуклеарних клітин, МНК) та невеликої кількості моноцитів (до 2 %). Над шаром лімфоцитів знаходиться плазма (рис. 1.3).

4. Автоматичним дозатором з верхньої межі фікол-тріомбразу відібрати лімфоцити у центрифужну пробірку.

5. До суспензії лімфоцитів додати 5 мл середовища 199 чи фізіологічного розчину та ретельно ресуспензувати.

6. Отриману суспензію лімфоцитів відцентрифугувати протягом 10 хв при відцентровій силі 300 g.

7. Злити надосадову рідину. Відмивання лімфоцитів таким же способом повторити двічі.

8. Після заключного центрифугування злити супернатант, а до осаду додати 0,9 мл середовища 199.

9. З отриманої 1 мл суспензії лімфоцитів після ресуспензування відібрати 0,02 мл та внести в пробірку з 0,38 мл 3 %-ого розчину оцтової кислоти. З отриманого розведення лімфоцитів піпеткою відібрати клітинну завесь та заправити камеру Горяєва для підрахунку.

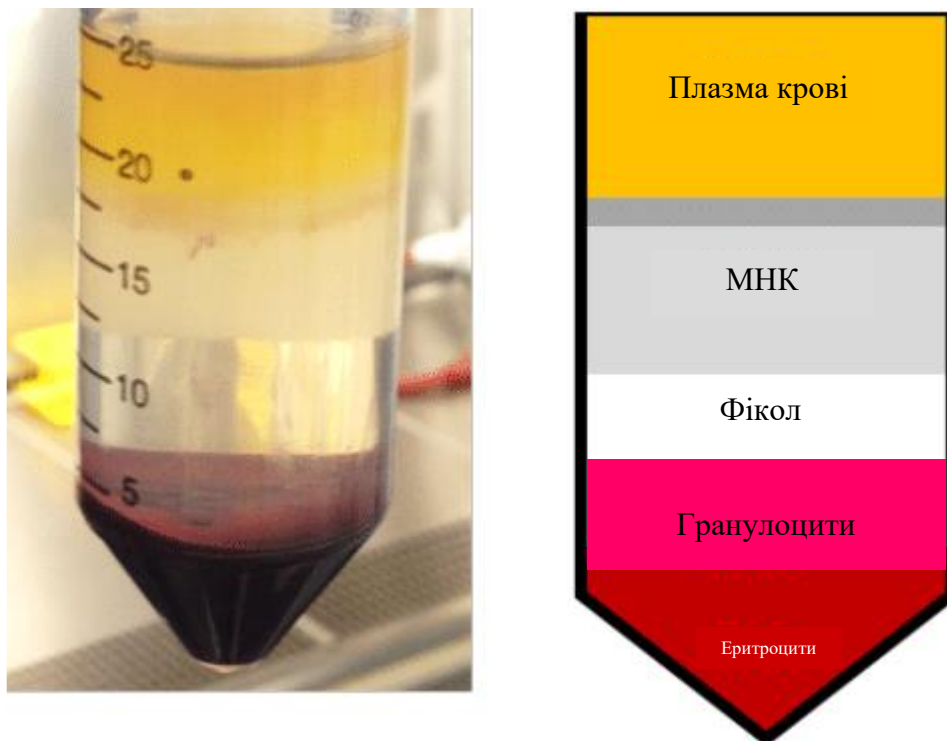


Рис. 1.3. Схематичне зображення розміщення складників крові у пробірці після її розшарування

10. Підрахувати лімфоцити у 100 великих квадратах. Для визначення концентрації клітин в 1 мл суспензії отримане число помножити на 50 .

11. Стандартна суспензія лімфоцитів має містити  $2 \times 10^6$  клітин в 1 мл. Якщо в досліджуваному зразку клітин виявилось більше – розрахувати, скільки необхідно додати середовища 199, щоб отримати робочу концентрацію клітин. Для цього число клітин, отримане при підрахунку, слід поділити на  $2 \times 10^6$ .

*Приклад:* при підрахунку встановлено, що в 1 мл суспензії міститься  $5 \times 10^6$  лімфоцитів. Розраховуємо, скільки необхідно додати середовища 199:

$$5 \times 10^6 / 2 \times 10^6 = 2,5;$$
$$2,5 - 1 = 1,5$$

Відповідно, щоб отримати робочу концентрацію лімфоцитів, до 1 мл отриманої суспензії необхідно додати 1,5 мл середовища 199.

Якщо лімфоцитів виявилось менше  $2 \times 10^6$  у 1 мл, слід провести центрифугування проби і до осаду додати необхідний об'єм середовища 199, розрахований по пропорції.

*Приклад:* при підрахунку встановлено, що в 1 мл суспензії міститься  $0,6 \times 10^6$  лімфоцитів. Розраховуємо, скільки необхідно додати середовища 199 після повторного центрифугування:

$$\begin{array}{ll} 1 \text{ мл} - 2 \times 10^6 \text{ клітин} & \\ X \text{ мл} - 0,6 \times 10^6 \text{ клітин} & X = 0,3 \text{ мл} \end{array}$$

Відповідно, щоб отримати робочу концентрацію лімфоцитів, до осаду клітин (0,1 мл) необхідно додати 0,2 мл середовища 199.

12. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Проаналізувати процедуру виділення лімфоцитів, звертаючи увагу на значення ємнісної характеристики клітин при їх розділенні у градієнті щільності.



### **Завдання 2. Виділити нейтрофіли з крові щурів у градієнті щільності фікол-тріомбразу**

#### **Теоретичні положення**

Нейтрофіли – одна з найбільш ємнісних популяцій лейкоцитів крові тварин. Основна роль нейтрофілів полягає у реалізації механізмів вродженого імунітету. Найважливішою функцією нейтрофілів є знищення чужорідних клітин або інших чужорідних агентів шляхом фагоцитозу. За виключенням гострого сепсису і запалення судинної стінки, свою ефекторну функцію нейтрофіли здійснюють у тканинах після виходу із судинного русла.

З огляду на це, виділення нейтрофілів є важливим етапом імунологічних досліджень стану вродженого імунітету, зокрема їх локомоторних функцій (хемотаксису) та функціональної активності.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою виділення нейтрофілів з крові тварин у градієнті щільності.

**Обладнання та матеріали:** стабілізована антикоагулянтами кров щурів, світловий мікроскоп, камера Горяєва, розчин фікол-тріомбразу, стерильні пластикові чи скляні пробірки різного об'єму, піпетки, автоматичні дозатори, стерильне середовище 199 чи фізіологічний розчин, дистильована вода, 1,8 %-ий розчин NaCl.

**Принцип методу.** Метод отримання нейтрофілів з допомогою градієнта щільності фікол-тріомбразу ґрунтується на різній щільності клітин крові, які відрізняються між собою слідуєчим чином: еритроцити > нейтрофіли і еозинофіли > лімфоцити, моноцити, базофіли > тромбоцити. При цьому еритроцити, нейтрофіли і еозинофіли проходять крізь градієнт щільності ( $\rho = 1,077$ ), а інші клітини – ні. Після центрифугування нейтрофіли знаходяться на дні пробірки над еритроцитами у вигляді кільця світлого кольору.

#### **Хід роботи.**

1. Приготувати фікол-тріомбразовий градієнт щільності ( $\rho = 1,077$ ).
2. У центрифужні пробірки об'ємом 15 см<sup>3</sup> налити 3 мл розчину фіколу-тріомбразу.
3. На суміш фіколу-тріомбразу обережно автоматичним дозатором з пластиковим наконечником нашарувати 6 мл гепаринізованої крові, розведена 1:1 середовищем 199 чи фізіологічним розчином.
4. Зразки центрифугувати в горизонтальній центрифугі протягом 25 хв при відцентровій силі 300 g. Після центрифугування еритроцити і гранулоцити (переважно нейтрофіли) осідають на дно пробірки, над ними знаходиться шар фіколу-тріомбразу. На верхній його межі утворюється кільце білого кольору, яке складається в основному з лімфоцитів та невеликої кількості моноцитів. Над шаром лімфоцитів знаходиться плазма.
5. Обережно піпеткою відібрати шар гранулоцитів, який знаходиться над еритроцитами у вигляді кільця світлого кольору, та перенести у стерильну пробірку.
6. З метою отримання популяції гранулоцитів (переважно нейтрофілів) без домішки еритроцитів провести гіпотонічний шок, як описано у завданні 4 даного заняття.
7. Підрахувати кількість гранулоцитів у камері Горяєва. У отриманій лейкозависі частка нейтрофілів має складати близько 90 %.

8. Результати підрахунку занести до протоколу заняття. Проаналізувати процедуру виділення нейтрофілів, звертаючи увагу на значення ємнісної характеристики клітин при їх розділенні у градієнті щільності.



### Завдання 3. Приготувати суспензію еритроцитів тварин

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою приготування суспензії еритроцитів барана (з метою визначення кількості Т- і В-лімфоцитів у крові тварин) та їх зберігання.

**Обладнання та матеріали:** свіжоотримана кров барана, середовище 199 чи фізіологічний розчин, стерильні пластикові або скляні колби ємністю 50 мл, стерильні скляні кульки діаметром 5–7 мм, стерильні пластикові чи скляні пробірки, шприци з голками, піпетки, центрифуга, розчин Олсвера, формалін.

**Хід роботи.** Еритроцити отримують від клінічно здорової тварини (барана).

1. Дефібринувати свіжоотриману кров барана.
2. Дефібриновану кров тричі відмити фізіологічним розчином, центрифугуючи у пробірках протягом 10 хвилин при 300 g доти, доки надосадова рідина не стане безбарвною (зазвичай 2–3 рази).
3. Для приготування 0,5 %-ої суспензії до 5 мл середовища 199 додати 0,025 мл осаду еритроцитів; 1 %-ої суспензії – 0,05 мл осаду еритроцитів; 2,5 %-ої суспензії – 0,125 мл осаду еритроцитів; 3,0 %-ої суспензії – 0,15 мл осаду еритроцитів. Суспензію еритроцитів зберігають за температури 4–12 С<sup>0</sup> не більше 3 год., перед використанням збовтують.
4. Для зберігання еритроцитів за температури 4–12 С<sup>0</sup> протягом 1–2 тижнів використати розчин Олсвера. Для його приготування на 100 мл розчину взяти 0,8 г трьохзаміщеного цитрату натрію; 0,42 г –NaCl; 2,05 г – глюкози; решта – дистильованої води. рН цього розчину встановлюють рівним 6,1 за допомогою 10%-ного розчину лимонної кислоти.
5. Для тривалого зберігання еритроцитів без погіршення функціональної здатності протягом 12 місяців змішати їх з розчином Олсвера чи фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1, і до 10 мл отриманої суміші додати 100 мкл формаліну, перемішати і зберігати при 1–4 С<sup>0</sup>. У цьому випадку еритроцити перед використанням 5 разів відмивають фізіологічним розчином.
6. Результати роботи занести до протоколу заняття. Проаналізувати методику приготування суспензії еритроцитів барана.



#### **Завдання 4. Отримати лейкоконцентрат шляхом гемолізу еритроцитів цільної крові (мікрометод)**

##### **Теоретичні положення**

Лейкоцитарний концентрат – трансфузійне середовище з високим вмістом лейкоцитів (у 4–8 разів більшим, ніж у периферичній крові), а також з домішкою еритроцитів та тромбоцитів. Лейкоконцентрат отримують кількома методами: 1) центрифугуванням цільної консервованої крові з подальшим відділенням плазми та лізуванням еритроцитів; 2) методом осадження еритроцитів цільної консервованої крові за допомогою колоїдних речовин та відділенням плазми, збагаченої лейкоцитами; 3) методом лейкоферезу із застосуванням пластикових мішків або спеціальних апаратів-сепараторів безперервної дії, які підключаються через системи з голками до вен донора на 3–4 години та витягують лейкоцити з периферичної крові; 4) методом фільтраційного лейкоферезу (гепаринізовану кров пропускають через нейлонові фільтри, що затримують гранулоцити).

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою отримання лейкоконцентрату шляхом гемолізу еритроцитів цільної крові тварин.

**Обладнання та матеріали:** свіжоотримана суспензія імунокомпетентних клітин або стабілізована антикоагулянтом кров тварин, світловий мікроскоп, камера Горяєва, стерильні пластикові чи скляні пробірки різного об'єму, піпетки, центрифуга, дистильована вода, 1,8 %-ий розчин NaCl, середовище 199.

**Принцип методу.** Еритроцити в умовах гіпотонії набрякають та лізуються, лейкоцити залишаються неушкодженими. Даний спосіб використовують у випадку отримання малого об'єму крові (до 0,5 мл).

##### **Хід роботи.**

1. Відцентрифугувати свіжоотриману та стабілізовану антикоагулянтом кров у центрифужній пробірці протягом 10–15 хв при 300 g.

2. Злити плазму, осад клітин протягом 30–40 секунд ресуспензувати у 2 мл дистильованої води.

3. До суспензії клітин швидко додати рівний дистильованій воді об'єм (2 мл) 1,8 %-ого фізіологічного розчину та знову ресуспензувати.

4. Відцентрифугувати суспензію імунокомпетентних клітин у центрифужній пробірці протягом 10–15 хв при 300 g. Осад клітин не повинен містити еритроцитів, у чому можна пересвідчитись візуально, оцінивши колір самого осаду та його клітинний склад під мікроскопом у камері Горяєва.

5. До отриманого осаду лейкоцитів додати середовище 199 в кількості вихідного об'єму крові. Підрахувати кількість лейкоцитів в камері Горяєва. При

необхідності збільшити концентрацію клітин необхідно їх суспензію відцентрифугувати і видалити надлишок рідини, при необхідності зменшити концентрацію клітин – додати потрібну кількість рідини. Вихід лейкоцитів після гемолітичного шоку і відмивання повинен складати не менше 70–80%.

6. Результати роботи занести до протоколу заняття. Проаналізувати методику отримання лейкоконцентрату шляхом гемолізу еритроцитів цільної крові, звертаючи увагу на значення осмотичного тиску середовища.



### **Завдання 5. Отримати лейкоконцентрат шляхом осадження еритроцитів за допомогою розчину желатину (макретод)**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою отримання лейкоконцентрату шляхом осадження еритроцитів за допомогою розчину желатину.

**Обладнання та матеріали:** стабілізована антикоагулянтном кров, світловий мікроскоп, 10 %-й розчин желатину, камера Горяєва, стерильні пластикові чи скляні пробірки різного об'єму, піпетки, центрифуга, водяна баня, дистильована вода, 1,8 %-ий розчин NaCl, середовище 199.

**Принцип методу.** Під дією желатину еритроцити склеюються у «монетні стовпці» і швидко осідають. Еритроцити аглютинують і осідають також спонтанно, але даний спосіб потребує у 1,5–2 рази більше часу, ніж при використанні желатину. Даний метод отримання лейкоконцентрату використовують переважно у випадку отримання достатнього об'єму крові (до 3–5 мл).

#### **Хід роботи.**

1. До стабілізованої антикоагулянтном крові у центрифужну пробірку додати 10 %-ий розчин желатину, щоб його кінцева концентрація складала 1 %.

2. Кров перемішати і витримати у водяній бані за температури 37 °С протягом 15–20 хвилин.

7. Після осідання еритроцитів плазму з лейкоцитами перенести у іншу пробірку і відцентрифугувати протягом 10–15 хв при 350 g.

3. Видалити плазму. У випадку наявності домішки еритроцитів у осаді лейкоцитів – лізувати їх гіпотонічним шоком, як описано у завданні 4.

4. Результати роботи занести до протоколу заняття. Проаналізувати методику отримання лейкоконцентрату шляхом спонтанного осадження еритроцитів або склеювання їх розчином желатину, звертаючи увагу на здатність желатину аглютинувати еритроцити.



## Завдання 6. Отримати перитонеальні макрофаги у мишей

### Теоретичні положення

Макрофаги належать до клітин неспецифічної імунної відповіді та існують практично у всіх органах і тканинах тваринного організму. Як відомо, попередниками макрофагів є моноцити периферичної крові.

Функції макрофагів включають в себе клінінг мікробів, заражених збудниками клітин, пухлинних клітин, секрецію імуномодулюючих цитокінів, антигенну обробку і представлення антигенів для Т-лімфоцитів. Поряд з дендритними клітинами макрофаги відіграють вирішальну роль в ініціюванні імунної відповіді. Як секреторні клітин, макрофаги життєво важливі для регуляції імунної відповіді і розвитку запалення, адже вони виробляють широкий спектр потужних хімічних речовин – монокінів, та інших факторів, включаючи ферменти, білки комплементу і регуляторні цитокіни, зокрема інтерлейкін-1. Тому отримання суспензії макрофагів та подальше визначення їх функціональної активності *in vitro* досить чітко відобразить стан неспецифічної резистентності організму тварини. Зокрема, перитонеальні макрофаги можуть бути використані для вивчення їх функціональної активності у моделі фагоцитозу *in vitro*, дослідження можливості активації фагоцитарних клітин і клітинного імунітету синтетичними поліелектролітами, антиоксидантами тощо та розробки на основі отриманих даних імуностимулюючих препаратів.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою виділення перитонеальних макрофагів у мишей.

**Обладнання та матеріали:** лабораторні миші, середовище RPMI–1640, ембріональна сироватка теляти, гепарин, світловий мікроскоп, камера Горяєва, стерильні пластикові чи скляні пробірки різного об'єму, шприци з голками, піпетки, центрифуга.

**Хід роботи.** Клітини перитонеального ексудату (макрофаги) одержують з черевної порожнини мишей. Для цього необхідно:

1. Зафіксувати мишу у положенні головою донизу.
2. З допомогою стерильної голки та шприца промити черевну порожнину 3,5 мл розчину, який містить 89 % середовища RPMI–1640, 10 % ембріональної сироватки теляти і 1 % гепарину (5 од/мл).
3. Промасажувати живіт тварини протягом 1–2 хвилин.
4. З допомогою стерильної голки та шприца одержати від кожної дослідної тварини по 2,0–3,5 мл промивної рідини та помістити у стерильну центрифужну пробірку.
5. Відцентрифугувати промивну рідину протягом 10 хв при 300 g.
6. Злити надосадову рідину, а до осаду клітин додати середовище

RPMI–1640 та ресуспендувати.

7. Відцентрифугувати суспензію клітин протягом 10 хв при 300 g. Додавання до осаду клітин середовища RPMI–1640, ресуспензування та центрифугування повторити двічі.

8. Після останнього центрифугування злити надосадову рідину, а до осаду клітин додати 1 мл середовища RPMI–1640, розпіпетувати та провести підрахунок клітин (макрофагів) у камері Горяєва.

9. У випадку наявності у суспензії макрофагів домішки еритроцитів провести гіпотонічний шок, як описано раніше.

9. До осаду клітин додати відповідне середовище для подальшого використання у дослідженнях.

10. Результати підрахунку макрофагів занести до протоколу заняття. Проаналізувати методику виділення перитонеальних макрофагів у мишей.



### **Завдання 7. Виділити Т-лімфоцити (тимоцити) з тимусу у мишей**

#### **Теоретичні положення**

Тимус – центральний орган імунної системи, у якому відбувається дозрівання Т-лімфоцитів з клітин-попередниць, утворених у червоному кістковому мозку. Зрілі Т-лімфоцити здатні розпізнавати чужорідні антигенні пептиди в комплексі з власними молекулами головного комплексу гістосумісності на поверхні антигенпрезентуючих клітин, запускаючи таким чином імунну відповідь проти антигену.

Лімфоцити, які знаходяться в тимусі, називають тимоцитами. Їх отримують з метою дослідження *in vitro* цитотоксичної активності по відношенню до чужорідних клітин (наприклад, пухлинних), взаємодії з антигенпрезентуючими клітинами – макрофагами (на основі визначення вмісту у супернатанті певних біологічно активних речовин), впливу на дані імунокомпетентні клітини іонізуючого випромінювання, інших інгібуючих та стимулюючих їх функціональну активність факторів тощо.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою виділення Т-лімфоцитів з тимусу у мишей.

**Обладнання та матеріали:** лабораторні миші, ефір, пінцет, ножиці, чашка Петрі, льод, скальпель, 70 %-ий етанол, середовище Ігла або 199, світловий мікроскоп, капронові фільтри, піпетки, камера Горяєва.

#### **Хід роботи.**

1. Після наркотизування ефіром тушку миші покласти на спину, обробивши спиртом черевну сторону, зробити розріз шкіри по середині тулуба уздовж всього тіла.

2. Зафіксувати препарувальними голками шкіру, розкривши м'язову поверхню черевної сторони тулуба.
3. Зробити два розрізи ножицями уздовж середньої лінії грудної клітки з лівого і правого боків майже до ключиці. Відстань між розрізами має становити близько 3–4 мм.
4. Підрізаний клапоть відігнути пінцетом, розкривши грудну клітку. Має бути добре видно дві довгасті часточки білуватого тимусу, який лежить на серці. У верхній частині тимус прикріплений до навколишньої тканини.
5. Пінцетом слід обережно від'єднати тимус від тканини. Дуже важливо не перерізати яку-небудь кровоносну судину, оскільки у цьому випадку виділення тимуса буде ускладнено.
6. Помістити виділений тимус у стерильну чашку Петрі, яка має бути розташована на льоду. Потім за допомогою скальпеля і пінцета очистити тимус від сполучної капсули (при цьому він розділиться на дві часточки).
7. Гомогенізувати тимус у охолоджену стерильному середовищі Ігла чи 199, а отриману суспензію профільтрувати через два чотирьохшарових капронових фільтри.
8. Провести підрахунок клітин тимуса (timoцитів) у камері Горяєва. Зазвичай від однієї інтактної миші виходить до 80 млн тимоцитів.
9. Результати підрахунку тимоцитів занести до протоколу заняття. Проаналізувати методику виділення тимоцитів з тимусу у мишей та зробити висновки.



### **Завдання 8. Виділити клітини селезінки (спленоцити) у мишей**

#### **Теоретичні положення**

Селезінка – периферичний орган імуногенезу тварин, у якому відбуваються презентація антигенів для Т-лімфоцитів та антигензалежна проліферація та диференціювання В-лімфоцитів у плазматичні клітини та синтез ними антитіл. Імунокомпетентні клітини лімфоїдного (Т- та В-лімфоцити) та міелоїдного (макрофаги, дендритні клітини) рядів, отримані з селезінки, називають спленоцитами. Переважна більшість спленоцитів представлена лімфоцитами.

Спленоцити отримують з метою дослідження *in vitro* механізмів кооперації Т- і В-лімфоцитів під час антигенного стимулу, цитотоксичної активності лімфоцитів по відношенню до чужорідних клітин, визначення рівня продукованих спленоцитами цитокінів під впливом імуномодуляторів тощо.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою виділення клітин селезінки (спленоцитів) у мишей.

**Обладнання та матеріали:** лабораторні миші, ефір, пінцет, ножиці, чашка Петрі, льод, скальпель, 70 %-ий етанол, середовище Ігла або 199, світловий мікроскоп, капронові фільтри, піпетки, камера Горяєва.

### **Хід роботи.**

1. Після наркотизування ефіром тушку миші покласти на препарувальний столик на правий бік та обробити лівий бік спиртом.

2. У районі «талії» тварини ножицями зробити поперечний розріз шкіри завдовжки 2–2,5 см зліва від середини тулуба, потім розріз відкрити пінцетом. Через тонкий м'язовий шар має проглядатися темно-бордова кольору селезінка.

3. Зробити розріз м'язів, пінцетом дістати селезінку, обережно відрізати ножицями сполучні тяжі і помістити її у стерильну чашку Петрі на льоду.

4. Звільнити селезінку від залишків сполучної тканини і гомогенізувати в охолоджену середовищі.

5. Суспензію профільтрувати через чотирьохшаровий капроновий фільтр.

6. Провести підрахунок спленоцитів у камері Горяєва. Селезінка однієї інтактної миші містить 120–130 млн В- і Т-лімфоцитів (співвідношення ~ 55 і 35 % відповідно).

10. Результати підрахунку спленоцитів занести до протоколу заняття. Проаналізувати методику виділення спленоцитів у мишей та зробити висновки.



### **Завдання 9. Виділити лімфоцити із лімфатичних вузлів у мишей**

#### **Теоретичні положення**

Лімфатичні вузли – периферичні органи імуногенезу, паренхіма яких сформована лімфоїдною тканиною з численними кровоносними судинами, та розміщена між перегородками (трабекулами), які відходять від капсули. Лімфоїдна тканина містить ретикулоендотеліоцити (формують сітчасту структуру лімфовузла), лімфоїдні і антигенпрезентуючі клітини. У лімфатичних вузлах, як і інших периферичних органах імуногенезу, відбуваються антигензалежна проліферація та диференціювання Т- і В-лімфоцитів.

Клітини лімфатичних вузлів отримують з тією ж метою, що і тимоцити та спленоцити.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою виділення лімфоцитів із лімфовузлів у мишей.

**Обладнання та матеріали:** лабораторні миші, ефір, пінцет, ножиці, чашки Петрі, льод, скальпель, 70 %-ий етанол, середовище Ігла або 199,

світловий мікроскоп, капронові фільтри, піпетки, камера Горяєва, препарувальні голки.

### **Хід роботи.**

1. Після наркотизування ефіром тушку миші покласти на спину, обробивши спиртом черевну сторону, зробити один розріз шкіри по середині тулуба уздовж всього тіла та чотири менших розрізи у напрямку внутрішньої сторони лапок.

2. Оголити увесь тулуб, обережно відокремити шкіру від шиї до хвоста, і зафіксувати шкіру препарувальними голками.

3. У районі локалізації слинних залоз знайти ланцюжок підщелепних лімфатичних вузлів (вони бобовидної форми білувато-блискучого кольору та розміром 2–3 мм). За допомогою пінцету і ножиць відокремити лімфовузли від прилеглих тканин і помістити у розташовану на льоду чашку Петрі зі стерильним середовищем 199.

4. З лівої і правої сторін тулуба (приблизно 1,5–2 см від пахової западини) під плечовим суглобом з внутрішньої сторони шкіри відшукати пахові лімфовузли, до яких радіально тягнуться кровоносні і лімфатичні судини. За допомогою пінцету відділити лімфовузли та помістити у ту ж чашку Петрі, що і піщелепні вузли.

5. Пінцетом видалити правий і лівий пахові лімфовузли задніх лапок і перенести їх у чашку Петрі на льоду. Місце розташування цих лімфовузлів також легко виявити за радіально підведеними судинами.

6. У колінному згині задніх лапок виділити підколінні лімфовузли і помістити у ту ж чашку Петрі.

7. Розкрити очеревину, пінцетом виїняти шлунок і кишечник, знайти брижу, яка утримує тяжами відділи кишечника, та з допомогою пінцету виділити брижові лімфовузли, які розташовані вздовж кишечника. Витягнуті лімфовузли помістити у чашку Петрі.

8. Усі лімфовузли очистити від залишків сполучної тканин. Дану процедуру слід проводити особливо ретельно, оскільки залишки сполучної тканини різко погіршують якість одержуваної клітинної суспензії. Всі маніпуляції обов'язково проводити на холоді, можна в тій же чашці Петрі.

9. Відпрепаровані лімфовузли гомогенізувати у охолоджену середовищі, пропустити через стерильний капроновий чотирьохшаровий фільтр.

10. Провести підрахунок клітин лімфовузлів у камері Горяєва. Від однієї інтактної миші можна отримати до 50 млн клітин лімфовузлів, які містять Т- і В-лімфоцити у співвідношенні 65 і 35 % відповідно.

11. Результати підрахунку лімфоцитів занести до протоколу заняття. Проаналізувати методику виділення клітин (лімфоцитів) із лімфовузлів у мишей та зробити висновки.



## **Завдання 10. Визначити життєздатність імунокомпетентних клітин**

### **Теоретичні положення**

Як відомо, клітини ссавців не мають типової для мікроорганізмів клітинної стінки, яка здатна забезпечувати їх механічну міцність; крім того, вони зазвичай значно більші, ніж клітини мікроорганізмів. З огляду на це, будь-який механічний чи інший вплив на клітини тварин (перемішування суспензії клітин чи якісь інші маніпуляції) повинен мати певні обмеження, оскільки у іншому разі клітина може зазнати пошкодження.

Якість суспензії імунокомпетентних клітин визначається, насамперед, життєздатністю клітин, що знаходяться у складі суспензії. Відсоток життєздатних клітин у суспензіях в основному визначають методом ексклюзії трипанового синього. Суспензія клітин вважається придатною для використання, якщо в ній міститься не більше 10 % мертвих клітин.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення життєздатності імунокомпетентних клітин.

**Обладнання та матеріали:** свіжоотримана суспензія імунокомпетентних клітин тварин, світловий мікроскоп, камера Горяєва, предметні скельця, піпетки, 0,1 %-ий розчин трипанового синього.

### **Хід роботи.**

1. Змішати на предметному скельці 0,1 мл суспензії клітин з 0,1 мл 0,1 %-ого розчину трипанового синього та інкубувати протягом 2 хвилин при кімнатній температурі.

2. За допомогою піпетки заправити отриманою суспензією клітин камеру Горяєва та підрахувати 100 клітин. Під впливом барвника мертві клітини фарбуються у синій колір, тоді як живі клітини залишаються безколірними та опалесціують.

3. Підрахувати загальну кількість клітин, в тому числі кількість живих клітин та за формулою визначити їх життєздатність:

$$Ж = (Ж_{кл} / З_{к-сть\ кл}) \times 100,$$

де Ж – життєздатність клітин, %;

Ж<sub>кл</sub> – к-сть живих клітин, підрахованих у камері Горяєва;

З<sub>к-сть кл</sub> – загальна к-сть клітин, підрахованих у камері Горяєва.

4. Результати підрахунку живих та мертвих клітин занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані.



## САМОСТІЙНА РОБОТА



### Тема 1. МЕТОДИ ФІКСАЦІЇ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН



#### Завдання 1. Ознайомитися з різними методами фіксації лабораторних тварин

**Мета роботи:** оволодіти різними методами фіксації лабораторних тварин.

**Обладнання та матеріали:** лабораторні тварини (щурі, миші, кролі), фіксатори (рестрейнери) для лабораторних тварин, одноразові нітрилові рукавички.

#### Хід роботи.

1. *Фіксація тварини двома руками.* Щурів та мишей фіксують, тримаючи хвіст правою рукою та зафіксувавши голову лівою (рис. 1.4, б).

Для цього спочатку необхідно захопити шкіру тварини між великим та третім пальцями лівої руки, після чого, щоб зменшити тиск на ділянку горла, обміняти третій палець із другим, таким чином, щоб згин шкіри між пальцями був під прямим кутом до шиї тварини. Після цього необхідно підняти тварину над поверхнею клітки, давши їй зачепитися передніми лапками за решітку клітки, і продовжувати м'яко витягувати тварину вздовж (рис. 1.4, а). Перед тим, як підняти тварину, слід переконатися, щоб складка шкіри була відтягнута достатньо вперед тварини і її голова була піднята угору.

Кролів фіксують обома руками, утримуючи їх однією рукою за складку шкіри в ділянці холки, а іншою – утримуючи кінцівки.

2. *Фіксація тварин однією рукою.* При фіксації щура та миші спершу необхідно захватити складку шкіри тварини на голові біля вух. При цьому мишу потрібно утримувати достатньо твердо, щоб не дати їй можливість повернути голову. Потім четвертим і п'ятим пальцями та основою руки необхідно зафіксувати хвіст (рис. 1.4, в).

3. *Фіксація тварин за допомогою фіксаторів (рестрейнерів) для лабораторних тварин.* Кролів, щурів та мишей фіксують, використовуючи підручні або комерційні фіксатори, які обмежують рухливість тварин, дозволяючи проводити відповідні маніпуляції (рис. 1.4, г). В якості підручних рестрейнерів можна використати будь-яку тканину, якою огортають тварину, залишивши неогорнутими ті ділянки, з якими планується проведення маніпуляції (рис. 1.4, д).

4. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття. Зробити висновки про значення фіксації при роботі з лабораторними тваринами.



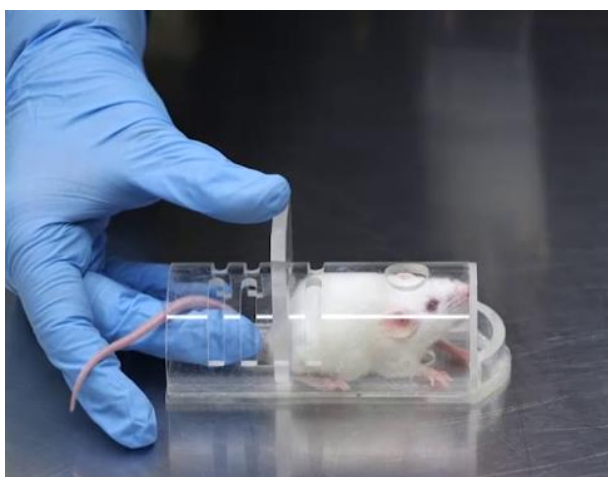
а



б



в



г



д

Рис. 1.4. Фіксація лабораторних тварин різними способами



## Тема 2. МЕТОДИ ВЗЯТТЯ КРОВІ У ТВАРИН ДЛЯ ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

### Теоретичні положення

Методи отримання проб крові від різних тварин для імунологічних досліджень мають свої особливості, які витікають із необхідності зберегти склад та біологічну активність її компонентів. Кров – рідка сполучна тканина, яка циркулює в судинній системі і складається з рідкої частини – плазми (55–60 %) та формених елементів (еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів) (40–45 %). Плазма крові складається з розчинених у воді білків, вуглеводів, солей, біологічно активних речовин (гормонів, ферментів тощо), а також продуктів клітинної дисиміляції, що мають бути видалені з організму. Білки плазми крові характеризуються різними специфічними функціями і властивостями. Їх поділяють на п'ять основних груп: альбуміни,  $\alpha$ 1- і  $\alpha$ 2-глобуліни,  $\beta$ -глобуліни,  $\gamma$ -глобуліни. Проміжне положення між  $\alpha$ - і  $\gamma$ -глобулінами займає фібриноген. Його вміст у плазмі невеликий – близько 0,3 %, проте за певних умов він має здатність переходити в нерозчинну волокнисту форму – фібрин.

У разі проведення імунологічних досліджень з використанням крові використовують стабілізовану антикоагулянтами цільну кров (при підрахунку формених елементів, виведення лейкограми крові, виділення різних фракцій лейкоцитів), дефібриновану (позбавлену фібриногену) кров (наприклад, для отримання еритроцитів із крові барана), а також цільну кров без антикоагулянтів з наступним отриманням сироватки крові (при визначенні наявності антигенів чи антитіл). Сироватка крові – рідка частина крові, що залишається після її згортання. За своїм складом сироватка крові подібна до плазми, однак у ній відсутні фібриноген і фактори згортання.



### Завдання 1. Відібрати кров у лабораторних тварин

**Мета роботи:** ознайомити студентів із технікою взяття крові у мурчаків, щурів та мишей.

**Обладнання та матеріали:** піддослідні тварини (мурчаки, щурі та миші), 5 %-ий спиртовий розчин йоду чи 70 %-ий спирт, 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин, анестетик у формі очних крапель, штатив з пробірками, ножиці Купера, черевоподібний скальпель, стерильні голки для взяття крові, бюкси, шприци, пробірки, предметні скельця, вата.

**Хід роботи.** Кров для досліджень відбирають у тварин після 12-годинної голодної дієти. Для цього необхідно:

1. Тварину надійно зафіксувати.

2. За необхідності вистригти або вибрити волосяний покрив у місці взяття крові, протерти шкіру 5 %-им спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.

3. Для отримання стабілізованої крові у шприц чи пробірку перед її взяттям попередньо набрати один з антикоагулянтів: 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин з розрахунку 100–110 мкл 3,8 %-ого розчину лимоннокислого натрію та 20 од. гепарину на 1 мл крові. Для взяття крові з метою отримання сироватки антикоагулянти не використовують.

4. У морських свинок, щурів і мишей для взяття невеликої кількості крові (0,05–0,1 мл) для морфологічного аналізу використати один з наступних способів:

- ✚ надсікти скальпелем край вушної раковини;
- ✚ надрізати скальпелем чи ножицями кінчик хвоста;
- ✚ виконати стерильною голкою прокол м'якої частини ступні на передній чи задній кінцівці.

5. Зібрати кров у стерильний бюкс чи пробірку. Краплю свіжоотриманої крові за необхідності також можна відразу нанести на предметне скельце та зробити мазок.

6. Для одержання більшої кількості крові використати один з наступних способів після наркотизування та фіксації тварин (рис. 1.5):

- ✚ з допомогою стерильної голки і шприца з боку лівої сторони грудної стінки чи зі сторони діафрагми після попередньої пальпації виконати прокол у сторону серця та відібрати кров безпосередньо з його порожнини (0,2–0,3 мл крові у мишей, 2,0–4,0 мл крові у щурів і 6,0–10,0 мл крові у мурчаків 1 раз у тиждень);
- ✚ після знеболення ділянки ока анестетиком стерильною голкою виконати прокол орбітального синусу (0,5–1,0 мл крові 1 раз у тиждень).



а



б

Рис. 1.5. Відбір крові з серця у щура (а) та орбітального синусу у миші (б)

7. Після взяття крові місце проколу шкіри продезинфікувати спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.

8. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття.



## **Завдання 2. Відібрати кров у коней, великої і дрібної рогатої худоби**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з технікою взяття крові у коней, великої і малої рогатої худоби.

**Обладнання та матеріали:** піддослідні тварини (коні, велика і мала рогата худоба), 5 %-ий спиртовий розчин йоду чи 70 %-ий спирт, 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин, спирт, штатив з пробірками, ножиці Купера, червоподібний скальпель, голки для взяття крові, шприц, вата.

**Хід роботи.** Перед взяттям крові тварин витримують на 12-годинній голодній дієті. Для цього необхідно:

1. Тварину надійно зафіксувати.

2. Вистригти або вибрити волосяний покрив у місці взяття крові, протерти шкіру 5 %-им спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.

3. Для отримання стабілізованої крові у шприц чи пробірку перед її взяттям попередньо набрати один з антикоагулянтів: 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин з розрахунку 100–110 мкл 3,8 %-ого розчину лимоннокислого натрію та 20 од. гепарину на 1 мл крові. Для взяття крові з метою отримання сироватки антикоагулянти не використовують.

4. Для отримання невеликої кількості крові (1–3 мл) для морфологічного аналізу у коней, великої і малої рогатої худоби виконати прокол вухної вени стерильною голкою та зібрати кров у стерильну пробірку.

5. Для одержання більшої кількості крові (5–10 мл) виконати пункцію яремної вени на межі верхньої й середньої третини шиї. Для цього великим пальцем лівої руки здавлюють вену нижче місця пункції, а потім проколюють кровопускаючою голкою шкіру й стінку вени. Голку вводять проти току крові під кутом 45° з лівого чи правого боків. При цьому, тварину необхідно зафіксувати так, щоб голова була відведена у сторону, протилежну стороні відбору крові з яремної вени.

6. У великої рогатої худоби шляхом проколу шкіри на глибину 1–1,5 см у ділянці жолоба хвоста за 15–20 см від його кореня відібрати кров з підхвостової артерії.

7. Після взяття крові місце проколу шкіри продезинфікувати спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.

8. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття.



### **Завдання 3. Відібрати кров у дрібних домашніх тварин**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з технікою взяття крові у собак і котів.

**Обладнання та матеріали:** піддослідні собаки і коти, 5 %-ий спиртовий розчин йоду, 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин, 5 %-ий спиртовий розчин йоду чи 70 %-ий спирт, штатив з пробірками, ножиці Купера, червоподібний скальпель, голки для взяття крові, стерильні шприци, пробірки, внутрішньосудинні катетери, предметні скельця, вата.

**Хід роботи.** Перед взяттям крові тварин витримують на 12-годинній голодній дієті. Для цього необхідно:

1. Тварину надійно зафіксувати.
2. Вистригти або вибрити волосяний покрив у місці взяття крові, протерти шкіру 5 %-им спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.
3. Для отримання стабілізованої крові у шприц чи пробірку перед її взяттям попередньо набрати один з антикоагулянтів: 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин з розрахунку 100–110 мкл 3,8 %-ого розчину лимоннокислого натрію та 20 од. гепарину на 1 мл крові. Для взяття крові з метою отримання сироватки антикоагулянти не використовують.
4. Для отримання невеликої кількості крові (0,1–0,3 мл) для морфологічного аналізу у собак та кішок надізнати чи проколоти стерильною голкою тканини на краю вуха або м'яку частину ступні на передній чи задній кінцівці. Краплю свіжоотриманої крові за необхідності також можна відразу нанести на предметне скельце та зробити мазок.
5. Для одержання більшої кількості крові (1–5 мл) у собак та котів виконати пункцію поверхневої вени передпліччя чи передньозовнішньої плюсневої вени, розміщеної на зовнішній поверхні гомілки. Вену здавлюють вище місця відбору. Голкою проколюють шкіру, м'які тканини і стінку вени. Кров набирають з допомогою внутрішньосудинного катетера у пробірку або безпосередньо у шприц.
6. Для одержання кількості крові більшого об'єму виконують пункцію яремної вени. Для цього тварину необхідно надійно зафіксувати у стоячому чи лежачому положенні, щоб голова була відведена у сторону, протилежну стороні відбору крові з яремної вени. Великим пальцем лівої руки здавлюють вену нижче місця пункції, а потім проколюють голкою шкіру й стінку вени. Голку вводять проти току крові під кутом 45° з лівого чи правого боків.
7. Після взяття крові місце проколу шкіри продезинфікувати 5 %-им спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.
8. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття.



#### Завдання 4. Відібрати кров у свиней

**Мета роботи:** ознайомити студентів з технікою взяття крові у свиней.

**Обладнання та матеріали:** піддослідні свині, 5 %-ий спиртовий розчин йоду чи 70 %-ий спирт, 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин, спирт, штатив з пробірками, ножиці Купера, червоподібний скальпель, стерильні голки для взяття крові різної довжини, шприци, пробірки, предметні скельця, вата.

**Хід роботи.** Перед взяттям крові тварин витримують на 12-годинній голодній дієті. Для цього необхідно:

1. Тварину надійно зафіксувати.
2. Вистригти або вибрити волосяний покрив у місці взяття крові, протерти шкіру 5 %-им спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.
3. Для отримання стабілізованої крові у шприц чи пробірку перед її взяттям попередньо набрати один з антикоагулянтів: 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин з розрахунку 100–110 мкл 3,8 %-ого розчину лимоннокислого натрію та 20 од. гепарину на 1 мл крові. Для взяття крові з метою отримання сироватки антикоагулянти не використовують.
4. Для отримання невеликої кількості крові (1–3 мл) для морфологічного аналізу надрізати стерильним скальпелем велику вушну вену та зібрати кров у стерильну пробірку. Краплю свіжоотриманої крові за необхідності також можна відразу нанести на предметне скельце та зробити мазок. Після взяття крові кінчик хвоста здавити гумовим кільцем або хірургічною петлею з шовку на 1–2 години (більш тривалий час може викликати некроз тканин).
5. Для одержання більшої кількості крові (3–5 мл) відсікти гострими ножицями або скальпелем кінчик хвоста довжиною до 1,5 см або стерильною голкою виконати прокол орбітального синусу. При цьому голку просувають на 2–4 см у напрямку дна очної впадини, поки вона не потрапить у венозний синус. Кров відбирають у стерильну пробірку.
6. Для одержання крові об'ємом 5–10 мл виконати пункцію передньої порожнистої вени, яка формується з'єднанням яремних та пахвових вен в ділянці першого грудного хребця, у жолобі, утвореному *m. brachiocephalicus* та *m. sternoccephalicus*. Для цього тварину необхідно надійно зафіксувати за верхню щелепу за допомогою петлі з мотузки. При цьому проколюють кровопускаючою голкою шкіру та просувають голку знизу вгору та вглиб у напрямку *v. cava cranialis* під кутом 45° до сагітальної площини з правого боку.
7. Після взяття у всіх випадках місце проколу шкіри або кінчик хвоста продезинфікувати 5 %-им спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.
8. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття.



## Завдання 5. Відібрати кров у кролів

**Мета роботи:** ознайомити студентів з технікою взяття крові у кролів.

**Обладнання та матеріали:** піддослідні кролі, 5 %-ий спиртовий розчин йоду чи 70 %-ий спирт, 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин, спирт, штатив з пробірками, ножиці Купера, черевоподібний скальпель, голки для взяття крові, стерильні бюкси, шприци, пробірки, предметні скельця, вата.

**Хід роботи.** Перед взяттям крові тварин витримують на 12-годинній голодній дієті. Для цього необхідно:

1. Тварину надійно зафіксувати.
2. Вистригти або вибрити волосяний покрив у місці взяття крові, протерти шкіру 5 %-им спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.
3. Для отримання стабілізованої крові у бюкс, шприц чи пробірку перед її взяттям попередньо набрати один з антикоагулянтів: 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин з розрахунку 100–110 мкл 3,8 %-ого розчину лимоннокислого натрію та 20 од. гепарину на 1 мл крові. Для взяття крові з метою отримання сироватки антикоагулянти не використовують.
4. Для отримання невеликої кількості крові (0,1–0,3 мл) для морфологічного аналізу у кролів з допомогою стерильної голки виконати пункцію вушної вени зовнішньої сторони вуха (рис. 1.6). Краплю свіжоотриманої крові за необхідності також можна відразу нанести на предметне скельце та зробити мазок.

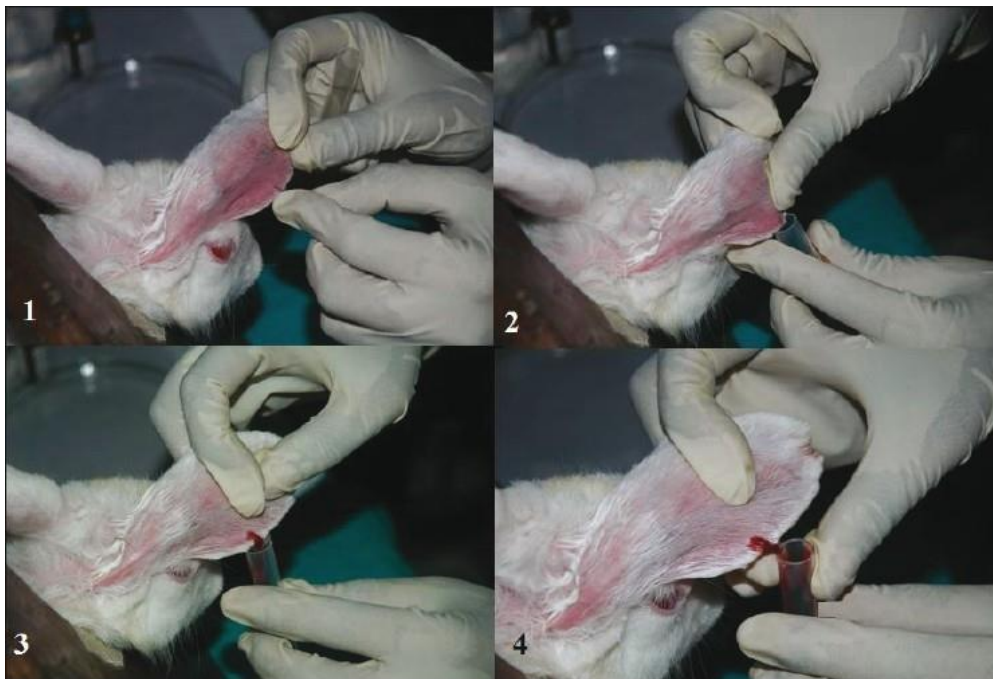


Рис. 1.6. Почерговість етапів відбору крові з вуха у кроля

5. Для одержання більшої кількості крові (1–5 мл) виконати пункцію яремної вени на межі верхньої й середньої третини шиї. Для цього великим пальцем лівої руки здавлюють вену нижче місця пункції, а потім проколюють голкою шкіру й стінку вени. Голку вводять проти току крові під кутом  $45^\circ$  з лівого чи правого боків (рис. 1.7). При цьому, тварину необхідно зафіксувати так, щоб голова була відведена у сторону, протилежну стороні відбору крові з яремної вени.



Рис. 1.7. Пункція яремної вени у кроля

6. Після взяття крові місце проколу шкіри продезинфікувати 5 %-им спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.

7. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття.



### **Завдання 6. Відібрати кров у сільськогосподарської птиці**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з технікою взяття крові у сільськогосподарської птиці.

**Обладнання та матеріали:** піддослідна птиця (кури, індики, гуси, качки), 5 %-ий спиртовий розчин йоду чи 70 %-ий спирт, 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин, спирт, штатив з пробірками, ножиці Купера, червоноподібний скальпель, голки для взяття крові, стерильні бюкси, шприци, пробірки, предметні скельця, вата.

**Хід роботи.** Перед взяттям крові птицю витримують на 12-годинній голодній дієті. Для цього необхідно:

1. Птицю надійно зафіксувати. Вищипати пір'я у місці взяття крові, протерти шкіру 5 %-им спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.
2. Для отримання стабілізованої крові у бюкс, шприц чи пробірку перед її взяттям попередньо набрати один з антикоагулянтів: 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин з розрахунку 100–110 мкл 3,8 %-ого розчину лимоннокислого натрію та 20 од. гепарину на 1 мл крові. Для взяття крові з метою отримання сироватки антикоагулянти не використовують.
3. Для отримання невеликої кількості крові (0,1–0,3 мл) для морфологічного аналізу у курей та індиків надрізати гребінь або сережки, а кров зібрати у стерильний бюкс чи пробірку. Краплю свіжоотриманої крові за необхідності також можна відразу нанести на предметне скельце та зробити мазок.
4. Для отримання невеликої кількості крові для морфологічного аналізу у гусей та качок проколоти подушечку ступні, а кров зібрати у стерильний бюкс чи пробірку. Краплю свіжоотриманої крові за необхідності також можна відразу нанести на предметне скельце та зробити мазок.
5. Для одержання більшої кількості крові (1–5 мл) у птиці виконати пункцію підшкірної підкрильцевої вени. Прокол шкіри виконують під кутом до ліктьового вигину. При цьому вену здавлюють пальцем в ділянці ліктьового суглобу.
6. Після взяття крові місце проколу шкіри продезинфікувати 5 %-им спиртовим розчином йоду чи 70 %-им спиртом.



### **Завдання 7. Отримати дефібриновану кров**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою отримання дефібринованої крові тварин.

**Обладнання та матеріали:** свіжоотримана кров барана, стерильні пластикові або скляні колби ємністю 50 мл, стерильні скляні кульки діаметром 5–7 мм, стерильний розчин Хенкса.

#### **Хід роботи.**

1. Свіжоотриману кров в кількості 10–20 мл (без антикоагулянтів і консервантів) негайно помістити у колбу об'ємом 50 мл зі скляними кульками діаметром 5–7 мм.
2. Струшувати колбу протягом 7–10 хв та слідкувати за переходом фібриногену крові у невеликий фібриновий згусток.
3. Дефібриновану кров перенести в іншу посудину і, за необхідності, розбавити розчинником (розчин Хенкса) або використати для досліджень.
4. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття.



## **Завдання 8. Отримати плазму крові від тварин**

**Мета роботи:** отримати плазму крові від тварин.

**Обладнання та матеріали:** тварина (кріль, собака, кішка чи інша), штатив для пробірок, стерильні пробірки, піпетки, голки та шприци, вата, 70 %-ий розчин етанолу, 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин, центрифуга.

**Хід роботи.** Кров для досліджень відбирають у тварин після 12-годинної голодної дієти. Для цього необхідно:

1. Тварину надійно зафіксувати.
2. За необхідності вистригти або вибрити волосяний покрив у місці взяття крові, протерти шкіру 70 %-им розчином етанолу.
3. У шприц чи пробірку набрати один з антикоагулянтів: 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин з розрахунку 100–110 мкл 3,8 %-ого розчину лимоннокислого натрію та 20 од гепарину на 1 мл крові.
4. Відібрати кров згідно методики відбирання для кожного виду тварин. Шкіру у місці проколу продезінфікувати 70 %-им розчином етанолу.
5. Перелити кров у центрифужну пробірку та поставити на центрифугування при 300 g протягом 15 хв.
6. Після закінчення центрифугування відібрати плазму крові, яка знаходиться над осадом еритроцитів, у іншу стерильну пробірку. Плазма крові являє собою прозору, світло-жовту (у коней – жовту), злегка опалесціючу рідину. Червоне забарвлення плазми крові свідчить про наявність у ній гемоглобіну, що спостерігається при гемолізі.
7. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття. Проаналізувати методику отримання плазми крові від тварин та зробити висновок.



## **Тема 3. ОТРИМАННЯ КОРПУСКУЛЯРНИХ АНТИГЕНІВ. МЕТОДИ ВВЕДЕННЯ АНТИГЕНУ ТВАРИНАМ**

### **Теоретичні положення**

Антигенами називаються структурно чужорідні для конкретного організму речовини (високомолекулярні сполуки – в першу чергу білки і полісахариди), здатні викликати імунну відповідь. Носіями таких чужорідних речовин є бактерії, віруси, гриби, трансплантати, пухлинні клітини тощо.

В імунології термін «антиген» несе подвійне змістовне навантаження: перше – як індуктор імунної відповіді, друге – як біологічний маркер.

У визначенні антигену як індуктора імунної відповіді приховані дві його основні характеристики: антигенна специфічність (антигенність), обумовлена його структурними особливостями, і імуногенність – здатність ініціювати імунну систему до формування ефektorів (різних субпопуляцій лімфоцитів та антитіл), нейтралізуючих антиген. У той же час, високомолекулярні сполуки (білки, полісахариди) володіють як антигенною специфічністю, так і імуногенністю.

Антигени складаються з великої неспецифічної молекули-носія (полісахарида, білка або ліпіда) і розташованих на поверхні цієї молекули детермінантних груп (антигенних детермінант), що обумовлюють серологічну специфічність антигену. Детермінантні групи, відділені від макромолекули-носія, називаються гаптенами. Гаптени набувають імуногенності лише після з'єднання з високомолекулярним білком-носієм. Вони здатні реагувати з відповідними (гомологічними) антитілами, але не запускають синтез нових антитіл. Таким чином, гаптени не здатні забезпечити розвиток імунної відповіді, демонструючи тим самим відсутність властивості імуногенності. Однак, вони володіють специфічністю – здатністю вступати в реакції взаємодії з уже існуючими до них антитілами.

Варто зазначити, що імуногенність – комплексна характеристика, яка залежить від властивостей самого антигену (молекулярна вага, хімічний склад, чужорідність, структурна стабільність), шляху його проникнення в організм і кількості антигену.

Існує два основних види антигенів: екзогенні та ендогенні (аутологічні). Екзогенні антигени потрапляють в організм із зовнішнього середовища. Серед них розрізняють антигени інфекційного та неінфекційного походження.

Інфекційні антигени – це антигени бактерій, вірусів, грибів та найпростіших. Промислово отримані інфекційні антигени є незамінними компонентами імунобіологічних препаратів, призначених для активної профілактики інфекційних хвороб тварин – вакцин. Як антиген у вакцинах можуть виступати цілісні мікроорганізми (живі або інактивовані), окремі антигени мікроорганізмів, токсини мікроорганізмів або штучно створені антигени мікроорганізмів за допомогою генної інженерії. З метою підвищення імуногенності антигени можуть бути агреговані, полімеризовані або кон'югованого з носієм, або адсорбовані на останньому. Крім цього, вакцини у своєму складі можуть мати допоміжні речовини (ад'юванти, консерванти, стабілізатори тощо), які вносяться з метою забезпечення кращої імунної відповіді на антиген та продовження терміну придатності самої вакцини.

Відомі наступні різновиди бактеріальних антигенів:

- ✚ групоспецифічні (зустрічаються у різних видів одного роду або родини);
- ✚ видоспецифічні (зустрічаються у різних представників одного виду);
- ✚ типоспецифічні (зустрічаються всередині одного виду та визначають серологічні варіанти).

В залежності від локалізації розрізняють наступні бактеріальні антигени: О-, К-, Н- і F-антигени (позначаються літерами латинського алфавіту).

К-антигени – антигенні речовини капсул бактерій. Вони мають полісахаридну, білкову, поліпептидну або змішану хімічну природу. Антигенна активність К-антигенів, як правило, нижча від інших бактеріальних антигенів, а протективна – вища. Антигенність К-антигенів варіабельна, що використовують для систематики бактерій. При культивуванні на живильних середовищах бактерії часто втрачають здатність до утворення капсул, а отже, до синтезу К-антигенів, проте в разі потрапляння у чутливий організм синтез К-антигенів поновлюється. Хімічні речовини, що входять до складу капсул бактерій, зв'язані з клітинною стінкою неміцно, тому К-антигени з місця локалізації бактерій легко дифундують по всьому організму.

Н-антигеном є білок флагелін, з якого складаються джгутики бактерій. Для цього антигену характерна термолабільність, висока типова варіабельність, відносно невисока протективна активність.

F-антиген являє собою білок пілін, з якого складаються війки бактерій.

О-антиген – соматичний антиген грамнегативних бактерій, який має добре виражені антигенні, протективні, а також токсичні властивості. О-антиген складається з молекули ліпополісахариду (ЛПС), антигенна специфічність якого визначається переважно поверхневими олігосахаридними ланцюгами. Його токсичність визначається молекулою ліпиду А, що входить до складу ЛПС. Порушення синтезу олігосахаридних ланцюгів ЛПС призводить до втрати або зміни серологічної специфічності грамнегативних бактерій. Ця специфічність визначає величезну кількість серогруп, сероварів та субсероварів у грамнегативних бактерій. Найбільш дослідженими й значущими для визначення антигенності антигенами грампозитивних бактерій є пептидоглікан, білки та інші біополімери, що входять до складу клітинної стінки.



### **Завдання 1. Розглянути принципи та відпрацювати методику отримання корпускулярних антигенів *Escherichia coli***

#### **Теоретичні положення**

У практичній ветеринарній медицині антигени використовують як з метою виготовлення вакцин для активної імунізації тварин, так і для постановки різних реакцій у разі проведення лабораторної діагностики їх хвороб. Окрім класифікації антигенів за походженням (екзогенні та ендогенні), чужорідністю (аутологічні, сингенні, алогенні, ксеногенні), хімічним складом тощо антигени ділять також на корпускулярні і розчинні (гуморальні). До корпускулярних антигенів відносяться, наприклад, окремі бактеріальні чи соматичні клітини, до розчинних – розчинні речовини, отримані при руйнуванні клітин (ендотоксини, білки, нуклеїнові кислоти), віруси або речовини, які збудники виділяють у зовнішнє середовище (екзотоксини).

Стандартні корпускулярні антигени збудників інфекційних хвороб тварин виробляють на біофабриках та називають діагностикумами. Вони містять інактивовані бактерії. Діагностикуми випускають, як правило, у рідкому стані (з консервантом) та ліофільно висушеними в ампулах або флаконах (для попередження псування). Перед використанням діагностикум перевіряють на придатність, звертаючи увагу на цілість ємності, чіткість напису на ампулі чи флаконі, відповідність його надпису, зазначеному у настанові й на пакуванні, відповідність зовнішнього вигляду, термін придатності. Перед використанням діагностикум збовтують. Він повинен бути рівномірно каламутним, не утворювати пластівці. Ліофілізований діагностикум розчиняють так, як зазначено у настанові по його використанню. Корпускулярні антигени використовуються у таких серологічних реакціях як аглютинація, реакція зв'язування комплекменту, гемаглютинація та ін.

Гуморальні або розчинні антигени досить резистентні до нагрівання та гниття. При цьому вони не руйнуються і зберігають свою специфічність. Їх отримують шляхом екстрагування бактерій, у яких повністю зруйнована клітинна стінка, або тканин, які містять збудники хвороби.

Існують фізичні та хімічні методи отримання гуморальних антигенів. Фізичні методи екстрагування антигенів засновані на механічному руйнуванні мікробних або соматичних клітин, їх багаторазовому заморожуванню та розморожуванню, дії на них ультразвуку, високої або низької температур. При хімічних методах отримання антигенів використовують екстрагування трихлороцтовою кислотою; кислотний або лужний термогідроліз; екстрагування за допомогою ацетону, сечовини, етилового спирту, ефіру та інших розчинників; ферментативне руйнування мікробних клітин та тканин. Вибір того чи іншого способу отримання гуморального антигену залежить від його хімічної природи. Головною умовою обраного способу при цьому є ефективне вилучення антигену без його денатурації. Гуморальним антигеном також може бути і бактеріальний екзотоксин. Ним може бути фільтрат бактеріальної культури, вирощеної у рідкому живильному середовищі, екстракт вмісту шлунку, кишечника, проб корму тощо.

**Мета роботи:** розглянути принципи та відпрацювати методику отримання корпускулярних антигенів *Escherichia coli*.

**Обладнання та матеріали:** кріль, добова культура *Escherichia coli*, бактеріальні стандарти мутності, розчин NaCl (0,15 М/л), стерильні пробірки, піпетки, скляні ампули (10 мл), штатив для пробірок, водяна баня, центрифуга, термостат.

### **Хід роботи.**

1. Приготувати бактеріальну суспензію. Для цього у пробірку з добовою культурою кишкової палички, вирощену на скошеному м'ясо-пептонному агарі, внести 5 мл стерильного фізіологічного розчину натрію

хлориду, змити з поверхні середовища мікробну біомасу та піпеткою перенести у стерильні пробірки.

2. Клітини тричі відмити фізіологічним розчином натрію хлориду шляхом центрифугування протягом 25 хв при 1200 g. Перевірити чистоту отриманої бактеріальної суспензії, дослідивши під мікроскопом мазок культури, зафарбованої за Грамом.

3. Стандартизувати антиген. За допомогою стандарту мутності визначити густоту отриманої бактеріальної суспензії та приготувати із неї суміш мікробних тіл у фізіологічному розчині натрію хлориду ( $2 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$  клітин у 1 мл) в об'ємі 10 мл. Порівняти ступінь мутності в дослідній та еталонних пробірках, помістивши під пробірки цифрову таблицю.

4. Інактивувати антиген. Стандартизовані антигени *E. coli* розділити на дві частини та одну із них інактивувати підігріванням на водяній бані при  $100^\circ\text{C}$  на протязі 1 години.

5. Для перевірки стерильності одну-дві краплі інактивованого антигену засіяти у пробірку з 3–5 мл м'ясо-пептонного бульйону та інкубувати при температурі  $37^\circ\text{C}$  протягом доби. Відсутність росту буде вказувати на інактивацію антигену.

6. Інактивовані антигени розлити в стерильні скляні ампули та запаяти. На етикетці вказати назву антигену, концентрацію, дату виготовлення. Зберігати у холодильнику за температури  $4^\circ\text{C}$ . Підготовлені антигени використати для імунізації тварин.




7. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття. Проаналізувати принцип методики отримання корпускулярних антигенів та зробити висновки про необхідність промислового отримання інфекційних антигенів для профілактики хвороб тварин.



## **Завдання 2. Відпрацювати методику підшкірного та внутрішньом'язового введення антигену тваринам**

### **Теоретичні положення**

Перед введенням антигену тварині її необхідно надійно зафіксувати, оскільки надійна фіксація є запорукою введення його необхідної кількості та правильності введення. Способи фіксації залежать від виду тварини і характеру подальших маніпуляцій:

-  мишей однією рукою беруть за шкірну складку у ділянці шиї та кінчик хвоста, і перевертають у зручне положення;
-  щурів фіксують однією рукою в ділянці складки шиї, щільно притискаючи голову до столу, іншою рукою тримають за хвіст і повертають у зручне для введення антигену положення;
-  кроликів утримують за холку і задні кінцівки, і притискають до столу;

- ✚ кішок і собак фіксують за шкіру в області потилиці і шиї так, щоб шкіра сильно натяглася, одночасно притискаючи тварину до столу (кішки) чи підлоги (собаки); у собак за необхідності на верхню та нижню щелепи накидають петлю чи одягають намордник, у котів – лише намордник;
- ✚ свиней фіксують закруткою з петлею за верхню щелепу. При цьому петлю на верхню щелепу накидають обов'язково за ікла і швидко закручують її, натискаючи кінцем закрутки на спинку носа. У стоячому положенні свиню можна зафіксувати, також прив'язавши її за верхню щелепу до стовпа;
- ✚ велику рогату худобу фіксують за роги та носогубне дзеркало руками або за допомогою носових щипців, здавлюючи носову перегородку; піднімають у тварини одну з грудних кінцівок, зігнувши її в зап'ясному суглобі;
- ✚ коней фіксують за вуздечку або шляхом затискання верхньої губи закруткою з петлею, чи піднімаючи одну з грудних кінцівок, зігнувши її в зап'ясному суглобі.

Антиген тварині вводять одним із нижченаведених методів:

- ✚ методом скарифікації – вистригти у місці введення антигену шерсть та продезінфікувати шкіру, після чого жорсткою щіткою втерти у шкіру антиген (попередньо можна зробити надріз шкіри);
- ✚ внутрішньошкірно – лівою рукою відтягнути шкіру, ввести кінчик голки в складку шкіри та ввести антиген (при правильному введенні, утворюється припухлість завбільшки з горошину);
- ✚ підшкірно – пальцями лівої руки відтягнути шкіру і ввести голку шприца на глибину 1–1,5 см (рис. 1.8);
- ✚ внутрішньом'язово – антиген ввести у м'язи стегна, передпліччя, шиї, крупа тощо; птиці – у грудний м'яз;

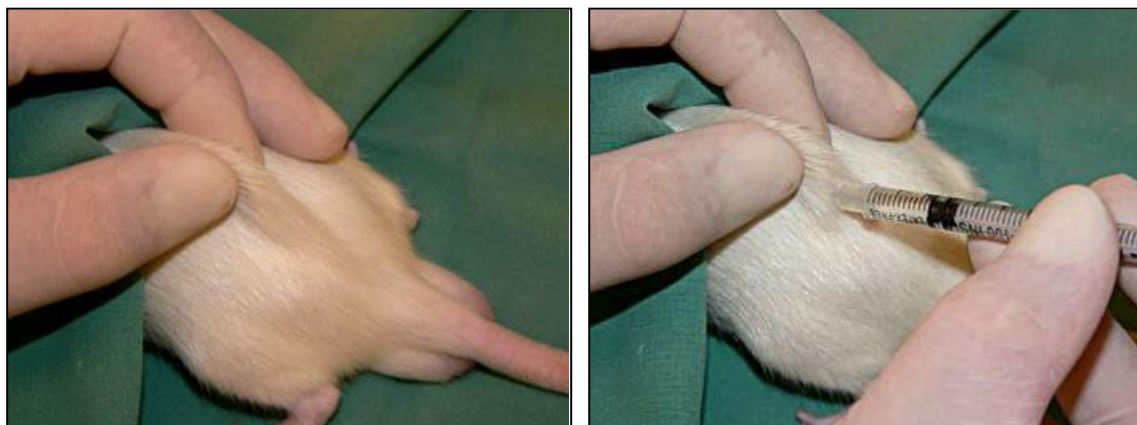


Рис. 1.8. Фіксація щура та підшкірне введення антигену

- ✚ внутрішньовенно – ввести антиген мишам і щурам – у вену хвоста, кроликам і свиням у вушну вену, птиці – підшкірну підкрильцеву вену, котам і собакам – поверхневу вену передпліччя чи передньозовнішню плісневу вену, великій і дрібній рогатій худобі, та коням – у яремну вену;
- ✚ внутрішньоочеревинно – ввести антиген у простір між парієтальним та вісцеральним листками очеревини у ділянці білої лінії живота, ближче до лонної ділянки (тварина має бути у положенні головою донизу) (рис. 1.9);



Рис. 1.9. Внутрішньоочеревинне введення антигену миші

- ✚ інтраназально – ввести антиген у порожнину носа краплинним методом, використовуючи очну піпетку;
- ✚ орально – антиген внести у корм, воду або через тонкий зонд безпосередньо в шлунок чи рубець (рис. 1.10);



Рис. 1.10. Фіксація миші та оральне введення антигену за допомогою зонда

- ✚ кон'юктивально – антиген внести у кон'юктивальний мішок;
- ✚ аерозольно – застосувати антиген у формі аерозолю.

**Мета роботи:** відпрацювати методику підшкірного та внутрішньом'язового введення антигену в організм тварин.

**Обладнання та матеріали:** криль та кішка, спирт, вата, стерильні шприци з ін'єкційними голками, вакцина для профілактичної імунізації кроликів проти геморагічної хвороби і міксоматозу, вакцина для профілактичної імунізації тварин проти хвороби Ауескі.

### **Хід роботи.**

1. Кожну тварину надійно зафіксувати відповідно до виду тварини.
2. Протерти шкіру у місці введення антигену 70 %-им спиртом.
3. Набрати у стерильні шприци вакцини у дозі, зазначеній у інструкції по застосуванні вакцин.
4. Ввести кролику вакцину для профілактичної імунізації кроликів проти геморагічної хвороби і міксоматозу підшкірно у ділянці холки.
5. Ввести кішці вакцину для профілактичної імунізації тварин проти хвороби Ауескі внутрішньом'язово у ділянці зовнішньої поверхні стегна.
6. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття.



### **Питання для самоконтролю**

1. Які вимоги при роботі з біологічним матеріалом? Які права та обов'язки працівників лабораторії імунології?
2. Які вимоги безпеки перед початком роботи, під час проведення робіт та після їх закінчення у імунологічній лабораторії?
3. Які вимоги при роботі з лабораторним посудом та приладами?
4. Який мінімальний перелік обладнання імунологічної лабораторії?
5. Що може бути предметом імунологічного дослідження з діагностичної точки зору?
6. Які існують фактори, які впливають на результати імунологічної лабораторної діагностики?
7. Яких тварин найчастіше використовують для досліджень, у тому числі і імунологічних?
8. Якою має бути система розведення лабораторних тварин, їх утримання та використання?
9. Яку частину віварію відносять до «чистої» зони?
10. Яку частину віварію відносять до «брудної» зони?
11. Які основні показники мікроклімату повинні підтримуватися у приміщеннях для лабораторних тварин?
12. Які основні вимоги до утримання лабораторних тварин?

13. Які види робіт повинен систематично виконувати персонал, що обслуговує тварин?
14. З яких органів лабораторних тварин найчастіше отримують імунокомпетентні клітини?
15. На чому ґрунтується метод отримання лімфоцитів з допомогою градієнта щільності?
16. Скільки клітин має містити стандартна суспензія лімфоцитів?
17. З чого складається розчин Олсвера та для чого він використовується?
18. На чому ґрунтується метод проведення гіпотонічного шоку еритроцитів у осаді імунокомпетентних клітин?
19. З якою метою отримують тимоцити, спленоцити та клітини лімфатичних вузлів від тварин?
20. Скільки приблизно Т- і В-лімфоцитів містить селезінка однієї інтактної миші? Яке між ними співвідношення?
21. Скільки приблизно можна отримати клітин лімфатичних вузлів від однієї інтактної миші? Яке між ними співвідношення?
22. Яким чином судять про те, що імунокомпетентна клітина є живою при визначенні життєздатності імунокомпетентних клітин з допомогою 0,1 %-ого розчину трипанового синього?
23. Які існують методи фікації лабораторних тварин?
24. Що собою являє кров тварин? З чого вона складається?
25. Яку кров використовують у разі проведення імунологічних досліджень?
26. Яким чином відбирають кров у різних видів тварин, залежно від мети дослідження?
27. Як отримати дефібриновану кров?
28. Дайте визначення антигену.
29. Як класифікують антигени?
30. У чому різниця між антигенами і гаптенами?
31. Коротко охарактеризуйте будову антигена.
32. Назвіть дві основні характеристики антигенів.
33. Опишіть різновиди бактеріальних антигенів.
34. Які імунобіологічні препарати містять інфекційні антигени та призначені для активної профілактики інфекційних хвороб тварин?
35. Що таке діагностикум?
36. Назвіть приклади корпускулярних і гуморальних антигенів.
37. Які ви знаєте фізичні та хімічні методи отримання гуморальних антигенів?
38. Які існують способи введення антигену тваринам?



## 2. МЕХАНІЗМИ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ

### Теоретичні положення

Імунітет є засобом захисту організму від шкідливої для нього генетично чужої інформації екзогенного (мікроорганізми, віруси, токсини тощо) та ендогенного (змінені, пухлинні клітини) походження. Він спрямований на підтримку генетичного гомеостазу, структурної і функціональної цілісності та антигенної індивідуальності організму. Специфічна ланка імунітету реагує на один конкретний антиген і функціонує завдяки Т- (клітинний імунітет) і В-лімфоцитам (гуморальний імунітет). Наслідком її активації є становлення адаптивного імунітету, який може бути тільки набутим та властивий лише вищим (хребетним) тваринам. Його розвиток триває повільно (9–14 і більше діб), оскільки потребує проліферації певного клону лімфоїдних клітин, їх генної активації та синтезу білків.

Однак до завершення формування специфічного імунітету тварина не залишається беззахисною. При виникненні необхідності її захисту від впливу чинників біологічного чи небіологічного походження вмикаються механізми вродженої неспецифічної резистентності (вродженого імунітету), для яких непотрібна тривала активація та які відразу готові стати на захист. Таким чином, вроджений імунітет є першим рубежем на шляху попередження проникнення та поширення інфекційних та неінфекційних агентів в організмі тварини. Він включає в себе неушкоджену шкіру, слизові оболонки, їх секрети, що покривають епітеліальні клітини і запобігають контакту між різноманітними патогенами і організмом, екскрети (слина, сльози, сеча, та інші рідкі середовища організму, які сприяють виведенню патогенних агентів). До факторів вродженого неспецифічного імунітету відносяться епідерміс шкіри, ворсинки епітеліальних клітин дихальних шляхів, продукти життєдіяльності сальних залоз, які містять антимікробні фактори у вигляді жирних кислот; фермент лізоцим, який міститься в секретах організму і має здатність руйнувати грампозитивні бактерії; комплемент; показник кислотності деяких фізіологічних секретів, що перешкоджає заселення організму різними мікроорганізмами (кисла рН сечі, піхвового секрету, шлункового соку).

До неспецифічних факторів природної резистентності можна віднести такі захисні фізіологічні функції, як чхання, блювання, пронос, які також сприяють елімінації патогенних агентів з організму, а також температура тіла та величина  $pO_2$  крові, насиченість тканин киснем у ділянці зосередження мікроорганізмів.

Однією з ланок природної резистентності є також клітинний імунітет, функціонування якого пов'язане з діяльністю мононуклеарних фагоцитів (моноцитів, тканинних макрофагів), гранулоцитів (нейтрофілів, еозинофілів, базофілів (периферичної крові і тканинних)) та природних кілерів (від англ. «natural killer» – НК-клітина).

Клітини системи мононуклеарних фагоцитів виконують в організмі подвійну функцію. З однієї сторони, вони беруть участь у безпосередньому захисті організму від чужорідних агентів, переважно за рахунок фагоцитозу і антитіло залежного кілінгу (вроджений неспецифічний імунітет), а з іншої – презентують (представляють) відповідним чином підготовлений чужорідний антигенний матеріал для розпізнавання Т-лімфоцитами, продукують цитокіни, тобто здатні ініціювати і регулювати механізми специфічного адаптивного імунітету.

Поряд з моноцитами і тканинними макрофагами, в реалізації клітинних реакцій вродженого неспецифічного імунітету беруть участь також гранулоцити. Ці клітини відіграють першочергову роль в процесах імунного запалення та фагоцитозу.

Природні кілери – ще одна група клітин, яка має важливе значення в реалізації механізму вродженого неспецифічного імунітету. Загальною особливістю природних кілерів є здатність викликати лізис клітини-мішені без попередньої сенсibiliзації, що відрізняє їх від цитотоксичних Т-лімфоцитів-кілерів. Клітинами-мішенями для НК-клітин є практично всі ядровмісні клітини, однак найбільшу активність НК-клітини проявляють по відношенню до пухлинних клітин і клітин, уражених вірусом.

Стан вродженого неспецифічного імунітету визначають також за показниками загальної кількості лейкоцитів у крові, характером лейкограми, фагоцитарною активністю макрофагів і нейтрофілів, активністю комплементу та лізоциму тощо.



### **Заняття 3. ОЦІНКА ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ЛЕЙКОЦИТІВ КРОВІ ТВАРИН**

#### **Теоретичні положення**

Лейкоцити, беручи участь у різних запальних та імунних процесах, змінюють свій функціональний і морфологічний стан, що може служити критерієм для оцінки як характеру протікаючого процесу, так і ступеня його активності або тяжкості. Функціональна активність лейкоцитів, зокрема нейтрофілів та макрофагів, які задіяні в системі гуморально-клітинної кооперації при імунній відповіді на антиген, робить їх універсальною мішенню та індикатором різних порушень гомеостазу в організмі. Активність лейкоцитів забезпечується їх якісним та кількісним вмістом, проявляючись, у першу чергу, фагоцитарною активністю.

Фагоцитоз – філогенетично найбільш ранній неспецифічний фактор захисту організму від антигенів. Основними фагоцитуючими клітинами є нейтрофільні гранулоцити і макрофаги. Процес фагоцитозу чужорідного агента здійснюється у кілька стадій: опсонізації, хемотаксису, адгезії, захоплення (поглинання), кілінгу (перетравлення чужорідного об'єкту) і екзоцитозу

перетравлених решток. Цитоплазма фагоцитів містить велику кількість лізосом, що містять набір різноманітних гідролітичних ферментів (протеази, пептидази, ліпази, нуклеази та ін.).

Опсонізація – процес взаємодії антигенів (бактерій тощо) з опсонінами (фібронектином, компонентами системи комплементу, маннозозв'язуючим лектином), в ході якого вони стають більш сприйнятливими до дії фагоцитів, оскільки останні володіють рецепторами до опсонізуючих білків, які адсорбувалися на поверхні мішеней (антигенів). Хемотаксис ініціюється хемоатрактантами – речовинами, які утворюються у місці пошкодження тканини та локалізації патогенних мікроорганізмів. Адгезія до об'єкту фагоцитозу залежить від наявності на його мембрані молекул, наділених відповідними функціями. Фаза захоплення або поглинання об'єкта фагоцитозу починається відразу після адгезії фагоцита до патогена та передбачає інвагінацію плазматичної мембрани фагоцита у місці її контакту з об'єктом фагоцитозу або утворення цитоплазматичних виростів (цитоподій), які змикаючись, огортають об'єкт, а також утворення оточеною мембраною фагосоми, яка містить об'єкт фагоцитозу. Знищення (кілінг) мікроорганізмів – важливий етап фагоцитозу. Він може відбуватися або всередині фагоцита (внутрішньоклітинне знищення), або поза ним (позаклітинне знищення). У внутрішньоклітинному знищенні патогенних агентів беруть участь як кисне-залежний, так і кисне-незалежний механізми. Кисне-залежний механізм супроводжується інтенсифікацією споживання кисню нейтрофілами, що часто називають респіраторним вибухом. Внутрішньоклітинний кисне-незалежний механізм знешкодження патогенів полягає у злитті фагосоми з лізосомними гранулами, які містять різні ферменти (колагеназу, кислу і нейтральну гідролази, лізоцим) та утворенні фаголізосоми, у якій відбуваються процеси ферментативного розщеплення патогена. Після знищення і перетравлення патогена фаголізосома зливається з плазматичною мембраною нейтрофіла і викидає його рештки у міжклітинний простір. Цей процес має назву екзоцитоз. Позаклітинне знищення патогенних мікроорганізмів реалізується за допомогою синтезу фагоцитами низки неферментних катіонних білків і пептидів, продукції лактоферину, створення нейтрофілами позаклітинних пасток для патогенів.

Визначення активності та інтенсивності фагоцитозу дозволяє оцінити не лише стан фагоцитарної системи нейтрофілів і макрофагів, а й можливість участі фагоцитуючих клітин в патогенезі того чи іншого захворювання і визначити тактику лікування тварин за певної патології.

Функціональну активність лейкоцитів можна виразити у кількох показниках: фагоцитарній активності, фагоцитарному індексі та фагоцитарному числі.



## **Завдання 1. Дати оцінку функціональної активності нейтрофілів крові кролів в реакції відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест)**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методом оцінки функціональної активності нейтрофілів крові кролів в реакції відновлення нітросинього тетразолію.

**Обладнання та матеріали:** стабілізована цитратом натрію чи гепарином кров кролів, стерильні пробірки, градуйовані піпетки, 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин, термостат, 96-лункові планшети, предметні скельця, реактиви для фарбування мазків крові (2 %-ий водний розчин метилового зеленого, 1 %-ий розчин карміну, 0,1 %-ий розчин нейтрального червоного), 0,2 %-ий розчин нітросинього тетразолію, метанол, мікроскоп.

**Принцип методу.** Даний тест характеризує окисно-відновний потенціал нейтрофілів, та являється одним із важливих показників їх фагоцитарної активності. НСТ-тест заснований на піноцитозі нейтрофілами розчину нітросинього тетразолію (НСТ) і накопичення його у фагоцитарних вакуолях з послідуєчим відновленням і перетворенням розчинного безбарвного НСТ у темно-синій формазан, який легко ідентифікувати у нейтрофілах візуально. Нерозчинний НСТ, випавший у осад, для проведення неакції непридатний, оскільки в такому випадку буде спостерігатися звичайний фагоцитоз часток.

### **Хід роботи.**

1. Приготувати розчин НСТ. Для цього до 2 мг порошка НСТ додати краплю 96 %-ого етилового спирту, 0,5 мл дистильованої води і 0,5 мл ізотонічного фосфатного буфера (рН 7,2), розчинити та профільтрувати через паперовий фільтр.

2. У дві лунки пластикового планшету внести по 0,05 мл стабілізованої цитратом натрію чи гепарином (з розрахунку 100–110 мкл 3,8 %-ого розчину лимоннокислого натрію чи 20 од. гепарину на 1 мл крові) крові кролів.

3. У обидві лунки додати по 0,025 мл 2 %-ого розчину НСТ.

4. Плавним погойдуванням планшету кров ретельно перемішати і на 30 хв помістити у термостат за температури 37 °С.

5. Після інкубації вміст планшету знову перемішати, приготувати мазки середньої густини, висушити на повітрі та зафіксувати протягом 5 хв у метанолі.

6. Пофарбувати мазки протягом 5–7 хвилин метиловим зеленим чи іншим передбаченим барвником.

7. Промити пофарбовані мазки під проточною водою, ополоснути дистильованою водою та висушити на повітрі.

8. Провести облік реакції. Для цього під світловим мікроскопом (імерсія) визначити відсоток формаган-позитивних клітин (нейтрофілів, що містять у фагоцитарних вакуолях забарвлений у синій колір).

9. Результати підрахунку відсотку формаган-позитивних клітин занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** У нормі відносна кількість формаган-позитивних нейтрофілів у тварин складає 9–11 % та може змінюватися з віком, залежно від фізіологічного стану організму, умов годівлі та утримання, а також при різних захворюваннях.

Зниження відносної кількості формаган-позитивних нейтрофілів свідчить про дефектний стан антимікробних систем нейтрофілів.



## **Завдання 2. Визначити функціональну активність нейтрофілів крові кролів на прикладі постановки опсоно-фагоцитарної реакції**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методом оцінки функціональної активності нейтрофілів крові кролів на прикладі постановки опсоно-фагоцитарної реакції.

**Обладнання та матеріали:** стабілізована цитратом натрію чи гепарином кров кролів, стерильні пробірки, градуйовані піпетки, 3,8 %-ий розчин лимоннокислого натрію або гепарин, 0,9 %-ий розчин хлориду натрію, штативи, термостат, реактиви для фарбування мазків крові (фарба Мая-Грюнвальда та Романовського-Гімза чи інша, залежно від методу фарбування), мікроскоп, предметні скельця, культура *Staphylococcus aureus*.

### **Хід роботи.**

1. Відстандартизувати з допомогою фізіологічного розчину культуру *Staphylococcus aureus* (1,5 млрд мікробних тіл в 1 мл).

2. У дві стерильні пробірки налити 0,8 мл стабілізованої 3,8 %-им розчином лимоннокислого натрію чи гепарином (з розрахунку 100–110 мкл 3,8 %-ого розчину лимоннокислого натрію чи 20 од. гепарину на 1 мл крові) крові кролів.

3. Внести у пробірки зі стабілізованою досліджуваною кров'ю по 0,2 мл стандартизованої суспензії *Staphylococcus aureus*, перемішати, пробірки закрити гумовими пробками і поставити інкубуватися у термостат на 30 хв за температури 37 °С.

4. Після інкубації приготувати на знежирених предметних скельцях мазки та пофарбувати.

5. Підрахувати під мікроскопом (імерсія) у декількох полях зору 100 нейтрофілів, в тому числі і нейтрофілів, які фагоцитували бактерії.

6. Шляхом множення кількості нейтрофілів, які фагоцитували бактерії, на одиницю вирахувати фагоцитарну активність (%).

7. Шляхом ділення загальної кількості фагоцитованих бактерій на кількість нейтрофілів, які їх фагоцитували, вирахувати фагоцитарний індекс (ум. од.).

8. Шляхом ділення загальної кількості фагоцитованих бактерій на 100 підрахованих нейтрофілів вирахувати фагоцитарне число (ум. од.).

9. Результати визначення фагоцитарної активності, фагоцитарного індекса та фагоцитарного числа нейтрофілів занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.



### **Завдання 3. Визначити функціональну активність перитонеальних макрофагів миші**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методом оцінки функціональної активності перитонеальних макрофагів на прикладі постановки опсоно-фагоцитарної реакції з макрофагами миші.

**Обладнання та матеріали:** свіжоотримана суспензія перитонеальних макрофагів миші, стерильні пробірки, градуйовані піпетки, забуферений фізіологічний розчин (рН 7,2–7,4), 0,9 % розчин хлориду натрію, штативи, термостат, реактиви для фарбування мазків крові (фарба Мая-Грюнвальда та Романовського-Гімза чи інша, залежно від методу фарбування), мікроскоп, предметні скельця, культура *Staphylococcus aureus*.

#### **Хід роботи.**

1. Відстандартизувати з допомогою фізіологічного розчину культуру *Staphylococcus aureus* (500 млн мікробних тіл в 1 мл суспензії).

2. Розвести забуференим фізіологічним розчином макрофаги до кінцевої концентрації 400–500 тис/мл.

3. Розлити отриману суспензію макрофагів у дві пробірки по 1,5 мл.

4. У пробірки внести по 0,3 мл суспензії мікробів, перемішати, пробірки закрити резиновими пробками і поставити інкубуватися у термостат на 30 хв за температури 37 С°.

5. Після інкубації приготувати на знежирених предметних скельцях мазки та пофарбувати.

6. Підрахувати під мікроскопом (імерсія) у декількох полях зору 100 макрофагів, в тому числі і макрофагів, які фагоцитували бактерії.

7. Шляхом множення кількості макрофагів, які фагоцитували бактерії, на одиницю вирахувати фагоцитарну активність (%).

8. Шляхом ділення загальної кількості фагоцитованих бактерій на кількість макрофагів, які їх фагоцитували, вирахувати фагоцитарний індекс (ум. од.).

9. Шляхом ділення загальної кількості фагоцитованих бактерій на 100 підрахованих макрофагів вирахувати фагоцитарне число (ум. од.).

10. Результати визначення фагоцитарної активності, фагоцитарного індекса та фагоцитарного числа перитонеальних макрофагів занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** У нормі значення фагоцитарної активності нейтрофілів і макрофагів варіює від 30 до 80 %, а фагоцитарного індексу – від 4 до 12 одиниць. Фагоцитарна активність нейтрофілів і макрофагів у тварин змінюється з віком, при зміні фізіологічного стану організму, умов годівлі та утримання, а також при різних захворюваннях.

Пригнічення фагоцитарного процесу проявляється за імунодефіцитних станів, захворювань шлунково-кишкового тракту, біогенних інфекцій, отруєнь, інтоксикації, порушень обмінних процесів тощо.



#### **Завдання 4. Змоделювати фагоцитоз *in vivo***

**Мета роботи:** ознайомити студентів з основними стадіями фагоцитозу на моделі фагоцитозу нейтрофілами та перитонеальними макрофагами щура еритроцитів кози *in vivo*.

**Обладнання та матеріали:** щурі, м'ясо-пептонний бульйон, 5 %-ва суспензія еритроцитів кози, 70 %-ий етиловий спирт, 0,9 %-ий розчин хлориду натрію, штативи, стерильні пробірки, стерильні пастерівські піпетки, ножиці, скальпель, 0,5 %-ий розчин новокаїну, хірургічні голки з нитками, реактиви для фарбування мазків крові (фарба Мая-Грюнвальда та Романовського-Гімза чи інша, залежно від методу фарбування), мікроскоп, предметні скельця.

**Принцип моделі фагоцитозу нейтрофілами та перитонеальними макрофагами щура еритроцитів кози *in vivo*.** Внутрішньоочеревинне введення м'ясо-пептонного бульйону викликає розвиток асептичного запального процесу очеревини, що призводить до міграції у місце запалення великої кількості нейтрофілів та макрофагів. Введені на фоні запального процесу еритроцити кози стають об'єктом атаки з боку вищезазначених імунокомпетентних клітин, що призводить до їх фагоцитозу.

#### **Хід роботи.**

1. Зафіксувати щура у висячому положенні головою донизу та внутрішньоочеревинно ввести 10–15 мл м'ясо-пептонного бульйону.

2. Через 24–48 годин після введення м'ясо-пептонного бульйону внутрішньоочеревинно ввести 0,5 мл 0,5 %-вої суспензії еритроцитів кози.

3. Через 20–45 хвилин після введення суспензії еритроцитів відібрати перитонеальний ексудат. Для цього необхідно зафіксувати щура у спинному лежачому положенні та вистригти шкіру черевної стінки (по білій лінії) каудальніше на 2–3 см пупка; дезинфікувати вистрежену ділянку шкіри 70 %-им етиловим спиртом та виконати інфільтраційну анестезію 0,5 %-им розчином новокаїну; по білій лінії зробити невеликий розріз шкіри (довжиною близько 0,5 см), щоб отримати доступ до черевної порожнини; з допомогою стерильної пастерівської піпетки через розріз черевної стінки з черевної порожнини у пробірку відібрати ексудат.

4. Приготувати на знежирених предметних скельцях мазки з ексудату, пофарбувати та розглянути під мікроскопом (імерсія), звертаючи увагу на присутність у мазку нейтрофілів і макрофагів у процесі фагоцитування еритроцитів – від стадії поглинання до стадії перетравлення (залежно від того, скільки пройшло часу між введенням суспензії еритроцитів кози та відбором ексудату).

5. Результати роботи у вигляді рисунків нейтрофілів і макрофагів на різних стадіях фагоцитозу (рис. 2.1) занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки про стадійність процесу фагоцитозу.

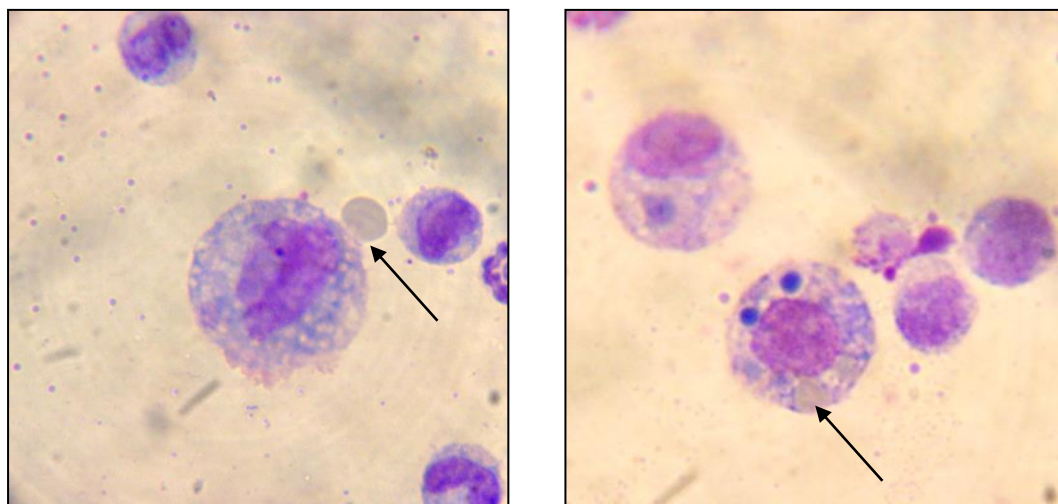


Рис. 2.1. Стадії фагоцитозу: а – адгезія еритроцита до перитонеального макрофага (показано стрілкою), б – фагоцитований еритроцит (показано стрілкою)



### **Завдання 5. Визначити активність пероксидази (мієлопероксидази) у нейтрофільних гранулоцитах крові кролів**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з цитохімічним методом визначення активності пероксидази (мієлопероксидази) у нейтрофільних гранулоцитах крові тварин.

**Обладнання та матеріали:** кров кролів, 96 %-ий етиловий спирт, формалін, бензидин, 3 %-ий розчин перекису водню, 0,1 %-ий розчин нейтрального червоного (або 0,1 %-ий розчин сафраніну), світловий мікроскоп, піпетки, лабораторний посуд, чисті предметні скельця.

**Принцип методу.** Активність ферменту визначають за появою у цитоплазмі нейтрофілів зафарбованого продукту пероксидазної реакції – оксибензидина, який утворюється в реакції:



Оксибензидин фарбує місця локалізації пероксидази у жовто-коричневий колір. Під мікроскопом ці ділянки виглядають як жовто-коричневі гранули. Ступінь зафарбовування нейтрофілів пропорційна активності пероксидази.

#### **Хід роботи.**

1. Приготувати інкубаційне середовище, для чого: розчинити 20 мг бензидину у 6 мл 96 %-го спирту, додати 4 мл дистильованої води, перемішати та додати 20 мкл 3 %-го розчину перекису водню.
2. Приготувати мазки крові, зафіксувати протягом 30–40 секунд у суміші 96 %-го спирту та формаліну (у співвідношенні 9:1), промити водопровідною водою та висушити.
3. Нанести на фіксовані та висушені мазки крові інкубаційне середовище та витримати протягом 3–4 хв.
4. Злити інкубаційне середовище, мазки крові промити водопровідною водою, висушити та дофарбувати 0,1 %-им розчином нейтрального червоного (або 0,1 %-им розчином сафраніну).
5. Вирахувати результати під світловим мікроскопом в імерсійній системі напівкількісним методом. Необхідно проаналізувати інтенсивність фарбування 100 нейтрофілів та вирахувати середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) за формулою:

$$\text{СЦК} = (0a + 1b + 2c + 3d) / 100,$$

де а – кількість нейтрофілів без гранул;

v, c, d – кількість нейтрофілів із зафарбованою цитоплазмою із різною інтенсивністю зафарбовування цитоплазми:

- 0 – цитоплазма не містить гранул,
- 1 – цитоплазма слабо зафарбована,
- 2 – цитоплазма середньо зафарбована,
- 3 – цитоплазма інтенсивно зафарбована.

6. Результати визначення середнього цитохімічного коефіцієнта занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки про стан киснезалежних антимікробних систем нейтрофілів.

**Інтерпретація.** У нормі значення СЦК становить близько 2,4, і його зниження свідчить про дефектний стан киснезалежних антимікробних систем нейтрофілів.



#### **Заняття 4. ГУМОРАЛЬНА НЕСПЕЦИФІЧНА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ**

##### **Теоретичні положення**

Важливою складовою вродженого імунітету є гуморальна імунна відповідь. Давно відомо, що нормальна сироватка крові інтактних тварин здатна вбивати і лізувати багато грамнегативних бактерій. Це пояснюється, в першу чергу, присутністю в сироватці крові тварин так званих природних антитіл, лізоциму, комплементу, пропердину, інтерферону, бактеріолізинів та інших біологічних мікробоцидних факторів.

Природні антитіла, наприклад, зв'язуються у організмі з мікробами, сприяють активації системи комплементу і руйнуванню таких мікробів. Відомо, що стінка бактеріальної клітини складається з двох шарів. Зовнішній шар містить ліпополісахариди, а внутрішній – пептидоглікан. Під впливом антитіл і комплементу за рахунок естеразної активності спочатку руйнується ліпополісахаридний шар бактеріальної клітини-мішені, після чого за допомогою лізоциму, який присутній у сироватці крові, руйнується пептидоглікановий шар.

Важливим гуморальним фактором вродженого імунітету є пропердин – білок, який активує систему комплементу альтернативним шляхом.

Ще одним фактором вродженого імунітету є бета-лізин – антибактеріальний білок, який вивільняється з тромбоцитів при їх руйнуванні. Він є активним первинним захисно-приспосовчим фактором проти грамположитивних бактерій.

Важливу роль в антимікробному природженому гуморальному імунітеті також віграють інтерферони – білки, які продукуються вірусінфікованими

клітинами ( $\alpha$ -інтерферон – лімфоцитами, моноцитами і макрофагами (лейкоцитарний інтерферон),  $\beta$ -інтерферон – фібробластами, епітеліальними та іншими соматичними клітинами організму тварин (фібробластний інтерферон) і захищають інші, близько розташовані клітини, від інфікування вірусом. Вироблені в ураженій клітині інтерферони індукують у клітин-сусідів продукцію антивірусних білків, які впливають на транскрипцію вірусної м-РНК, пригнічуючи тим самим реплікацію віруса. Імунний  $\gamma$ -інтерферон – синтезується активованими Т-лімфоцитами-хелперами I типу, Т-цитотоксичними лімфоцитами, натуральними кілерами та, в першу чергу, регулюють взаємодію клітин, які беруть участь в імунній відповіді.



### **Завдання 1. Визначити бактерицидну активність сироватки крові собаки фотонелометричним методом**

#### **Теоретичні положення**

Бактерицидна активність сироватки крові як гуморальний фактор неспецифічного захисту тваринного організму є одним з важливих показників резистентності, який свідчить про здатність крові до самоочищення. Бактерицидність крові по відношенню до мікроорганізмів пов'язана з наявністю у крові багатьох неспецифічних захисних елементів (зокрема комплементу, антитіл, лізоциму, пропердину).

**Мета роботи:** ознайомити студентів з фотонелометричним методом визначення бактерицидної активності сироватки крові собаки.

**Обладнання та матеріали:** м'ясо-пептонний агар, бульйон Хотінгера, фізіологічний розчин, дистильована вода, культура *E. coli*, досліджувана сироватка крові собак, піпетки, штативи, фотоелектроколориметр (ФЕК), термостат, кювети шириною 1 см.

**Принцип методу.** Методика визначення бактерицидної активності сироватки крові тварин фотонелометричним методом ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності бульйону Хотінгера при рості в ньому кишкової палички *E. coli* з додаванням і без додавання досліджуваної сироватки крові. У випадку, якщо сироватка крові проявляє свої лізуючі властивості, ступінь світлопропускання суспензії бактерій у дослідній пробі буде меншою у порівнянні з контрольною.

#### **Хід роботи.**

1. Відстандартизувати з допомогою фізіологічного розчину добову культуру *E. coli* до оптичної густини 0,48 (зелений світлофільтр ФЕКу).

2. У стерильні дослідні пробірки розлити піпеткою по 4,5 мл бульйону Хотінгера і додати по 0,5 мл досліджуваної сироватки.

3. У стерильні контрольні пробірки розлити піпеткою по 4,5 мл бульйону Хотінгера і додати по 0,5 мл стерильного фізіологічного розчину.

4. У кожен дослідну і контрольну пробірку внести по 0,05 мл добової культури *E. coli*.

5. З допомогою кювети, заповненої дистильованою водою, встановити на ФЕКу нульове значення.

6. Визначити оптичну щільність досліджуваних і контрольних середовищ на ФЕКу (зелений світлофільтр).

7. Пробірки помістити у термостат при  $t\ 37\ C^0$ .

8. Виміряти оптичну щільність досліджуваних і контрольних середовищ через 3, 5, 7 год.

9. Розрахувати бактерицидну активність сироватки крові за формулою:

$$A = 100 - (D_T - D_0 / K_T - K_0),$$

де  $A$  – бактерицидна активність (% пригнічення росту мікробів);

$D_0, K_0$  – оптичні щільності дослідних і контрольних проб до інкубації;

$D_T, K_T$  – оптичні щільності дослідних і контрольних проб через  $T$  годин інкубації.

10. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** Нормальні фізіологічні показники бактерицидної активності сироватки крові залежно від віку та виду тварин коливаються у межах 25–70 %.

Зниження бактерицидної активності сироватки крові тварин спостерігається під впливом стресових факторів, порушенні умов годівлі та утримання, захворюваннях, які протікають у прихованій та хронічній формах.

Підвищення бактерицидної активності сироватки крові тварин відмічається при гострому перебігу захворювань і при стимулюючій дії різних факторів.



## **Завдання 2. Визначити лізоцимну активність сироватки крові собаки фотоелектроколориметричним методом**

### **Теоретичні положення**

Лізоцим – антибактеріальний фермент класу гідролаз, який руйнує клітинні стінки бактерій гідролізом пептидоглікану (муреїну) та міститься у крові, секретах і тих тканинах тваринного організму, які контактують із зовнішнім середовищем. Лізоцим виробляється різноманітними клітинами, зокрема, гранулоцитами та макрофагами, та є важливим фактором

неспецифічної резистентності організму. Найбільш висока концентрація лізоциму спостерігається у слині, слизі носоглотки, слізного та бронхіального секрету, грудному молоці, у слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту, тощо. Крім того, він також міститься у цитоплазматичних гранулах поліморфоядерних лейкоцитів. У великій кількості цей фермент також присутній у білку яєць.

У лізоциму виділяють два механізми антибактеріальної активності: ферментативний і катіонний. Наявність двох взаємодоповнюючих бактерицидних механізмів зменшує ймовірність повного уникнення патогенними бактеріями антибактеріальної дії лізоциму. Ферментативний механізм антибактеріальної активності лізоциму полягає у його здатності гідролізувати зв'язок між N-ацетилглюкозаміном і N-ацетилмурамовою кислотою полісахаридного компоненту клітинної стінки бактерій – пептидоглікану. У випадку модифікації структури останнього, що збільшує стійкість мікроорганізму до ферментативної дії лізоциму, навіть при повній втраті клітинної стінки бактерії повинні в тій чи іншій мірі зберегти чутливість до катіонних механізмів дії цього білка.

**Принцип методу.** Методика визначення лізоцимної активності сироватки крові тварин ґрунтується на визначенні зміни оптичної щільності мікробної зависі *Mycrococcus lysodeikticus* під впливом лізоциму.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення лізоцимної активності сироватки крові собаки фотоелектроколориметричним методом.

**Обладнання та матеріали:** м'ясо-пептонний агар, стерильний 0,5 %-ий розчин NaCl, культура *Mycrococcus lysodeikticus*, досліджувана сироватка крові собак, піпетки, штативи, фотоелектроколориметр (ФЕК), термостат, кювети шириною 1 см.

**Хід роботи.** Перед дослідженням необхідно перевірити культуру *Mycrococcus lysodeikticus* на лізуючу здатність у стерильному 0,5 %-ому розчині NaCl. Для цього до 2 мл змиву добової культури *Mycrococcus lysodeikticus*, стандартизованої на ФЕКу (зелений світлофільтр) до 0,320 одиниць оптичної щільності, додати 2 мл стерильного 0,5 %-ого розчину NaCl і провести визначення оптичної щільності. Інкубувати пробірку з добовою культурою *Mycrococcus lysodeikticus* у термостаті при  $t\ 37\ ^\circ\text{C}$  протягом 3 годин, після чого провести повторну колориметрію. Лізис мікробних тіл не повинен перевищувати 15 %.

1. Стандартизувати культуру *Mycrococcus lysodeikticus* на ФЕКу (зелений світлофільтр) до 0,320 одиниць оптичної щільності, що відповідає вмісту 1 млрд мікробних тіл у 1 мл суспензії.

2. З допомогою кювети, заповненої 0,5 %-им розчином NaCl, встановити на ФЕКу нульове значення.

3. Розвести досліджувану сироватку крові у співвідношенні 1:2 з допомогою 0,5 %-ого розчину NaCl.
4. У дослідному зразку до 2 мл розведеної сироватки крові додати 2 мл стандартизованої суспензії мікробної культури.
5. У контрольному зразку до 2 мл 0,5 %-ого розчину NaCl додати 2 мл стандартизованої суспензії мікробної культури.
6. Проколориметрувати проби у кюветах шириною 1 см при зеленому світлофільтрі.
7. Інкубувати у термостаті за температури 37 °C протягом 3 годин.
8. Повторно проколориметрувати проби при зеленому світлофільтрі.
9. Розрахунок лізису за наступною схемою:

$$L = (D_o - D_i / D_o - D_{ko} - D_{ki} / D_{ko}) \times 100 \%,$$

де L – % лізису;

$D_o$  – оптична щільність дослідних кювет до інкубації;

$D_i$  – оптична щільність дослідних кювет після інкубації;

$D_{ko}$  – оптична щільність контрольних кювет до інкубації;

$D_{ki}$  – оптична щільність контрольних кювет після інкубації.

10. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** Нормальні фізіологічні показники лізоцимної активності сироватки крові залежно від виду та віку тварин коливаються у межах 10–50 %.

Зниження та підвищення лізоцимної активності сироватки крові тварин спостерігається під впливом тих самих факторів, що і бактерицидної активності.



### **Завдання 3. Визначити активність комплементу сироватки крові корови за 50 % гемолізом еритроцитів барана**

#### **Теоретичні положення**

До числа найважливіших неспецифічних гуморальних факторів захисту організму відноситься система комплементу, що складається більш, ніж з 20 білків, які складають близько 10 % глобулінової фракції сироватки крові тварин. Основне джерело синтезу білків комплементу – гепатоцити. Крім цього, компоненти комплементу виробляються в селезінці, кістковому мозку, а також лімфоепітеліальними клітинами в осередку запалення. У неактивній формі система комплементу існує у вигляді окремих компонентів (C1–C9), а також регулюючих білків. У присутності комплексу антиген-антитіло, агрегованих імуноглобулінів комплемент активується класичним шляхом. Альтернативний

шлях активації комплементу індукують поверхневі структури мікроорганізмів при відсутності комплексу антиген-антитіло.

Комплемент відіграє важливу роль у розвитку запалення, імунної відповіді. Продукти активації комплементу індукують лізис чужорідних клітин, хемотаксис фагоцитів, підсилюють поглинальну здатність і бактерицидну активність фагоцитів, підвищують проникність судин, сприяють звільненню з клітин серотоніну і гістаміну.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення активності комплементу сироватки крові корови за 50 % гемолізом еритроцитів барана.

**Обладнання та матеріали:** еритроцити барана, досліджувана сироватка крові корів, фізіологічний розчин, стерильні пластикові або скляні пробірки, піпетки, центрифуга, дистильована вода, ФЕК, реактиви:

1. Розчин № 1: 0,164 М хлористого натрію (9,587 г NaCl на 1 л дистильованої води) – для титрування сироватки щурів та мишей або 0,15 М розчин NaCl (8,777 г на 1 л дистильованої води) – для титрування сироватки кролів.

2. Розчин № 2: 1/15 М розчин однозаміщеного фосфорнокислого калію (9,073 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – на 1 л дистильованої води).

3. Розчин № 3: 1/15 М розчин двозаміщеного фосфорнокислого натрію (11,87 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – на 1 л дистильованої води).

4. Розчин № 4 (фосфатний буфер): до 29,6 мл розчину № 2 доливають до 100 мл розчин № 3 та перевіряють рН розчину, який має бути 7,2.

5. Забуферений фосфатами ізотонічний розчин хлориду натрію (рН 7,2) готують, змішуючи 9 частин розчину № 1 та 1 частину розчину № 4.

6. 2 % розчин сапоніну (2 г сапоніну розчиняють у 98 мл дистильованої води).

**Принцип методу.** Метод ґрунтується на властивості комплементу викликати лізис сенсibiliзованих еритроцитів барана (ЕБ). Використовуючи ряд розведень досліджуваної сироватки з наростаючою кількістю комплементу, визначають об'єм сироватки, необхідний для гемолізу 50 % сенсibiliзованих ЕБ. Ця величина позначається  $I_{\text{CH}_{50}}$  і є одиницею гемолітичної активності комплементу.

#### **Хід роботи. Підготовка.**

1. Приготувати 3 %-у суспензію еритроцитів барана, тричі відмиваючи їх розчином № 5 шляхом центрифугування 10 хвилин при 300 g.

2. Відстандартизувати суспензію еритроцитів: 0,2 мл підготовленої суспензії лізують в 4,8 мл дистильованої води та визначають оптичну щільність лізату за допомогою ФЕКу при довжині хвилі – 541 нм. Правильно підготовлена суспензія ЕБ повинна мати оптичну густину 0,375. У випадку невідповідності кінцевий об'єм суспензії ( $V_{\text{к}}$ ) розраховують за формулою:

$$V_k = V_n \times (\text{ОЩ}/0,375),$$

де  $V_n$  – початковий об'єм суспензії ЕБ;  
ОЩ – оптична щільність лізату.

3. Приготувати робочий розчин гемолітичної сироватки, змішуючи рівні об'єми розведеного розчину № 5 по трьохкратному титру гемолітичної сироватки до еритроцитів барана (при титрі сироватки 1:1200, готують робоче розведення 1:400) та 3 %-ої суспензії ЕБ. При змішуванні гемолітичну сироватку вносять до суспензії ЕБ, а не навпаки. Суміш витримують 30 хвилин за температури 37 °С для сенсibiliзації еритроцитів.

4. Приготувати досліджувану сироватку: відстояти при кімнатній температурі протягом 1 години для зсідання еритроцитів та відцентрифугувати впродовж 10 хвилин за відцентрової сили 300 g та температури 4 °С.

5. Відтитрувати комплемент (відразу після одержання сироватки), при цьому всі операції по титруванні комплементу проводять в льодяній бані.

#### **Хід роботи. Виконання.**

1. Розвести досліджувану сироватку крові 1:30 у розчині № 5 та розлити у 10 пробірок в кількості від 0,1 до 1,0 мл.

2. Довести об'єм сироватки у кожній пробірці розчином № 5 до 1,0 мл.

3. Додати у кожну пробірку 2,0 мл сенсibiliзованих еритроцитів барана.

4. Додатково приготувати ще 3 контрольні проби: № 1 – контроль на 100 % гемоліз (до 2,0 мл гемолітичної системи вносять 1,0 мл дистильованої води та 1 краплю 2 % розчину сапоніну); № 2 – контроль на спонтанний гемоліз сенсibiliзованих еритроцитів (беруть 2,0 мл гемолітичної системи та 1,0 мл розчину № 5); № 3 – контроль гемолізу досліджуваної сироватки (беруть 1,0 мл сироватки в розведенні 1:30 та 2,0 мл розчину № 5).

5. Вміст пробірок добре перемішати і поставити у термостат за температури 37 °С на 30 хв, після чого пробірки перенести на 10 хв у холодильник за температури 4 °С для зупинки імунного гемолізу та відцентрифугувати впродовж 10 хв за відцентрової сили 300 g.

6. Після центрифугування дослідних пробірок виміряти оптичну густину їх надосадової рідини на спектрофотометрі при довжині хвилі 541 нм проти проби надосадової рідини в пробірці №2 (контроль спонтанного гемолізу сенсibiliзованих еритроцитів); контроль гемолізу досліджуваної сироватки визначити проти кювети з розчином № 5. Істинну оптичну густину кожної дослідної пробірки отримати, віднявши від показника одержаної оптичної густини контроль гемолізу досліджуваної сироватки.

**Варіант 1.** Для кожного розведення сироваток дослідних пробірок розраховують ступінь гемолізу (Y) та величину  $Y/(1-Y)$ :

$$Y = (\text{істинна ОЦ зразку})/(\text{ОЦ, відповідна 100 \% гемолізу}).$$

На логарифмічному папері будують графік залежності величини  $Y/(1-Y)$  по осі абсцис від об'єму досліджуваної сироватки в мл (вісь ординат). Для більшої точності беруть « $Y$ » між 0,20 та 0,80. Беручи до уваги, що величина  $CH_{50}$  – це об'єм досліджуваної сироватки, який викликає лізис 50 % сенсibiliзованих еритроцитів, то в даних умовах постановки досліду на графіку знаходять той об'єм досліджуваної сироватки (те значення « $X$ »), при якому « $Y$ » =  $1,0 \times (0,5/1,0 - 0,5)$ .

**Варіант 2.** На півлогарифмічному папері будують графік залежності між величинами  $100 \llcorner Y \gg$  по осі абсцис та об'ємом сироватки у мл по осі ординат. Величина мл сироватки по осі ординат, яка відповідає величині  $100 Y = 50$  по осі абсцис, і буде величиною  $CH_{50}$ .

Після отримання значення  $CH_{50}$  вираховують кількість одиниць  $CH_{50}$  у 1,0 мл досліджуваної сироватки виходячи з формули:

$$CH_{50} (\text{мл}) = A/X,$$

де:  $X$  – об'єм сироватки в мл, який містить 1  $CH_{50}$ ;

$A$  – ступінь первинного розведення сироватки.

Наприклад, при первинному розведенні сироватки 1:30 та величині  $CH_{50}$  – 0,2 мл 1 мл досліджуваної сироватки вміщує:  $30/0,2 = 150 CH_{50}$ .

Активність комплементу виражають в гемолітичних одиницях.

7. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Дати оцінку результатів.

**Інтерпретація.** Нормальні показники активності комплементу сироватки крові залежно від виду та віку тварин коливаються у межах 40–50 %. Висока загальна активність комплементу є сприятливою ознакою, оскільки підвищується загальна неспецифічна резистентність організму. Зниження активності комплементу при різних патологічних станах є прогностично несприятливою ознакою.



#### **Завдання 4. Визначити титр гетерофільних аглютининів у сироватці крові кролів**

##### **Теоретичні положення**

Гетерофільні аглютиніни відносяться до нормальних антитіл і є одним із факторів захисту організму – неспецифічного імунітету. Утворюються ці антитіла в результаті спонтанної імунізації антигенами, які широко розповсюджені у природі. Кількість гетерофільних аглютининів визначають за допомогою реакції Пауля-Буннеля.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення титру гетерофільних аглютининів у сироватці крові кролів.

**Обладнання та матеріали:** кров кролів, фізіологічний розчин натрію хлориду, 3 %-ва суспензія еритроцитів барана, штатив для пробірок, стерильні пробірки, піпетки, центрифуга, термостат, водяна баня.

**Принцип методу.** Реакція аглютинації базується на здатності антитіл (аглютининів), що знаходяться в сироватці крові, склеювати у фізіологічному розчині еритроцити барана.

##### **Хід роботи.**

1. Зібрати кров у сухі пробірки та помістити у термостат на 15–30 хв при температурі 37 °С для утворення фібринового згустку.
2. З кожної пробірки піпеткою відібрати сироватки та відцентрифугувати при 300 g протягом 10 хвилин після чого сироватки перенести у чисті пробірки, відповідно їх помаркувавши.
3. Інактивувати сироватки на водяній бані при температурі 56 °С протягом 30 хв.
4. По 0,25 мл кожної інактивованої сироватки розвести фізіологічним розчином таким чином: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128.
5. До 1 мл кожного розведення інактивованої сироватки додати по 0,5 мл 3 %-вої суспензії еритроцитів барана і пробірки з розведеннями помістити на 2 год у термостат за температури 37 °С, а потім на 24 год у холодильник.
6. Спостерігати за наявністю аглютинації еритроцитів у кожному розведенні сироватки. Визначеним титром вважати те розведення, при якому ще спостерігається аглютинація еритроцитів. У нормі у лабораторних тварин титр гетерофільних аглютининів становить близько 1:8.
7. Результати визначення титру занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** Зниження титру гетерофільних аглютининів сироватки крові тварин супроводжує стрес, інфекційні захворювання тварин, які протікають у прихованій та хронічній формах, гельмінтози тощо.

Підвищення титру гетерофільних аглютининів сироватки крові тварин відмічається при гострому перебігу захворювань і при стимулюючій дії різних факторів.



### **Завдання 5. Визначити титр гемолізину в сироватці крові кролів**

#### **Теоретичні положення**

Гемолізини – антитіла до поверхневих еритроцитарних антигенів, які здатні за участю комплементу руйнувати мембрани еритроцитів, в результаті чого відбувається вихід гемоглобіну в навколишній розчин – гемоліз.

Гемолізини з'являються в сироватці крові тварин внаслідок імунізації чужорідними еритроцитами і при аутоімунних захворюваннях (наприклад, аутоімунній гемолітичній анемії). Сироватка тварин, імунізованих еритроцитами, яка містить гемолізини, називається гемолітичною.

Гемолізини є причиною внутрішньосудинного гемолізу при переливанні несумісної крові і при гемолітичній хворобі новонароджених. Гемолізинами називаються також токсини мікроорганізмів (стафілококів, стрептококів та ін.), гельмінтів, а також речовини, які містяться у секретах деяких змій, скорпіонів, бджіл, павуків та ін., що викликають ферментативне руйнування еритроцитів.

Визначення титру гемолізину в сироватці крові проводять після попередньої імунізації тварин еритроцитами барана з метою оцінки імунного статусу тварин, імуномодулюючої дії імунобіологічних препаратів тощо.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення титру гемолізину в сироватці крові кролів.

**Обладнання та матеріали:** кров кролів, фізіологічний розчин натрію хлориду, сухий комплемент морської свинки, 1 %-ва суспензія еритроцитів барана, штатив для пробірок, стерильні пробірки, піпетки, пластикові планшети, термостат, водяна баня.

**Принцип методу.** Метод базується на здатності гемолізину в сироватці крові у присутності комплементу гемолізувати еритроцити барана.

#### **Хід роботи.**

1. За 7–10 днів до проведення визначення титру гемолізину імунізувати кролів внутрішньоочеревинним введенням 5 %-вої суспензії еритроцитів барана з розрахунку 2 мл суспензії на 1 кг маси тіла.

2. Відібрати кров кролів у сухі пробірки та помістити у термостат на 15–30 хв при температурі 37 °С для утворення фібринового згустку.

3. З кожної пробірки піпеткою відібрати сироватки та відцентрифугувати при 300 g протягом 10 хвилин після чого сироватки перенести у чисті пробірки, відповідно їх помаркувавши.

4. Інактивувати сироватки на водяній бані при температурі 56 °С протягом 30 хв.

5. По 0,1 мл інактивованої сироватки кожного з кролів розвести фізіологічним розчином таким чином: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 і т. д.

6. У лунки пластикового планшету до 0,2 мл кожного розведення інактивованої сироватки кролів додати по 0,1 мл 1 %-вої суспензії еритроцитів барана та інкубувати 30 хв у термостаті за температури 37 °С.

7. До суміші додати комплемент морської свинки, який попередньо розчинити фізіологічним розчином у співвідношенні 1:10. Суміш перемішати та інкубувати за температури 37 °С протягом 1 год.

8. Спостерігати за наявністю гемолізу у кожному розведенні сироватки. Найбільше розведення сироватки, яке спричиняє гемоліз еритроцитів, визначається як титр гемолізинів.

9. Результати визначення титру занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** Зниження титру гемолізинів у сироватці крові дослідних тварин свідчить про зниження їхнього гуморального імунного статусу на фоні хронічно протікаючих інфекційних захворювань, гельмінтозів, поганих умов годівлі та утримання тварин, пригнічуючу дію на гуморальну ланку імунної відповіді того чи іншого імунобіологічного препарату; підвищення титру – про наявність гостро протікаючого інфекційного захворювання, запального процесу, стимулюючу дію досліджуваних імунобіологічних препаратів.



### **Завдання 6. Визначити вміст циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щурів**

#### **Теоретичні положення**

Зв'язування антигену з антитілом з утворенням імунного комплексу є одним з механізмів, направлених на елімінацію антигену з організму. Циркулюючі імунні комплекси здатні приєднувати компоненти комплементу і утворювати комплекс антиген-антитіло-комплемент, який має властивість осідати у тканинах, на судинній стінці, викликаючи пошкодження різного ступеню важкості внаслідок активації системи комплементу. У зв'язку з цим, рівень циркулюючих імунних комплексів є одним з діагностичних показників активності і ступеню важкості імунопатологічного процесу.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щурів.

**Обладнання та матеріали:** кров щурів, борна кислота, тетраборат натрію, поліетиленгліколь з молекулярною масою 6000 Да, дистильована вода, штатив для пробірок, стерильні пробірки, колби, спектрофотометр, кювети, піпетки, рН-метр.

**Принцип методу.** Метод ґрунтується на зміні величини світлового розсіювання розчину поліетиленгліколю внаслідок осадження ним циркулюючих імунних комплексів сироватки крові тварин.

#### **Хід роботи.**

1. Приготувати 0,1 М боратний буфер. Для цього 3,410 г борної кислоти змішати з 4,275 г тетраборату натрію та додати до 1л дистильованої води. рН отриманого буферу має дорівнювати 8,4.

2. Свіжоотриману кров щурів помістити у термостат за температури 37 °С на 2 год для осадження грубодисперсних білків, які не мають відношення до циркулюючих імунних комплексів.

3. У контрольні пробірки внести по 0,2 мл досліджуваних сироваток, попередньо розведених у три рази (0,2 мл сироватки + 0,4 мл буферу), і 1,8 мл боратного буферу.

4. У дослідні пробірки внести по 0,2 мл досліджуваних сироваток, попередньо розведених у три рази (0,2 мл сироватки + 0,4 мл буферу), і 1,8 мл 3,5 %-ого розчину поліетиленгліколю на боратному буфері.

5. Помістити пробірки на 2 години у термостат при t 20 °С.

6. Визначити на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм відсоток світлопропускання у дослідних та контрольних пробірках.

7. Вирахувати різницю показників оптичної щільності у дослідних та контрольних пробірках і результат перемножити на 1000 (одержують вміст імунних комплексів у 100 мл сироватки крові). При збільшенні вмісту циркулюючих імунних комплексів відсоток світлопропускання знижується.

8. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** Утворення імунних комплексів (комплексів антиген-антитіло) – інтегральний показник гуморальної імунної відповіді. Певний рівень циркулюючих імунних комплексів повинен обов'язково бути присутнім у крові тварини, реалізуючи фізіологічні процеси антигенного гомеостазу.

Підвищення рівня циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові тварин вказує на розвиток імунотоксикозу при певній патології.



## САМОСТІЙНА РОБОТА



### **Тема 4. МОРФОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ КРОВІ ТВАРИН У РАЗІ ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

#### **Теоретичні положення**

Зміна кількісного та якісного складу крові являється важливим тестом для діагностики у тварин імунного стану за фізіологічних умов та при захворюваннях різної етіології.

Лейкограма (лейкоцитарна формула) – це відсоткове співвідношення різних субпопуляцій лейкоцитів (базофілів, еозинофілів, нейтрофілів, моноцитів, лімфоцитів), яке визначається шляхом їх підрахунку у пофарбованому мазку крові тварини під мікроскопом.

Характер лейкограми залежить від виду тварини, її статі, віку, конституції. При цьому у тварин одного і того ж виду можуть бути відмінності у лейкограмі в залежності від характеру годівлі, породи та інших факторів, які формують вроджений та набутий імунітет.

Велике значення лейкограма має в клінічній практиці, оскільки при будь-яких змінах в організмі зменшується або збільшується і відсотковий вміст окремих субпопуляцій лейкоцитів. За даними лейкограми можна досить точно визначити стан імунного захисту організму, характер перебігу патологічного процесу, прогнозувати появу ускладнень і наслідки хвороби.

Оскільки лейкоцити відіграють важливу роль у здійсненні захисних реакцій організму тварин, а їх загальна кількість характеризує імунобіологічну реактивність організму, то зміна кількості лейкоцитів у крові тварин цілком може вказувати на стан реактивності організму, характер її коливань під впливом ендо- та екзогенних чинників (табл. 2.1).

Показник вмісту лейкоцитів у крові тварин досить лабільний. Цілий ряд нормальних фізіологічних процесів, таких як м'язове напруження, стрес, приймання їжі, зміна положення тіла, вагітність та ін., викликає його істотні зрушення (зазвичай за рахунок зміни вмісту нейтрофілів), що необхідно враховувати при оцінці результатів підрахунку лейкоцитів.

*Таблиця 2.1. Фізіологічні параметри кількості лейкоцитів у крові тварин (Г/л,  $10^9$ /л)*

<b>ВРХ</b>	<b>Вівці</b>	<b>Кози</b>	<b>Свині</b>	<b>Коні</b>	<b>Собаки</b>	<b>Коти</b>
6,0–12,0	6,0–13,0	6,0–13,0	9,0–16,0	6,0–11,0	8,5–10,5	10,0–15,0

Підвищення в крові загальної кількості лейкоцитів (лейкоцитоз) у переважній більшості випадків зумовлене збільшенням певного їх виду: частіше – нейтрофілів і лімфоцитів, значно рідше – еозинофілів і моноцитів.

Лейкоцитози бувають фізіологічні і патологічні, абсолютні і відносні.

Фізіологічний лейкоцитоз спостерігається у здорових новонароджених тварин, при вагітності, при фізичному навантаженні (міогенний), після приймання корму (травний), при зміні часових поясів (акліматизаційний). У більшості випадків фізіологічний лейкоцитоз носить перерозподільчий характер. Він виникає при переході лейкоцитів від пристінкового пулу у циркулюючий.

Патологічні лейкоцитози мають різну етіологію і зустрічаються при різних патологічних процесах і захворюваннях. Вони завжди вторинні по відношенню до первинного захворювання і непостійні. Патологічний лейкоцитоз супроводжує усі гострі інфекційні хвороби, хронічні захворювання у фазі загострення; спостерігається за наявності в організмі запальних процесів, при хронічному і гострому мієлолейкозі, при злоякісних новоутвореннях кровотворних органів, на ранніх етапах післяопераційного періоду після хірургічних втручань, при моноцитарному гострому і хронічному лейкозі, при гельмінтозах (трихоцефальозі, фасціольозі, стронгілоїдозі, аскаридозі, ехінококозі, опісторхозі, лямбліозі та ін.) під час тканинного циклу розвитку гельмінтів.

Абсолютний лейкоцитоз виявляється збільшенням абсолютного числа всіх видів лейкоцитів, відносний – збільшенням відсоткового вмісту окремих видів лейкоцитів при одночасному зменшенні інших видів.

Лейкопенія – зменшення в крові загальної кількості лейкоцитів. За походженням лейкопенії можуть бути первинними (спадковими) і вторинними (набутими). Первинні лейкопенії успадковуються зазвичай за аутосомно-рецесивним типом. В етіології вторинних лейкопеній велике значення мають різні, як правило, інтенсивні і тривало діючі, фізичні, хімічні та біологічні патогенні чинники. Лейкопенія спостерігається при дії на організм іонізуючої радіації, рентгенівських променів, неорганічних (миш'як, золото, свинець та ін.) та органічних (бензол, інсектициди та ін.) речовин, гіпотиреозі, гіпокортицизмі, дефіциту інтерлейкінів (особливо ІІ-3), важких інфекційних і запальних процесах (сепсис, перитоніт та ін.), при аутоімунних захворюваннях, дефіциті вітаміну В<sub>12</sub>, тривалому застосуванні сульфаніламідів, антибіотиків тощо.

Також розрізняють лейкопенії апластичні (при пригніченому лейкопоезі), лейколітичні (при руйнуванні лейкоцитів у крові та/чи кровотворних органах), а також внаслідок підвищеного видалення лейкоцитів з організму чи перерозподілу їх в кровоносному руслі.

Зміни абсолютного вмісту лейкоцитів мають розглядатися у клінічній імунологічній діагностиці не окремо, а в сукупності з лейкограмою крові, оскільки характер лейкограми із зміною співвідношення окремих видів

лейкоцитів, наявністю ядерного зсуву нейтрофілів та дегенеративних змін у клітинах має клінічне значення (табл. 2.2).

Таблиця 2.2. Лейкоцитарна формула крові здорових тварин, %

Вид тварин	Базоф.	Еозиноф.	Нейтрофіли			Лімф.	Мон.
			юні	паличко-ядерні	сегменто-ядерні		
<b>ВРХ</b>	0–2	3–8	0–1	2–5	20–35	40–75	2–7
<b>Вівці</b>	0–1	1–4	0–2	2–4	40–48	40–50	2–6
<b>Кози</b>	0–2	2–8	1–4	5–20	20–40	40–70	2–5
<b>Свині</b>	0,3–0,8	4–12	0–2	3–6	25–35	40–50	2–5
<b>Коні</b>	0–1	2–6	0–0,5	3–6	45–62	25–44	2–4
<b>Собаки</b>	0–1	2,5–9,5	–	1–6	43–72	21–40	1–5
<b>Коти</b>	0–1	2–8	0–1	3–9	40–45	36–51	1–5

Збільшення відносної кількості еозинофілів (еозинофілія) понад норму, яка у різних видів тварин коливається від 2 до 12 % і свідчить перш за все про алергізацію організму, спостерігається при тканинній фазі розвитку гельмінтів, алергіях, довготривалому застосуванню тваринам антибіотиків, сульфаніламідів; при злоякісних новоутвореннях, стресах, хронічному мієлолейкозі.

Еозинофілія є супутником будь-якого запального процесу: зазвичай вона з'являється на пізніх етапах запалення і є ознакою позитивної динаміки хвороби. На ранніх етапах запалення спостерігається протилежне явище – еозинопенія або навіть анеозинофілія (повна відсутність еозинофілів).

Вміст базофільних гранулоцитів у крові тварин за фізіологічних умов складає менше 2 %. У багатьох лабораторіях рівень базофілів не підраховують, оскільки для цього потрібен аналіз принаймні 500–1000 лейкоцитів. Базофільні гранулоцити за функціональною активністю подібні до тучних клітин. Функціональна подібність до тучних клітин пояснює тісну кооперацію базофілів крові з еозинофільними гранулоцитами. Тому вказані показники часто мають синхронну динаміку.

Збільшення відносного вмісту базофілів – базофілія – в клінічній ветеринарній практиці зустрічається досить рідко, проте може розвиватися при лікуванні тварини естрогенвмісними препаратами, супроводжувати гострий лейкоз, хронічний мієлолейкоз, лімфогранулематоз, алергічні реакції, гемолітичні анемії, цукровий діабет, дисфункцію щитоподібної залози, хронічні запальні захворювання шлунково-кишкового тракту.

Анбазофілія (повна відсутність базофілів) є ознакою ранньої фази запальної відповіді й поєднується з анеозинофілією. Відновлення рівня базофілів відбувається в період стихання клінічних проявів хвороби синхронно зі збільшенням кількості еозинофілів і є прогностично сприятливою ознакою.

Збільшення відносного вмісту нейтрофілів (нейтрофілія) спостерігається за усіх гострих запальних процесів, при цьому нейтрофіли є основними

клітинами, які викликають лейкоцитоз на початкових етапах. При цьому вираженість нейтрофілії є показником інтенсивності запальної реакції. Відносно невисока нейтрофілія при поширеній бактеріальній інфекції (наприклад, пневмонії) може бути ознакою імунодефіцитного стану. Тому, в умовах адекватної імунної відповіді при запальних процесах рівень підвищення кількості нейтрофілів має корелювати з вираженістю клінічної картини захворювання.

Зниження відносного вмісту нейтрофілів (нейтропенія) свідчить про недостатність фагоцитарної ланки імунітету, у зв'язку з чим лікувальні впливи мають бути спрямовані саме на стимуляцію процесів дозрівання, проліферації, активації та функціонування нейтрофілів. Нейтропенія може зустрічатися на ранньому етапі запалення внаслідок швидкого надходження великої кількості циркулюючих клітин до вогнища інфекції; вона може бути і наслідком гіпопластичних станів кісткового мозку, як первинних (автоімунних), так і вторинних, унаслідок інтоксикації екзогенними або ендогенними (частіше) сполуками (при нирковій, печінковій недостатності та ін.) чи внаслідок ураження променевою енергією. Нейтропенія також може бути наслідком гельмінтозної інвазії, оскільки переважна більшість гельмінтів разом із токсичною дією кінцевих продуктів обміну цілеспрямовано синтезує речовини із супресорною активністю щодо процесу кровотворення.

Оскільки при запаленні велика кількість нейтрофілів використовується у процесах фагоцитозу, у кров надходять молоді форми цих клітин – юні та паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити. Цей лабораторний феномен отримав назву зсуву ядра нейтрофілів ліворуч. Подібний зсув свідчить про напруженість та інтенсивність запальної реакції: чим більш виражений зсув (вищий рівень юних і паличкоядерних нейтрофілів), тим більш інтенсивно проявляється регенеративна функція кісткового мозку, яка сприяє перебігу запального процесу. Слабкий зсув ядра нейтрофілів ліворуч при масивній бактеріальній інфекції (наприклад, пневмонії) свідчить про токсичне ураження кісткового мозку, зниження його регенеративної активності чи наявність імунних дефектів і є підставою для імунологічного обстеження.

Зниження вмісту молодих форм нейтрофілів призводить до зсуву ядра нейтрофілів праворуч, що вказує на гіпорегенераторний стан кісткового мозку і спостерігається при гіпопластичній анемії.

Загальний аналіз крові може виявити також деякі якісні зміни нейтрофілів, до яких належать гіперсегментація ядра і поява базофільної зернистості цитоплазми.

Як відомо, зрілі нейтрофіли є сегментоядерними, однак кількість сегментів у ядрі обмежена (2–5 сегментів). Поява гіперсегментації ядра свідчить про підвищену фрагментацію хроматину клітин дистрофічного генезу і спостерігається при порушеннях дозрівання попередників нейтрофілів (зокрема, при дефіциті вітаміну В<sub>12</sub> або інтоксикаційному пригніченні мієлопоезу).

Базофільна зернистість нейтрофілів зустрічається при вираженій інтоксикації організму продуктами запальної реакції, мікробними токсинами і свідчить про загрозу зриву компенсаторних механізмів. Поява зазначеної зернистості часто супроводжується зниженням фагоцитарної активності нейтрофілів, послабленням їх адгезивних властивостей.

Різке зниження в крові вмісту усіх видів гранулоцитів носить назву «агранулоцитоз». Оскільки гранулоцити складають значну частину кількості лейкоцитів, агранулоцитоз незмінно супроводжує лейкопенію. Зважаючи на відносний вміст гранулоцитів у периферичній крові, під агранулоцитозом у першу чергу розуміють різке зниження вмісту у крові нейтрофілів.

Збільшення відносного вмісту лімфоцитів (лімфоцитоз) характерний для другої половини імунної відповіді, яка розгортається внаслідок отримання лімфоцитами інформації про антиген від антигенпрезентуючих клітин (макрофагів, дендритних клітин). При переході імунної відповіді в лімфоцитарну фазу в клінічній картині спостерігається стихання клінічних проявів запалення. Якщо зміна нейтрофільної фази на лімфоцитарну не супроводжується прогресуючим послабленням симптомів запальної реакції, то це є несприятливим прогностичним фактором, оскільки свідчить про те, що сформовані імунокомпетентні клітини не в змозі переключити імунну відповідь на специфічний (адаптивний) рівень.

Зниження відносного вмісту лімфоцитів (лімфоцитопенія) характерне для важкопротікаючих інфекцій, гнійно-септичних захворювань та є неблагополучною прогностичною ознакою.

Оскільки моноцити є попередниками макрофагів – клітин, які володіють антигенпрезентуючою функцією – збільшення відносного вмісту моноцитів (моноцитоз) спостерігається у разі наявності в організмі тварин внутрішньоклітинних збудників (віруси, гриби, мікоплазми, хламідії). При цьому відносний моноцитоз поєднується з лімфоцитарним лейкоцитозом. Також відносний моноцитоз спостерігається при хворобах, для яких характерне продуктивне запалення (з формуванням гранульом).

Зниження відносного вмісту моноцитів (моноцитопенія), як і лімфоцитів, характерне для важкопротікаючих інфекцій, гнійно-септичних захворювань та є несприятливою прогностичною ознакою.



### **Завдання 1. Розглянути будову камери Горяєва та методику її підготовки для підрахунку клітин крові тварин**

#### **Теоретичні положення**

Загальний аналіз крові, зокрема визначення кількості лейкоцитів та еритроцитів у одиниці її об'єму, є джерелом дуже важливої інформації для ветеринарного лікаря, оскільки характеризує не лише фізіологічний стан організму тварини, а й частково її імунний статус, який може змінюватись під

впливом різних зовнішніх і внутрішніх факторів, і є невід'ємною частиною діагностичного процесу та подальшого моніторингу стану тварини на тлі проведеної терапії.

Підрахунок клітин крові може здійснюватися як автоматично (з допомогою автоматичних аналізаторів), так і вручну з використанням рахункових камер (Горяєва, Нейбауера, Бюркера).

У сучасних гематологічних аналізаторах технологія підрахунку формених елементів крові заснована на кондуктометричному методі, запропонованому Н. Wallace і Joseph R. Culter у 1947 р. Принцип методу полягає в підрахунку числа і визначенні характеру імпульсів, що виникають при проходженні клітини через отвір малого діаметру (апертуру), по обидві сторони якого розташовані два ізольованих один від одного електроди. Кожне проходження клітини через апертуру супроводжується появою електричного імпульсу, який реєструється електронним датчиком. Щоб визначити концентрацію клітин, досить пропустити певний обсяг проби через канал і підрахувати кількість імпульсів, які при цьому генеруються. Якщо в один і той же момент в каналі знаходяться 2 клітини, то вони реєструються у вигляді одного імпульсу, що призводить до помилки в підрахунку клітин. Щоб уникнути цього явища проводиться розведення проби ізотонічним розчином до такої концентрації, щоб в одиницю часу в каналі датчика знаходилася тільки одна клітина. Однак при поганому перемішуванні (гомогенізації) зразка крові перед дослідженням можливе виникнення такої помилки навіть при правильному підборі розведення.

Поділ клітин за категоріями (еритроцити, лейкоцити, тромбоцити) здійснюється приладом на підставі аналізу амплітуди отриманих імпульсів. Невеликі за розмірами клітини (тромбоцити) генерують імпульси низької амплітуди, а порівняно великі клітини (лейкоцити, еритроцити) – імпульси високої амплітуди. Пристрій розділяє амплітуди імпульсів за величиною, що й дає можливість окремо підрахувати кількість тромбоцитів і еритроцитів.

Оскільки розміри лейкоцитів близькі до розмірів еритроцитів і їх не вдається виділити зазначеним методом, вони неминуче будуть впливати на підрахунок еритроцитів. Однак за винятком явних лейкоцитозів, цей вплив буде незначним, оскільки в нормі концентрація еритроцитів у крові значно перевищує концентрацію лейкоцитів. У той же час при підрахунку кількості лейкоцитів необхідність руйнування еритроцитів очевидна. Це завдання легко вирішуване, оскільки властивості мембран лейкоцитів і еритроцитів істотно розрізняються, і еритроцити легко лізуються під впливом багатьох поверхнево-активних речовин.

Метод підрахунку клітин крові з використанням рахункових камер також знайшов своє місце, особливо у невеликих закладах ветеринарної медицини. У нашій країні найчастіше користуються рахунковою камерою із сіткою Горяєва.

Рахункова камера Горяєва являє собою товсту скляну пластину (предметне скло) з поглибленням в центрі, рівним 0,1 мм (рис. 2.2, 2.3).

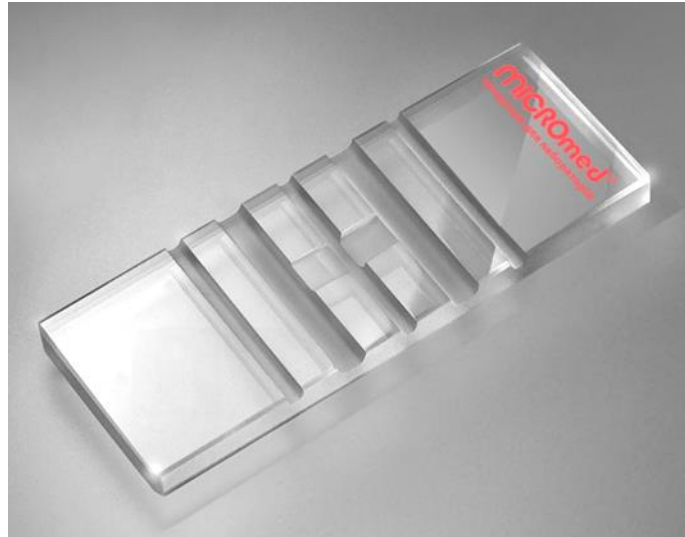


Рис. 2.2. Камера Горяєва (4-х секційна)

На дні камери нанесені 2 або 4 сітки Горяєва, розмежовані поперечною канавкою. Збоку від сіток розташовані скляні прямокутні пластини, до яких притирається шліфоване покривне скло. Кожна сітка Горяєва складається з 225 великих квадратів, 25 з яких розділені ще на 16 малих квадратів (рис. 2.4). Сторона великого квадрата дорівнює 0,2 мм, сторона малого квадрата – у 4 рази менша (0,05 мм). Відповідно, площа великого квадрата становить  $0,04 \text{ мм}^2$  ( $4 \times 10^{-2} \text{ мм}^2$ ), малого квадрата –  $0,0025 \text{ мм}^2$  ( $25 \times 10^{-4} \text{ мм}^2$ ). Якщо враховувати глибину камери, рівну 0,1 мм, то об'єм одного малого квадрата сітки Горяєва складе  $2,5 \times 10^{-4} \text{ мкл}$ , великого –  $4 \times 10^{-3} \text{ мкл}$  ( $\text{мм}^3$ ).

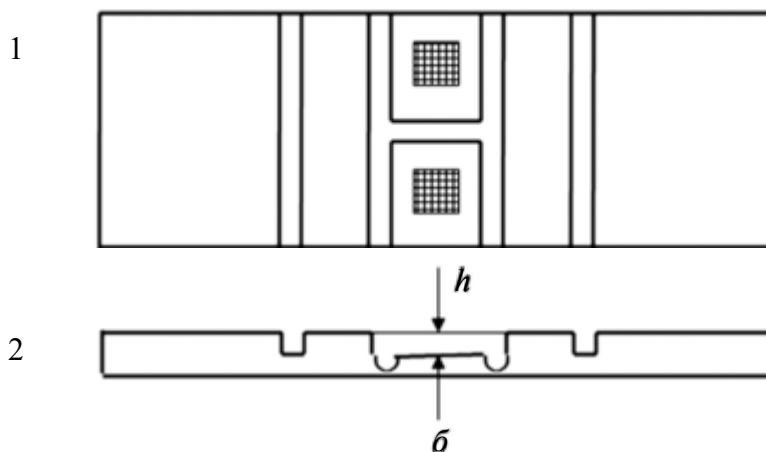


Рис. 2.3. Влаштування 2-х секційної камери Горяєва: 1 – вигляд зверху, 2 – вигляд збоку:  $h$  – глибина камери (0,1 мм),  $б$  – дно камери, на якому нанесена сітка для підрахунку клітин крові

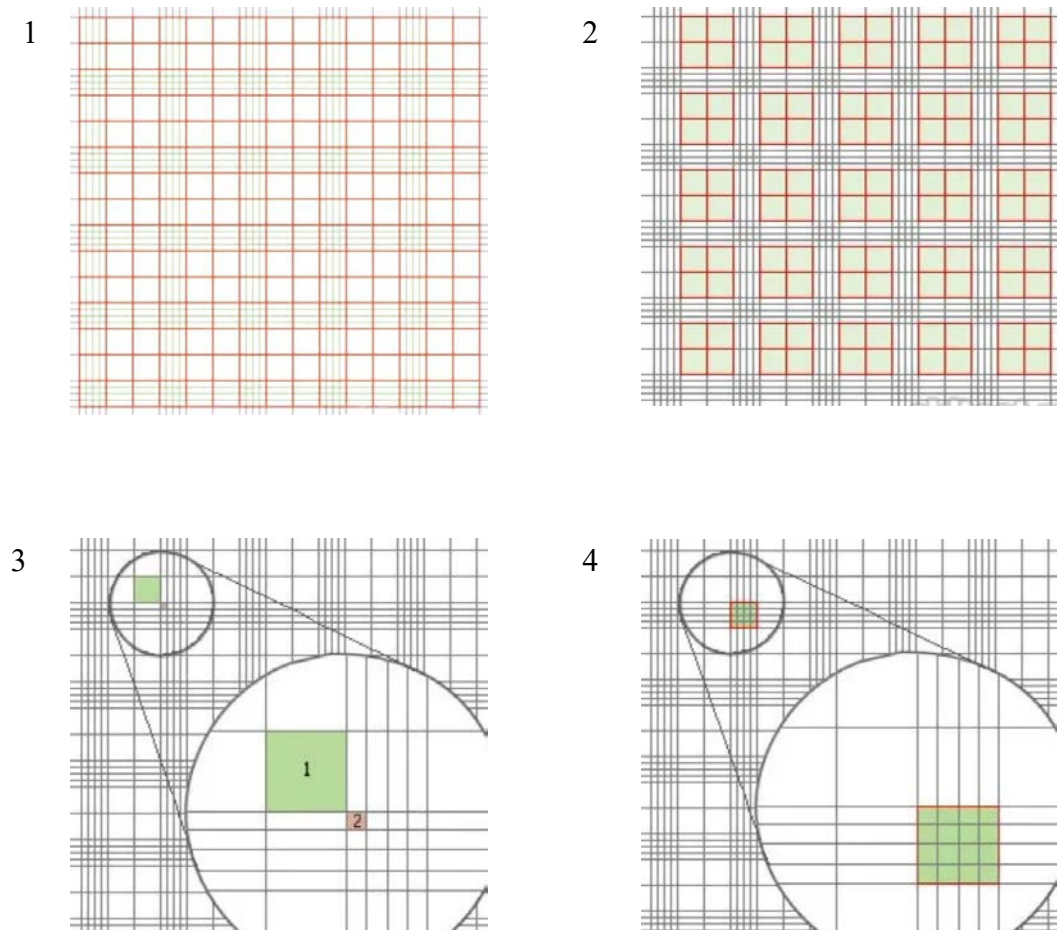


Рис. 2.4. Поділ сітки Горяєва на квадрати: 1 – загальний вигляд сітки, яка складається з 225 великих квадратів; 2 – 100 великих квадратів сітки; 3 – великий (1) і малий (2) квадрати сітки; 4 – великий квадрат сітки, розділений на 16 малих квадратів

**Мета роботи:** ознайомити студентів з будовою камери Горяєва та методикою її підготовки для підрахунку клітин крові у імунологічних дослідженнях; підрахувати в зразках крові кількість еритроцитів та лейкоцитів.

**Обладнання та матеріали:** кров тварин, мікроскопи, камери Горяєва, покривні скельця, піпетки, пробірки, фізіологічний розчин NaCl, 3 %-ий розчин оцтової кислоти, фільтрувальний папір, слайди, інші презентативні матеріали.

### **Хід роботи.**

1. Перед заповненням суспензією крові лічильну камеру і покривне скло ретельно протерти 70 %-им спиртом і висушити.

2. М'якоттю великих пальців покривне скло щільно притиснути до бічних пластин камери і злегка пересувати його вгору і вниз до тих пір, доки не з'являться райдужні смуги («Ньютонові кільця»). Тільки в цьому випадку дотримується належний обсяг камери.

3. Перед заповненням камери суспензією крові у фізіологічному розчині (у випадку підрахунку еритроцитів, розведення 1:200) або 3 %-ому розчині оцтової кислоти (у випадку підрахунку лейкоцитів, розведення 1:20) вміст пробірки кілька разів струсити. Піпеткою набрати невеликий обсяг суспензії крові і випустити 1–2 краплі на фільтрувальний папір.

4. Піднести краплю розведеної крові до краю покривного скла, стежачи за тим, щоб кров рівномірно заповнювала всю поверхню камери з сіткою, не затікаючи в бічні борозенки. Якщо це трапиться, суспензію крові видалити фільтрувальним папером.

5. Заповнену камеру залишити на 1–2 хвилини в горизонтальному положенні для осідання клітин крові.

6. Підрахунок клітин крові провести при малому збільшенні мікроскопа (наприклад об'єктив 8х, окуляр 10х), у дещо затемненому полі зору (при прикритій діафрагмі і опущеному конденсорі).

7. Еритроцити підраховувати у 5 великих квадратах, розташованих по діагоналі сітки, розділених на 16 малих, тобто у 80 малих квадратах.

Для цього під мікроскопом необхідно знайти верхній лівий квадрат сітки (розділений на 16 малих) і підраховувати у ньому кількість еритроцитів. При цьому доцільно дотримуватися певної послідовності підрахунку еритроцитів: у одному ряді пересуватися з одного малого квадрата в інший по горизонталі зліва направо, у іншому ряді – справа наліво і т. д. (рис. 2.5).

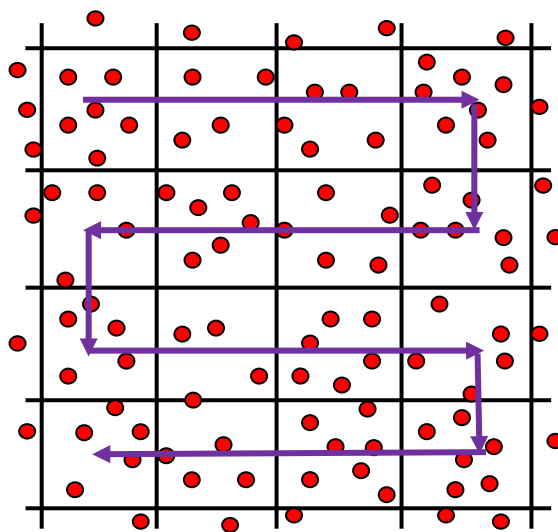


Рис. 2.5. Методика підрахунку еритроцитів у камері Горяєва

У кожному малому квадраті підраховувати еритроцити, що знаходяться всередині нього, а також розташовані, наприклад, на лівій і верхній межі квадрата, пропускаючи еритроцити, що лежать на нижній і правій межі. Це дозволяє добитися того, щоб формені елементи, розташовані на кордоні квадратів, не потрапили в рахунок двічі.

8. Кількість еритроцитів у 1 мкл ( $1 \text{ мм}^3$ ) крові розрахувати за формулою:

$$X = a \times 200 / b \times 80,$$

де  $X$  – кількість еритроцитів в 1 мкл крові,  $a$  – число підрахованих еритроцитів,  $b$  – об'єм малого квадрата ( $2,5 \times 10^{-4}$  мкл), 200 – розведення крові, 80 – кількість малих квадратів, у яких проводився підрахунок.

Увівши в цю формулу значення об'єму одного малого квадрата сітки Горяєва, отримаємо спрощену формулу:

$$X = a \times 200 / 2,5 \times 10^{-4} \times 80 = a \times 200 / 200 \times 10^{-4} = a \times 10^4$$

Таким чином, кількість еритроцитів в 1 мкл крові ( $X$ ) дорівнює числу формених елементів крові, підрахованих у 80 малих квадратах, помноженому на  $10^4$ .

*Приклад: у 5 великих квадратах (80 малих) підраховано 524 еритроцити. У даному випадку кількість еритроцитів у 1 мкл крові становить 5240000 чи  $5,24 \times 10^6$ /мкл, або 5,24 Т/л.*

9. Лейкоцити підраховувати у 100 великих квадратах сітки Горяєва, не розділених на малі квадрати і смуги. Так само, як і при підрахунку еритроцитів, підраховують клітини, розміщені всередині квадрата і на його лівій і верхній межах.

10. Абсолютну кількість лейкоцитів у 1 мкл ( $1 \text{ мм}^3$ ) крові розрахувати за формулою:

$$X = a \times 20 / 100 \times b,$$

де  $X$  – кількість лейкоцитів у 1 мкл крові,  $a$  – число підрахованих лейкоцитів,  $b$  – об'єм великого квадрата ( $4 \times 10^{-3}$  мкл), 20 – розведення крові, 100 – кількість великих квадратів, у яких проводився підрахунок.

Ввівши в цю формулу значення об'єму одного великого квадрата сітки Горяєва, отримаємо спрощену формулу:

$$X = a \times 20 / 100 \times (4 \times 10^{-3}) = a \times 20 / 400 \times 10^{-3} = a \times 50$$

Таким чином, кількість лейкоцитів в 1 мкл ( $X$ ) дорівнює числу формених елементів крові, підрахованих у 100 малих квадратах, помноженому на 50:

*Приклад: у 100 великих квадратах підраховано 125 лейкоцитів. У даному випадку кількість лейкоцитів у 1 мкл крові становить 6250 чи  $6,25 \times 10^3$ /мкл, або 6,25 Г/л.*

11. Результати розрахунків занести до протоколу заняття, проаналізувати отримані дані та зробити висновки. На основі лейкограми та даних про абсолютну кількість лейкоцитів у 1 мкл крові тварин можна визначити абсолютний вміст окремих їх субпопуляцій.



## **Завдання 2. Визначити загальну кількість лейкоцитів у крові тварин**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою підрахунку загальної кількості лейкоцитів у крові тварин.

**Обладнання та матеріали:** стабілізована антикоагулянтами кров тварин, світловий мікроскоп, камера Горяєва, 3 %-ий розчин оцтової кислоти, пластикові чи скляні пробірки, піпетки змінного об'єму.

### **Хід роботи.**

1. Для підрахунку загальної кількості лейкоцитів внести піпеткою 0,02 мл крові в пробірку з 0,38 мл 3 %-ого розчину оцтової кислоти, яка має властивість гемолізувати еритроцити. Таким чином отримують розведення крові в 20 разів (рис. 2.6).

2. Краплею розведеної крові заправити камеру Горяєва та під малим збільшенням мікроскопу підрахувати лейкоцити у 100 великих квадратах.

3. Розрахунок загальної кількості лейкоцитів здійснити за формулою:

$$X = a \times 20/100 \times b,$$

де  $X$  – к-сть лейкоцитів у 1 мкл крові;

$a$  – к-сть підрахованих лейкоцитів;

$b$  – об'єм одного великого квадрату ( $4,0 \times 10^{-3}$  мкл);

20 – розведення крові;

100 – к-сть великих квадратів, в яких проводився підрахунок.

або:

$$a \times 50$$

4. Результати розрахунку занести до протоколу заняття, проаналізувати отримані дані.

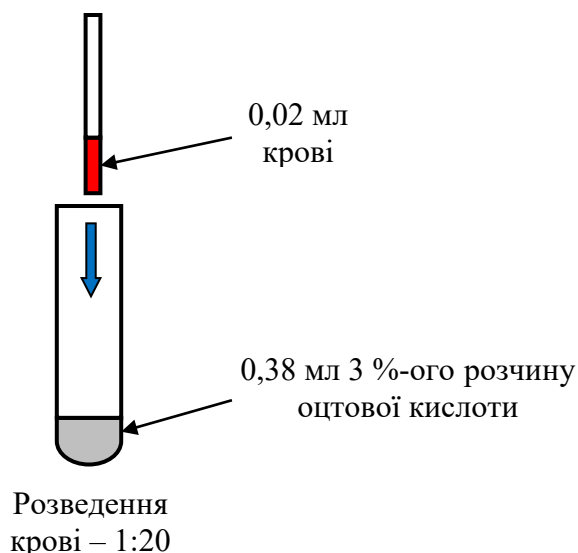


Рис. 2.6. Методика розведення крові для підрахунку лейкоцитів



### **Завдання 3. Приготувати мазки та вивести лейкограму крові тварин**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою приготування мазків крові та виведення лейкограми крові тварин.

**Обладнання та матеріали:** стабілізована антикоагулянтами кров тварин, предметні скельця, шліфоване предметне скло, світловий мікроскоп, імерсійне масло, реактиви для фарбування мазків крові (фарба Мая-Грюнвальда, Романовського-Гімза, Diff-Quick чи інша, залежно від методу фарбування).

**Хід роботи.** Мазки крові роблять на знежирених предметних скельцях.

1. Скляною паличкою нанести краплю крові на предметне скло за 1,0 см від його краю (рис. 2.7 - 1).

2. Перед краплею крові під кутом  $45^\circ$  встановити шліфоване предметне скло зі зрізаними кутами та зробити незначний рух до краплі, щоб кров рівномірно розтікласть по його ребру (рис. 2.7 - 2, - 3).

3. Не натискаючи, провести ребром шліфованого скла по предметному склу, рівномірно розподіляючи по ньому кров (рис. 2.7 - 4).

4. Мазок крові (рис. 2.7 - 5) висушити на повітрі та пофарбувати (рис. 2.7 - 6), після чого промити під проточною водою та знову висушити.

5. Провести дослідження мазків та вивести формулу крові під мікроскопом (імерсійна система, об'єтив  $\times 90$ , окуляр  $\times 7$ ) при розкритій діафрагмі та піднятому конденсорі.

6. Підрахунок лейкоцитів в мазках крові здійснити по зигзагоподібній лінії, не заходячи на самий край та середину. Підрахувати в самому тонкому місці мазка 200 лейкоцитів та шляхом ділення кількості окремих їх видів на два вивести відсоткове співвідношення.

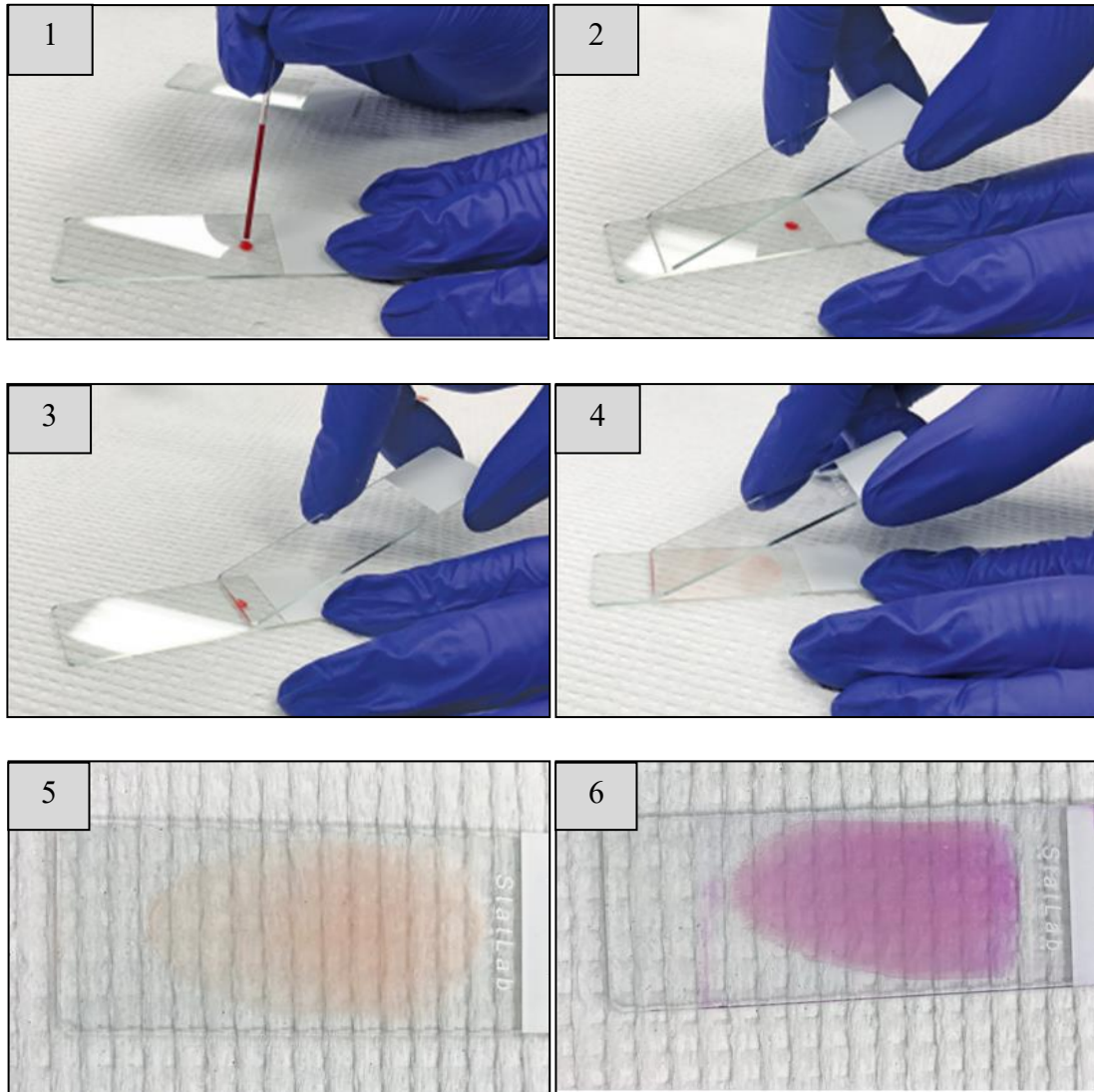


Рис. 2.7. Почерговість етапів приготування мазка крові

7. Результати підрахунку занести до протоколу заняття, проаналізувати отримані дані та зробити висновки.



#### **Завдання 4. Визначити кількість еозинофілів у крові собак**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення кількості еозинофілів у крові собак.

**Обладнання та матеріали:** стабілізована антикоагулянтами кров собак, світловий мікроскоп, камера Горяєва, стерильні пластикові чи скляні пробірки, піпетки, хімічно чистий ацетон, основний розчин: еозин калію – 0,5 г, формалін концентрований (40 %) – 1,5 г, вода дистильована 100 мл (можна зберігати у посудині з темного скла протягом 6 місяців за температури 18 °С), паперовий фільтр.

**Принцип методу.** Метод базується на здатності спеціальної рідини лізувати еритроцити і всі форми лейкоцитів, крім еозинофілів (метод І. С. Піралішвілі). У цій рідині еозинофіли набувають червоного або яскраво-оранжевого кольору.

#### **Хід роботи.**

1. Приготувати робочий розчин лізуючої рідини. Для цього змішують 2 частини хімічно чистого ацетону, 2 частини основного розчину, 6 частин дистильованої води та готовий розчин пропускають через паперовий фільтр (можна зберігати при температурі 2–6 °С протягом 2 тижнів).

2. У чисті і сухі пробірки налити 0,38 мл робочого розчину.

3. Додати по 0,02 мл цільної крові та змішати протягом 2 хв.

4. Краплею розведеної крові заправити камеру Горяєва та під малим збільшенням мікроскопу підрахувати лейкоцити у всіх великих квадратах. Еозинофіли видно як клітини круглої або серповидної форми з блискучими зернами червоного або яскраво-оранжевого кольору всередині. Окремі еозинофіли мають вигляд компактної групи гранул.

5. Розрахунок загальної кількості еозинофілів здійснити за формулою:

$$X = a \times 20/0,9,$$

де X – к-сть еозинофілів у 1 мкл крові;

a – к-сть підрахованих еозинофілів по всій камері Горяєва;

20 – розведення крові;

0,9 – об'єм камери Горяєва, мм<sup>3</sup>.

6. Результати розрахунку занести до протоколу заняття, проаналізувати отримані дані.



## **Завдання 5. Визначити кількість природних клітин-кілерів у крові щурів**

### **Теоретичні положення**

Природні (натуральні) кілери (NK-клітини) – великі гранулярні лімфоцити, які належать до вродженого імунітету тварин, оскільки на їх поверхні відсутні специфічні антигенрозпізнавальні рецептори, та становлять 5–10 % від загальної кількості лімфоцитів крові. Природні кілери походять від кістковомозкових клітин-попередниць Т-лімфоцитів. Після дозрівання вони виходять у кровотік і поступово мігрують у тканини організму.

Основною ефекторною функцією природних кілерів є цитотоксична дія щодо чужорідних клітин, особливо пухлинних, в яких низька експресія молекул ГКГ I класу, а також клітин тканин і органів, що мають інший, ніж у організмі, набір антигенів гістосумісності. Природні кілери, подібно моноцитам і гранулоцитам, можуть розрізняти чужорідні клітини за антигенами, експресованими на їх поверхні, та ініціювати ланцюжок біохімічних реакцій, аналогічний Т-цитотоксичним лімфоцитам, що призводить до лізису і загибелі клітини-мішені. Разом з тим, хоча натуральні кілери мають аналогічні Т-кілерам механізми знешкодження змінених клітин власного організму, проте, на відміну від Т-цитотоксичних лімфоцитів, ці клітини розпізнають антиген без участі молекул головного комплексу гістосумісності. Це стосується і боротьби з вірусною інфекцією. На поверхні натуральних кілерів присутні рецептори до Fc-фрагменту IgM і C3-компоненту комплементу, тобто ті самі, що є на всіх лейкоцитах, здатних здійснювати антитілозалежний та комплементзалежний кілінг і фагоцитоз клітин-мішеней.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення кількості природних (натуральних) клітин-кілерів у крові щурів.

**Обладнання та матеріали:** стабілізована антикоагулянтами кров щурів, предметні скельця, шліфоване предметне скло, світловий мікроскоп, імерсійне масло, реактиви для фарбування мазків крові (фарба Мая-Грюнвальда та Романовського-Гімза).

**Принцип методу.** Природні клітини-кілери мають характерну морфологічну будову та являють собою великі лімфоцити, в цитоплазмі яких при фарбуванні за Паппенгеймом, Романовським-Гімза або за Нохтом виявляються азурофільні гранули.

### **Хід роботи.**

1. Відібрати у тварин кров, зробити мазки та пофарбувати за Паппенгеймом.

2. Висушені на повітрі мазки крові зафіксувати у фарбнику-фіксаторі Май-Грюнвальда протягом 5–7 хвилин, промити водопровідною водою та висушити на повітрі.

3. На висушений мазок крові на 8–15 хвилин (в залежності від температури в приміщенні) налити водний розчин фарби Романовського-Гімза, після чого її змити дистильованою водою, а мазки висушити на повітрі.

4. Провести облік результатів. Для цього під світловим мікроскопом підрахувати 100–200 лейкоцитів та вивести лейкоформулу.

5. При підрахунку лімфоцитів ідентифікувати великі гранулярні лімфоцити (натуральні кілери) (рис. 2.8), які характеризуються більшим розміром у порівнянні з іншими лімфоцитами, округлим або бобовидним ядром, рясною блідо-блакитною цитоплазмою, яка містить у собі три та більше еозинофільних гранули, забарвлених у яскраво-червоний або вишнево-фіолетовий колір.

6. Абсолютну кількість натуральних кілерів у 1 л крові (Г/л) розрахувати із їх відсоткового вмісту і загального числа лейкоцитів.

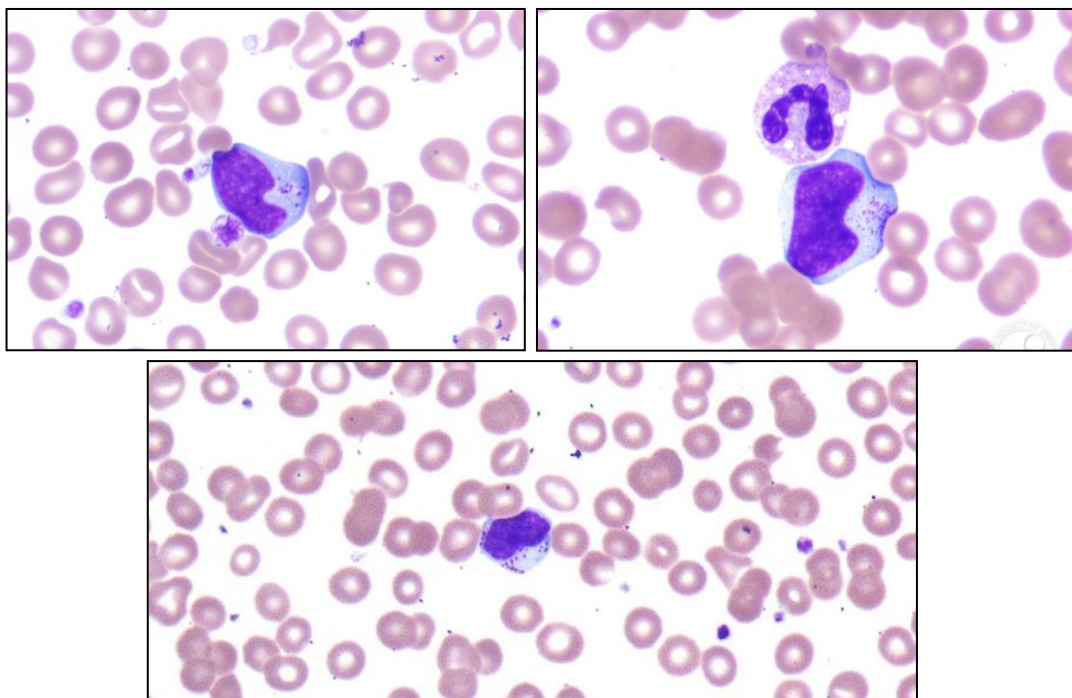


Рис. 2.8. Великі гранулярні лімфоцити (натуральні кілери) у мазку крові щура

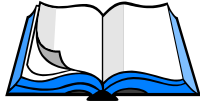
7. Результати розрахунку занести до протоколу заняття, проаналізувати отримані дані.



## Питання для самоконтролю

1. Чому лейкоцити є індикатором різних порушень гомеостазу в організмі?
2. Чим забезпечується активність лейкоцитів при реалізації імунної відповіді?
3. З якою метою проводять визначення активності та інтенсивності фагоцитозу?
4. Яка методика вирахування фагоцитарної активності нейтрофілів і макрофагів?
5. Яка методика вирахування фагоцитарного числа та фагоцитарного індексу?
6. Які можуть бути причини зміни показників функціональної активності нейтрофілів і макрофагів?
7. З якою метою у моделі фагоцитозу нейтрофілами та перитонеальними макрофагами морської свинки еритроцитів півня *in vivo* попередньо виконують внутрішньоочеревинне введення м'ясо-пептонного бульйону?
8. На чому ґрунтується метод визначення активності пероксидази (мієлопероксидази) у нейтрофільних гранулоцитах тварин?
9. Чим пояснюється здатність сироватки крові інтактних тварин вбивати і лізувати грамнегативні бактерії?
10. За рахунок чого пропердин є важливим гуморальним фактором вродженого імунітету?
11. Що являють собою інтерферони?
12. На чому ґрунтується методика визначення бактерицидної активності сироватки крові тварин фотонейлометричним методом?
13. Які причини зниження або підвищення бактерицидної активності сироватки крові тварин?
14. Що являє собою лізоцим? У яких природних секретах спостерігається найбільш висока концентрація лізоциму?
15. Які є механізми антибактеріальної дії лізоциму? В чому вони полягають?
16. У чому суть методики визначення лізоцимної активності сироватки крові тварин?
17. Які причини зниження або підвищення лізоцимної активності сироватки крові тварин?
18. Що являє собою комплемент та яке основне джерело синтезу білків комплексу?
19. Що є в основі методу визначення активності комплексу сироватки крові тварин за 50 % гемолізом?

20. Які причини виникнення гетерофільних аглютининів?
21. Який принцип визначення титру гетерофільних аглютининів у сироватці крові тварин?
22. Які причини зниження титру гетерофільних аглютининів у сироватці крові тварин?
23. Коли спостерігається підвищення титру гетерофільних аглютининів у сироватці крові тварин?
24. З якою метою проводять визначення титру гемолізину у сироватці крові тварин?
25. Про що свідчить зниження або підвищення титру гемолізину у сироватці крові тварин?
26. Що являють собою циркулюючі імунні комплекси?
27. На чому ґрунтується метод визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів у крові тварин?
28. Що являє собою лейкограма? Від чого залежить характер лейкограми?
29. Дайте визначення лейкоцитозу. Які причини виникнення лейкоцитозу?
30. Що таке лейкопенія, які причини її виникнення?
31. Що таке еозинофілія? Коли вона спостерігається?
32. На чому базується метод визначення кількості еозинофілів у крові?
33. Дайте визначення анбазофілії. Ознакою чого є анбазофілія?
34. Дайте визначення збільшенню відносного вмісту нейтрофілів. Коли воно спостерігається?
35. Ознакою яких процесів є нейтропенія?
36. Дайте визначення лабораторним феноменам «зсув ядра нейтрофілів ліворуч» і «зсув ядра нейтрофілів праворуч». Які причини їх появи?
37. Що собою являє лімфоцитоз та які причини його виникнення?
38. Що собою являє моноцитоз та які причини його виникнення?
39. У скільки разів необхідно розбавити кров при підрахунку у ній лейкоцитів? Чому для розбавлення використовують 3 %-ий розчин оцтової кислоти?
40. Які існують етапи приготування мазків крові та виведення лейкограми крові тварин?
41. Опишіть будову камери Горяєва. Що собою являє сітка Горяєва?
42. У скількох великих квадратах сітки Горяєва підраховують лейкоцити?
43. Яка методика підрахунку клітин крові у малих та великих квадратах сітки Горяєва?



### 3. КЛІТИННІ ТА ГУМОРАЛЬНІ ФАКТОРИ АДАПТИВНОГО ІМУНІТЕТУ

#### Теоретичні положення

Набутий (адаптивний) імунітет формується у процесі індивідуального життя тварини після попереднього контакту імунної системи організму з певним антигеном.

Набутий імунітет є специфічним та реалізується за допомогою лімфоцитів. Як і вроджений, неспецифічний імунітет поділяють на гуморальний і клітинний.

Гуморальний специфічний імунітет реалізується В-лімфоцитами і продукованими ними імуноглобулінами (антитілами).

Клітинний специфічний імунітет реалізується за участю Т-лімфоцитів: хелперів, кілерів, регуляторів та інших субпопуляцій. Особливість специфічного імунітету полягає у тому, що Т- і В-лімфоцити забезпечені спеціальними антигенрозпізнавальними рецепторами, за допомогою яких здійснюється процес розпізнавання антигену та диференціювання «свого» від «чужого».

Чужорідні антигени в організмі тварини активізують механізми продукції антитіл та/чи Т-лімфоцитів-кілерів, наділених тонкою специфікою по відношенню до них. По мірі стихання імунної відповіді в організмі тварини залишається специфічна імунологічна пам'ять, існування якої дозволяє імунній системі набагато швидше реагувати при повторному потрапленні в організм вже «знайомого» антигену.

Варто зазначити, що специфічний і неспецифічний імунітет тісно взаємопов'язані та доповнюють один одного. Так, макрофаги та дендритні клітини, які відносяться до неспецифічної ланки імунітету, після фагоцитування та процесингу чужорідного об'єкту, представляють даний антиген Т-лімфоцитам-хелперам – ініціаторам імунних реакцій специфічної ланки імунного захисту. Комплемент – інший представник неспецифічної ланки імунітету, активується та утворює при появі у біологічних рідинах організму специфічного комплексу антиген-антитіло мембранно-атакуючий комплекс, який є руйнівним фактором по відношенню до чужорідного агенту.

Всі реакції адаптивного імунітету умовно називають другим етапом глибоко ешелонованого захисту організму від чужорідних антигенів. Ці реакції сформувалися у процесі еволюції. Тому імунітет вцілому, як і кожна з його ланок окремо, вирішують три основних завдання: розпізнавання чужорідних об'єктів, що потрапили в макроорганізм, їх знешкодження та видалення з організму. Ці завдання по-різному вирішуються специфічним та неспецифічним імунітетом, але особливо ефективно – при їх взаємодії.



## **Заняття 5. ДОСЛІДЖЕННЯ Т- ТА В-КЛІТИННОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ**

### **Теоретичні положення**

Лімфоцити – клітини крові, які забезпечують захист організму від чужорідних антигенів. Вони належать до популяції імунокомпетентних клітин, які визначають високу специфічність відповіді імунної системи на чужорідний антиген. Розрізняють два основних типи лімфоцитів. Вони мають різний гістогенез і наділені відповідними кінцевими ефекторними функціями: Т-лімфоцити – забезпечують специфічний клітинний імунітет, В-лімфоцити – відповідальні за антитілоутворення (специфічний гуморальний імунітет).

В крові циркулюють в основному зрілі лімфоцити, диференційовані на субпопуляції: Т-хелпери (помічники), Т-супресри (регулятори), Т-кілери та ін., а також В-лімфоцити (попередники плазматичних клітин). Виконуючи цілий ряд ефекторних функцій, вони у відповідь на антигенне подразнення здатні, осідаючи у лімфоїдній тканині, активно проліферувати і диференціюватися у кінцеві ефекторні клітини (у плазматичні клітини з В-лімфоцитів і цитотоксичні – з Т-лімфоцитів). Це дає можливість збільшити клони специфічно реагуючих клітин на відповідний антиген у кілька разів проти кількості, що була в організмі до його надходження, що визначає потужну специфічну відповідь імунної системи організму. Всі кінцеві клітини-ефектори мають короткий життєвий цикл.

Варто зазначити, характер імунної відповіді організму на дію будь-якого антигену залежить не тільки від властивостей антигена, а й від стану організму, його імунної системи, і проявляється у вигляді різноманітних імунних реакцій, оцінка яких має важливе діагностичне та прогностичне значення.

Залежно від виду тварин відсотковий вміст лімфоцитів у крові та відсоткове співвідношення їх популяцій різний (табл. 3.1). Зокрема, підвищення вмісту Т-лімфоцитів спостерігається при лімфопроліферативних захворюваннях, реакціях гіперчутливості сповільненого типу тощо.

Недостатність Т-клітинної ланки імунітету відмічають при рецидивуючих вірусних, грибкових інфекціях, протозойних захворюваннях, гельмінтозах, бактеріальних хронічних інфекціях, важких ускладненнях після вакцинації атенуйованими вакцинами, туберкульозі, імунодефіцитах, опіках, крововиливах тощо.

Підвищення вмісту Т-хелперів спостерігається при алергіях, автоімунних захворюваннях, гострих інфекціях.

Зниження вмісту Т-хелперів супроводжує імунодефіцитні стани, важко протікаючі гострі інфекції.

При використанні показника співвідношення Т-хелперів до Т-супресорів слід пам'ятати, що при всій своїй практичній значущості він не відображає справжнього співвідношення хелперного та супресорного ефекту в організмі, оскільки в цей ефект вносять вклад подібні регуляторні субпопуляції інших популяцій імунокомпетентних клітин.

Таблиця 3.1. Відносна кількість Т-лімфоцитів у крові тварин, %

Показник	Вид тварин					
	ВРХ	вівці	свині	коні	собаки	коти
Зрілі Т-лімфоцити	45–43	56–64	45–57	38–66	46–72	31–89
Т-хелпери	8–31	8–22	23–43	54–56	27–33	19–49
Т-супресори	10–30	4–22	17–39	20–37	17–18	6–39
Т-хелпери / Т-супресори	1,53	1,55	1,40	1,75	1,7	1,9

Підвищення співвідношення Т-хелперів до Т-супресорів відзначається в гострій фазі різних запальних захворювань. Воно характерне практично для всіх аутоімунних захворювань.

Зниження співвідношення Т-хелперів до Т-супресорів спостерігається при важко перебігаючих септичних процесах, запальних та інфекційних захворюваннях, при пухлинах, імунодефіцитних станах.

Підвищення відносного вмісту В-лімфоцитів у крові тварин спостерігається при імунній відповіді на вірусний, бактеріальний чи інший антиген, у другій половині нормально протікаючого запального процесу, тиреотоксикозі, лімфопроліферативних захворюваннях системи крові тощо.

Недостатність В-клітинної ланки імунітету супроводжує рецидивуючі та важко протікаючі вірусні та бактеріальні інфекції, імунодефіцитні стани.



### **Завдання 1. Визначити інтенсивність реакції гіперчутливості сповільненого типу після повторного введення антигену**

#### **Теоретичні положення**

Ця реакція є моделлю для визначення спроможності сенсibiliзованих певним досліджуваним корпускулярним антигеном Т-лімфоцитів виділяти лімфокіни (зокрема фактора, який стимулює міграцію макрофагів) і тестування функції макрофагів, як ефektorів клітинного імунітету. Інтенсивність реакції гіперчутливості повільного типу визначають за величиною набряку у місці повторного введення антигену. Дана реакція може бути використана для оцінки синтезу лімфоцитами лімфокінів при застосуванні імунобіологічних препаратів.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення реакції гіперчутливості сповільненого типу.

**Обладнання та матеріали:** дослідні миші, щурі, фізіологічний розчин натрію хлориду, еритроцити барана, мікрометр.

**Принцип методу.** При внутрішньоочеревинному введенні еритроцитів (антигену) вони захоплюються перитонеальними макрофагами, процесуються та презентуються для Т-лімфоцитів. Останні мігрують у периферійні органи імуногенезу, проліферують та розселяються по організму. При повторному введенні еритроцитів сенсibilізованій тварині, клони новоутворених Т-лімфоцитів із специфічними антигенрозпізнавальними рецепторами мігрують у місце зосередження антигену та продукують лімфокіни, залучаючи до імунної відповіді також інші імункомпетентні клітини. Активність залучення Т-лімфоцитами інших імункомпетентних клітин відобразиться на товщині лапи, у яку вводили антиген (еритроцити).

#### **Хід роботи.**

1. Сенсibilізувати експериментальних тварин одноразовим внутрішньоочеревинним введенням еритроцитів барана. Доза еритроцитів барана мишам –  $10^6$ , щурам –  $10^7$  у 0,5 мл фізіологічного розчину натрію хлориду.

2. Через 10–14 діб після сенсibilізації тваринам в підшову задньої лівої лапи (дослідної) ввести  $10^8$  еритроцитів барана у 0,02–0,05 мл фізіологічного розчину (завершальна ін'єкція), а в праву (контрольну) лапу ввести фізіологічний розчин натрію хлориду в такому ж об'ємі.

3. Оцінку реакції провести через 24 або 48 годин. Визначити величину набряку, вимірявши товщину лап за допомогою мікрометра та вирахувати різницю мас дослідної (Д) і контрольної (К) лап. Для цього після евтаназії тварин необхідно відрізати обидві лапи вище п'яткового суглоба.

4. Індекс реакції (ІР) обчислити для кожної тварини за формулою:

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

Контрольні групи:

- тварини, які отримували тільки еритроцити барана;
- інтактні тварини, які не були імунізовані, але отримали завершальну дозу еритроцитарного антигену.

5. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки про причини збільшення товщини лапи, у яку вводили еритроцити.

**Інтерпретація.** Чим вищий індекс реакції, тим є більшої інтенсивності реакція гіперчутливості повільного типу.



## **Завдання 2. Визначити кількість Т-лімфоцитів у крові щурів методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана за методикою, запропонованою Jondal M. et al.**

### **Теоретичні положення**

Т-лімфоцити – один із найбільш інформативних показників імунограми. Насамперед це пов'язано з тим, що вміст у крові Т-клітин дуже лабільний, оскільки останні досить чутливо реагують на зміну стану імунної системи тварини. Реакція Т-клітин на запальний процес, обумовлена їх інтенсивною міграцією в патологічне вогнище, є більш постійною і часто більш вираженішою, ніж реакція таких високоінформативних показників, як загальна кількість лейкоцитів, еозинофілів, нейтрофілів і зсув їх ядер вліво. Визначення кількості Т-лімфоцитів у крові тварин має велике практичне значення, особливо для оцінки перебігу запального процесу на всіх його етапах, допомагаючи у прогнозуванні виникнення ускладнень, оцінці якості лікування та завершеності процесу.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення кількості Т-лімфоцитів у крові щурів методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана.

**Обладнання та матеріали:** 1 %-ва суспензія еритроців барана, середовище 199, стабілізована одним із антикоагулянтів кров досліджуваних щурів, суспензія лімфоцитів крові щурів на середовищі 199 ( $2 \times 10^6$  клітин у 1 мл), центрифужні пробірки, центрифуга, світловий мікроскоп, імерсійне масло, 3 %-ий розчин оцтової кислоти, предметні скельця, шліфоване предметне скельце, реактиви для фарбування мазків крові, холодильник, камера Горяєва, піпетки, термостат.

**Принцип методу.** Метод визначення кількості Т-лімфоцитів обумовлений взаємодією мембранних рецепторів лімфоцитів з індикаторними клітинами (найчастіше з еритроцитами барана). За кількістю еритроцитів, приєднаних одним лімфоцитом, визначають ступінь активності Т-клітин, оскільки феномен розеткоутворення обумовлений густиною рецепторів на їх поверхні.

### **Хід роботи.**

1. Внести у центрифужні пробірки по 0,1 мл 1 %-ої суспензії еритроцитів барана і 0,1 мл суспензії лімфоцитів крові досліджуваних щурів та перемішати.
2. Інкубувати у термостаті 10 хв за температури 37 °С.
3. Відцентрифугувати протягом 1–2 хв за відцентрової сили 300 g.

4. Помістити пробірки з клітинами на 2 години у холодильник за температури 37 °С (допустима інкубація до 20 год).

5. Клітини обережно ресуспендувати (шляхом прокручування пробірки між долонями), заправити камеру Горяєва, дати відстоятися 1 хв (щоб розетки осіли на дно камери) та визначити відсоток розеткоутворюючих клітин (лімфоцитів). Розеткоутворюючою клітиною вважають лімфоцит, який прикріпив три і більше еритроцити (рис. 3.1). Кількість розеткоутворюючих клітин приблизно відповідає кількості зрілих Т-лімфоцитів.

6. Підрахувати загальну кількість лейкоцитів у крові щурів з допомогою камери Горяєва.

7. Зробити мазок крові та визначити відсотковий вміст лімфоцитів.

8. Вирахувати абсолютну кількість зрілих Т-лімфоцитів, виходячи з кількості лейкоцитів у периферійній крові і відсоткового вмісту лімфоцитів у мазку.

9. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

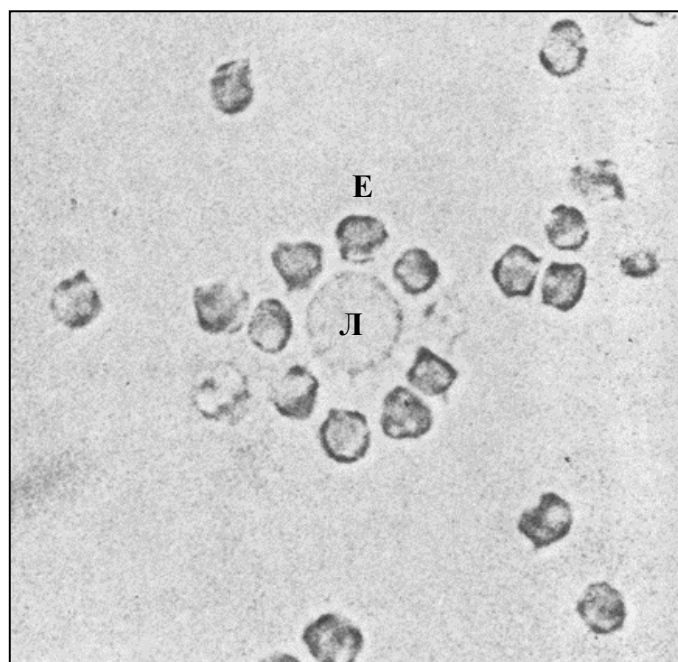


Рис. 3.1. Розеткоутворюючий лімфоцит (Л), який прикріпив вісім еритроцитів (Е)

**Інтерпретація.** Кількість Т-лімфоцитів у крові є дуже лабільним показником, схильним до суттєвих змін залежно від фізіологічного стану організму, обумовленого фізичним та емоційним навантаженням, прийомом корму, біоритмами, гормональним циклом, а також цілим рядом стресових станів організму (психоемоційний стрес, гостра травма, кровотеча, опіки тощо).



### **Завдання 3. Визначити кількість теофілінчутливих та теофілінрезистентних Т-лімфоцитів у крові щурів методом розеткоутворення з еритроцитами барана**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення кількості теофілінчутливих та теофілінрезистентних Т-лімфоцитів у крові щурів методом розеткоутворення з еритроцитами барана.

**Обладнання та матеріали:** 1 %-ва суспензія еритроців барана, середовище 199, суспензія лімфоцитів крові досліджуваних щурів на середовищі 199 ( $2 \times 10^6$  клітин у 1 мл), 0,01 М розчин теофіліну (18 мг теофіліну розчиняють у 10 мл середовища 199 до повного розчинення кристалів), світловий мікроскоп, центрифужні пробірки, центрифуга, холодильник, камера Горяєва, піпетки, термостат.

**Принцип методу.** Встановлено, що частина Т-лімфоцитів має на своїй поверхні рецептори до теофіліну, які блокуються цією речовиною, у зв'язку з чим втрачають здатність до розеткоутворення. Більша частина таких теофілінчутливих лімфоцитів належить до Т-супресорів. Інша частина Т-лімфоцитів, яка не має рецепторів до теофіліну, приймає участь у реакції розеткоутворення з еритроцитами барана. Більша частина таких теофілінрезистентних лімфоцитів при імунній відповіді виконує функцію Т-лімфоцитів-хелперів.

#### **Хід роботи.**

1. У центрифужні пробірки до 0,1 мл суспензії лімфоцитів крові досліджуваних щурів додати 0,1 мл 0,01 М розчину теофіліну та інкубувати у термостаті 1 годину при  $t 37^{\circ}\text{C}$ .

2. Внести у пробірки з 0,1 мл суспензії лімфоцитів, інкубованих з теофіліном, 0,1 мл 1 %-ої суспензії еритроцитів барана та перемішати.

3. Інкубувати у термостаті протягом 10 хв за температури  $37^{\circ}\text{C}$ .

4. Відцентрифугувати впродовж 1–2 хв за відцентрової сили 300 g.

5. Помістити пробірки з клітинами на 2 години у холодильник при  $t 37^{\circ}\text{C}$  (допустима інкубація до 20 год).

6. Клітини обережно ресуспендувати (шляхом прокручування пробірки між долонями), заправити камеру Горяєва, дати відстоятися 1 хв (щоб розетки сіли на дно камери) та визначити відсоток розеткоутворюючих клітин (лімфоцитів), які відповідають теофілінрезистентним Т-лімфоцитам. Розеткоутворюючою клітиною вважають лімфоцит, який прикріпив три і більше лімфоцити. Кількість розеткоутворюючих клітин приблизно відповідає кількості зрілих Т-лімфоцитів.

7. Від загальної кількості Т-лімфоцитів (див. Завдання 2 даного заняття) вирахувати теофілінрезистентні Т-лімфоцити та визначити вміст

теофілінчутливих Т-лімфоцитів. У нормі співвідношення теофілінрезистентних та теофілінчутливих Т-лімфоцитів становить 2:1.

8. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки, порівнюючи чи відповідає співвідношення теофілінрезистентних до теофілінчутливих Т-лімфоцитів нормі.

**Інтерпретація.** Визначення абсолютної і відносної кількості Т-лімфоцитів-хелперів рекомендується проводити з метою контролю показників клітинної ланки імунної системи у поступовій динаміці після комплексного імунологічного обстеження та протягом лікування тварини.

Кількість Т-лімфоцитів-хелперів зростає при активації імунітету (рання стадія запального процесу, гострі та хронічні лімфолейкози, тимома та ін.), зниження спостерігається при недостатності його клітинної ланки (вроджені і набуті імунодефіцити, важкопротікаючі грибкові та бактеріальні інфекції).



**Завдання 4. Визначити кількість «активних» Т-лімфоцитів у крові щурів методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана за методикою, запропонованою Kerman R. et al.**

**Теоретичні положення**

Як відомо, популяція Т-лімфоцитів складається з різних за своєю функціональною активністю клітин. Тест «активного» розеткоутворення базується на спонтанному приєднанні еритроцитів барана до лімфоцитів; тим самим він дозволяє виявити Т-лімфоцити, які мають рецептори високого афінітету, що дозволяє їм активно приєднувати еритроцити барана без додаткової інкубації.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення кількості «активних» Т-лімфоцитів у крові щурів методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана.

**Обладнання та матеріали:** 1 %-ва суспензія еритроців барана, середовище 199, суспензія лімфоцитів крові досліджуваних щурів на середовищі 199 ( $2 \times 10^6$  клітин у 1 мл), світловий мікроскоп, центрифужні пробірки, центрифуга, камера Горяєва, піпетки.

**Хід роботи.**

1. Внести у центрифужні пробірки по 0,1 мл 1 %-ої суспензії еритроцитів барана і 0,1 мл суспензії лімфоцитів крові щурів та перемішати.
2. Відцентрифугувати протягом 1–2 хв за відцентрової сили 300 g.

3. Клітини обережно ресуспензувати (шляхом прокручування пробірки між долонями), заправити камеру Горяєва, дати відстоятися 1 хв (щоб розетки сіли на дно камери) та визначити відсоток «активних» розеткоутворюючих клітин (лімфоцитів). Розеткоутворюючою клітиною вважають лімфоцит, який прикріпив три і більше лімфоцити.

4. Результати визначення занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** Чим нижча кількість «активних» Т-лімфоцитів у крові тварин – тим слабший у неї імунітет, і навпаки, чим більша кількість таких Т-лімфоцитів – тим, потенційно, він сильніший.



### **Завдання 5. Визначити кількість В-лімфоцитів у крові щурів за методикою, запропонованою Bianco C. et al.**

#### **Теоретичні положення**

В-лімфоцити, що виявляються в периферійній крові, являють собою суміш зрілих клітин, що виходять у кров з кісткового мозку і поступово осідають в лімфовузлах та інших вторинних утвореннях лімфоїдної тканини, та рециркулюючих В-лімфоцитів імунної пам'яті до різних антигенів, що утворюються у вторинній лімфоїдній тканині і мігрують до інших лімфоїдних утворень. Викид клітин обох типів у кровотік збільшується у разі їх активної проліферації у відповідь на антигенний стимул. Це викликає збільшення їх кількості у крові на деяких етапах запального процесу. Клінічна цінність вмісту в крові В-лімфоцитів, як окремого показника, невелика у зв'язку з уповільненою, недостатньо сильною та непостійною їх реакцією на розвиток патологічного процесу. Однак у складі імунограми значення показника вмісту В-лімфоцитів у крові тварин зростає.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення кількості В-лімфоцитів у крові щурів методом розеткоутворення з еритроцитами барана, обробленими антитілами і комплементом.

**Обладнання та матеріали:** 5 %-ва суспензія еритроців барана, гемолітична сироватка, комплементвмісна сироватка білої миші, фізіологічний розчин, середовище 199, суспензія лімфоцитів крові досліджуваних щурів на середовищі 199 ( $2 \times 10^6$  клітин у 1 мл), світловий мікроскоп, центрифужні пробірки, центрифуга, холодильник, камера Горяєва, піпетки, термостат.

**Принцип методу.** В-лімфоцити мають на своїй поверхні рецептори до С3-компонента комплементу, проте не мають рецепторів до еритроцитів барана чи бика, тому безпосередня взаємодія таких еритроцитів з В-лімфоцитами

неможлива. Для того, щоб відбулося приєднання еритроцитів до В-лімфоцитів, необхідне посередництво комплекменту та антиеритроцитарних антитіл. З цією метою еритроцити обробляють гемолітичною сироваткою, яка містить антиеритроцитарні антитіла. Утворюється комплекс антиген-антитіло, з яким і зв'язується комплемент. Оскільки рецептори до С3-компоненту комплекменту мають усі В-лімфоцити, то за розеткоутворенням (за кількістю лімфоцитів, які приєднали три і більше комплексів «еритроцит-антитіло-комплемент»), можна визначити кількість В-лімфоцитів.

### **Хід роботи.**

1. Приготувати гемолітичну сироватку у субаглютинуючому титрі (розведення вдвічі більше за робочий титр сироватки). Якщо робочий титр сироватки 1:1000, то її потрібно розбавити 1:2000. Для цього до 0,1 мл сироватки з робочим титром додають 9,9 мл фізіологічного розчину. Із отриманого розведення (1:100) сироватки беруть 0,1 мл і додають 1,9 мл фізіологічного розчину і отримують 2 мл сироватки у розведенні 1:2000.

2. Приготувати робоче розведення комплекменту: у ампулу з сухим комплекментом внести 1 мл фізіологічного розчину та перенесети 0,05 мл отриманої суспензії у пробірку з 5,95 мл фізіологічного розчину.

Можна використати комплекментвмісну сироватку. Для її отримання у пробірку, змочену фізіологічним розчином, взяти 0,5–0,8 мл крові від білої миші. Після утворення згустку кров відцентрифугувати протягом 15 хв при 300 g для отримання сироватки. Відібрати 0,2 мл сироватки і розвести її у 1,8 мл фізіологічного розчину.

3. Приготувати комплекс антиген-антитіло. Для приготування комплексу антиген-антитіло до 2 мл 5 %-вої суспензії еритроцитів барана додати 2 мл гемолітичної сироватки у субаглютинуючому титрі. Суміш інкубувати у термостаті протягом 30 хв при температурі 37 °С. Після інкубації суміш двічі відмити фізіологічним розчином, центрифугуючи по 10 хв при відцентровій силі 300 g. Після другого центрифугування надосадову рідину видалити, а до осаду додати 2 мл фізіологічного розчину. Еритроцити ретельно ресуспензувати.

4. Приготувати комплекс антиген-антитіло-комплемент. Для приготування комплексу антиген-антитіло-комплемент до 2 мл суспензії еритроцитів барана, з'єднаних з антитілами, додати 0,1 мл комплекменту в робочому розведенні або 2 мл комплекментвмісної сироватки. Суміш інкубувати у термостаті протягом 30 хв за температури 37 °С.

Після інкубації суміш двічі відмити фізіологічним розчином, центрифугуючи по 10 хв за відцентрової сили 300 g. Після другого центрифугування надосадову рідину видалити, а до осаду додати 9,9 мл середовища 199, отримавши таким чином 1 %-ву суспензію еритроцитів, з'єднаних з антитілами та комплекментом.

5. Внести у центрифужні пробірки по 0,1 мл 1 %-ої суспензії еритроцитів барана, з'єднаних з антитілами та комплементом, і 0,1 мл суспензії лімфоцитів крові щурів та перемішати.

6. Відцентрифугувати протягом 1–2 хв за відцентрової сили 300 g.

7. Пробірки помістити у термостат та інкубувати протягом 30 хв за температури 37 °С.

8. Клітини обережно ресуспензувати (шляхом прокручування пробірки між долонями), заправити камеру Горяєва, дати відстоятися 1 хв (щоб розетки сіли на дно камери) та визначити відсоток розеткоутворюючих клітин (лімфоцитів). Розеткоутворюючою клітиною вважають лімфоцит, який прикріпив три і більше лімфоцити.

9. Результати визначення занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.



### **Завдання 6. Визначити інтенсивність реакції бласттрансформації лімфоцитів під впливом Т- та В-клітинних мітогенів**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методикою визначення інтенсивності реакції бласттрансформації лімфоцитів під впливом Т- та В-клітинних мітогенів.

**Обладнання та матеріали:** гепаринізована кров щурів, середовище Ігла або 199, сироватка великої рогатої худоби або ембріональна сироватка теляти, мітоген (фітогемаглютинін), пеніцилін, стрептоміцин, штативи, предметні скельця, шліфоване предметне скло, фарба Романовського, дистильована вода, світловий мікроскоп, імерсійне масло, пробірки, піпетки, термостат або CO<sub>2</sub>-інкубатор.

**Принцип методу.** При індукції імунної відповіді на антигенні стимули лімфоцити відповідають бласттрансформацією та зумовлюють розвиток специфічного імунітету клітинного чи гуморального типу. Реакція бласттрансформації заснована на феномені активації лімфоцитів під впливом стимулів (мітогенів або антигенів) з подальшою трансформацією їх у бласти (великі проліферуючі клітини). Ця реакція визначає проліферативний потенціал досліджуваних клітин.

#### **Хід роботи.**

1. Приготувати 10 мл стерильного культурального середовища, яке містить 80 % середовища Ігла або 199, 20 % сироватки, 200 ОД/мл пеніциліну і 100 ОД/мл стрептоміцину.

2. Розділити середовище на 2 рівні частини. До одної з них додати мітоген з розрахунку 20 мкг мітогену на 1 мл середовища), другу залишити для контролю.

3. В стерильні дослідні пробірки асептично розлити по 0,5 мл гепаринізованої крові та 4,5 мл середовища Ігла або 199 з мітогеном, в контрольні – по 0,5 мл гепаринізованої крові та 4,5 мл середовища Ігла або 199 без мітогену.

4. Вміст пробірок перемішати та помістити на 72–120 годин у термостат чи CO<sub>2</sub>-інкубатор з 5 %-им вмістом вуглекислого газу за t 37 °С.

5. Через 72–120 годин пробірки відцентрифугувати протягом 15 хв за відцентрової сили 300 g.

6. Видалити надосадову рідину, а осад перенести на предметне скло та зробити мазок. Висушити мазки на повітрі та пофарбувати (1 частину фарби Романовського змішують з 10 частинами дистильованої води) за Романовським протягом 40 хвилин. Після фарбування мазки промити проточною водою.

7. Провести мікроскопію мазків під імерсійним об'єктивом. Підрахувати у мазку не менше 300–500 лімфоїдних клітин. Визначити відсоток бластних лімфоцитів (рис. 3.2.) та перехідних до них форм (клітини діаметром 8–14 мкм), враховуючи також кількість мітозів.

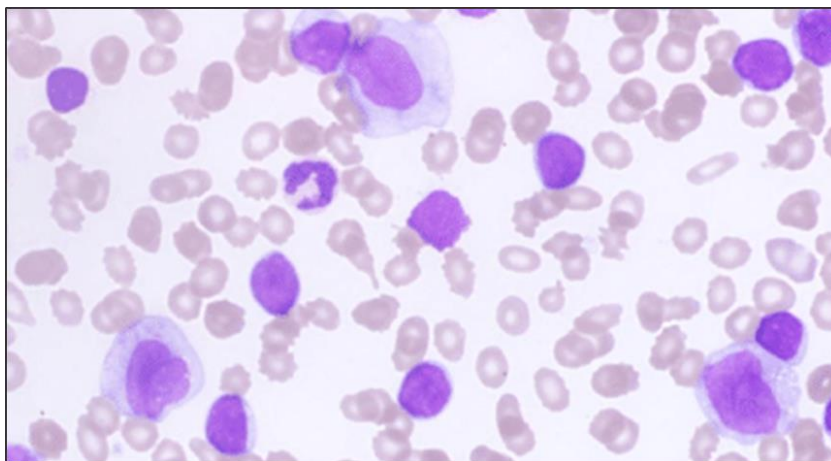


Рис. 3.2. Бластні форми лімфоцитів у мазку крові ВРХ

8. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Дати оцінку реакції та зробити висновки. У пробах без мітогену відсоток бластоутворення не повинен перевищувати 5 %.

**Інтерпретація.** Показник бласттрансформації лімфоцитів крові після стимуляції мітогеном у щурів у нормі становить 17–20 %, ВРХ – 41–59 %, свиней – 39–47 %, морської свинки – 58–62 %. Він може знижуватися при лікуванні цитостатиками, імунодепресантами, імунодефіцитних станах тощо, підвищуватися – при мієлопроліферативних процесах. Низький показник бласттрансформації лімфоцитів може корелювати з дефіцитом в периферійній крові тварин Т-клітин або із зміною показника співвідношення Т-хелперів до Т-супресорів на користь останніх. В деяких випадках (наприклад, в період

відновлення після інтенсивної хіміотерапії) низька відповідь лімфоцитів на мітогени може бути пов'язана з викидом в периферичну кров великої кількості незрілих клітин або бути обумовлена порушенням продукції таких лімфокінів, як ІЛ-1 і ІЛ -2.

Спонтанна проліферація лімфоцитів (бласттрансформація) буває підвищена у тварин, що перенесли багатократні переливання крові, хворих алергічними і аутоімунними захворюваннями, при бактерійних і вірусних інфекціях, а також у новонароджених.



## Заняття 6. АНАЛІЗ КРОВІ ТВАРИН НА ВМІСТ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

### Теоретичні положення

Білковий склад плазми крові, їх кількісний та якісний вміст відображають не лише стан білкового обміну в цілому організмі, а й характеризують функціональний стан неспецифічної реактивності організму, оскільки білки є носіями вродженого та набутого імунітетів.

За допомогою електрофорезу плазми крові виділяють дві основні фракції білків: альбуміни та глобуліни (рис. 3.3).

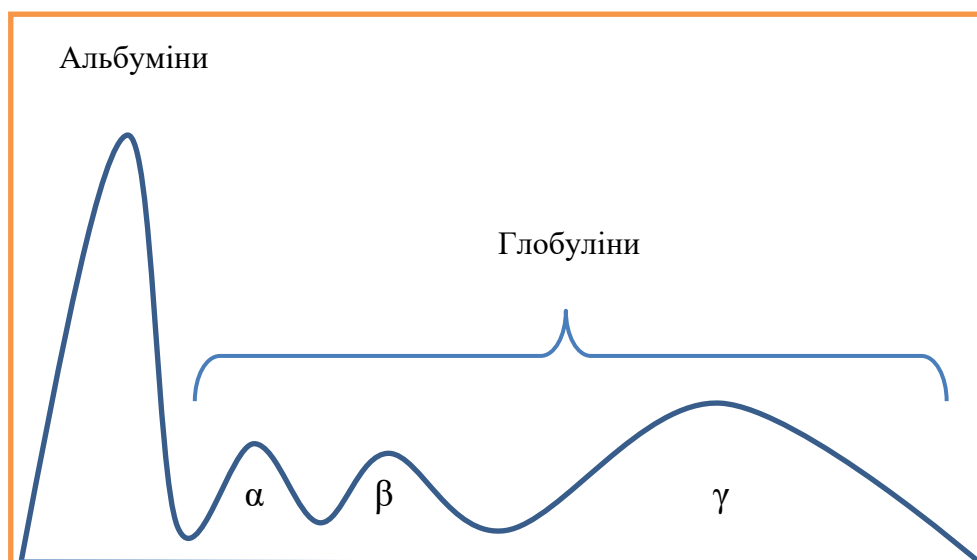


Рис. 3.3. Схематична діаграма фракціонування білків плазми крові тварин

Основна маса білків плазми крові синтезується в печінці – це альбуміни,  $\alpha$ -глобуліни, частина  $\beta$ -глобулінів, фібриноген, компоненти системи згортання крові (II, V, VII, IX, X, XI фактори). У клітинах імунної системи синтезується більша частина  $\beta$ - та  $\gamma$ -глобулінів.

Загальна кількість білків плазми у тварин становить 65–80 г/л. Зменшення (гіпопротеїнемія) або збільшення (гіперпротеїнемія) загального білка плазми та окремих білкових фракцій можуть бути зумовлені багатьма причинами. Ці зміни не є специфічними, але відображають загальну характеристику патологічного процесу (запалення, некроз, новоутворення), динаміку та ступінь тяжкості захворювання. Тому визначення концентрації загального білка та окремих фракцій має велике клініко-діагностичне значення.

Важливе значення також має визначення альбумін-глобулінового коефіцієнта (А/Г коефіцієнт, або білковий коефіцієнт). У нормі співвідношення кількості альбумінів до кількості глобулінів становить 1,2/2,0. Зменшення цього значення можливе як за рахунок збільшення концентрації альбумінів, так і в разі підвищення кількості глобулінів крові. Так, наприклад, це може бути результатом пригнічення синтезу альбумінів у печінці або втрати білка із сечею, а також у разі підвищення синтезу  $\gamma$ -глобулінів у відповідь на інфекцію.

Альбуміни (50–65 % від вмісту загального білка) є однорідною фракцією білків, становлять більшу половину від усієї кількості білка плазми крові, забезпечують підтримання її онкотичного тиску, а завдяки здатності до комплексоутворення – виконують транспортну функцію: за їх участю здійснюється перенесення жирних кислот, ліпідів, білірубіну, амінокислот, іонів металів, іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , стероїдних гормонів та інших речовин.

Глобуліни являють собою гетерогенну фракцію білків крові, що виконують не лише транспортні функції, а й захисні. Виділяють п'ять фракцій глобулінів:  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- та  $\gamma$ -глобуліни. Нормальне значення концентрації глобулінів у сироватці крові тварин – 20–30 г/л. Гаммаглобуліни, на відміну від інших глобулінів, мають у своїй структурі активні центри. Саме специфічним білкам гаммаглобулінової фракції крові – антитілам або імуноглобулінам, які утворюються в організмі тварин під впливом антигену і мають властивість специфічно з ним зв'язуватися, належить важлива роль у процесі формування адаптивного імунітету тварин. Біосинтез антитіл відбувається у плазматичних клітинах, які походять із В-лімфоцитів.

До складу кожної фракції глобулінів входять наступні основні білки:  $\alpha$ -1 глобуліни –  $\alpha$ -1-антитрипсин,  $\alpha$ -1-ліпопротеїн,  $\alpha$ -1-глікопротеїн  $\alpha$ -1-антихімотрипсин;  $\alpha$ -2 глобуліни – гаптоглобін, церулоплазмін,  $\alpha$ -2-макроглобулін;  $\beta$ -глобуліни – трансферин, гемопексин,  $\beta$ -ліпопротеїн, С3-компонент комплементу;  $\gamma$ -глобуліни – IgG, IGA, IgM, IgD, IgE.



## **Завдання 1. Визначити загальну кількість білка у сироватці крові собак з допомогою біуретової реакції**

### **Теоретичні положення**

Вміст загального білка у крові собак коливається від 50 до 70 г/л. Зміна концентрації білка може мати відносний і абсолютний характер і залежить від об'єму циркулюючої крові, може супроводжуватись як зменшенням концентрації загального білка (гіпопротеїнемія), так і збільшенням її (гіперпротеїнемія). Гіпопротеїнемія практично завжди пов'язана зі зниженням концентрації альбумінів крові (гіпоальбумінемія), гіперпротеїнемія буває часто результатом підвищення вмісту глобулінів (гіперглобулінемія).

Гіпопротеїнемія є найбільш поширеним видом змін концентрації білків крові та спостерігається при більшості захворювань внутрішніх органів.

Абсолютна гіпопротеїнемія розвивається внаслідок:

- + недостатності надходження білків в організм з їжею (голодування, пухлини стравоходу, виразка шлунка та інші стани, які супроводжуються погіршенням перетравлювання та всмоктування білків у шлунково-кишковому тракті);
- + порушення синтезу білків у печінці (паренхіматозні гепатити, цирози, злякисні новоутворення, тиреотоксикоз, дія деяких хімічних сполук);
- + підвищеного розпаду білків в організмі, що спостерігається при дефіциті енергетичних і пластичних ресурсів (термічні опіки, злякисні новоутворення, гіпертермія, порушення гормонального статусу організму);
- + втрати білка організмом при хронічних захворюваннях нирок із нефротичним компонентом (вміст білка може знижуватися до 25–30 г/л) або з кров'ю при кровотечах;
- + дефектопротеїнемії, яка виникає як результат спадкового порушення синтезу білків крові (анальбумінемія, агаммаглобулінемія).

Відносна гіпопротеїнемія є результатом збільшення об'єму рідкої частини крові через затримку в організмі води (при анурії, порушенні регуляції водно-сольового обміну при гіперсекреції антидіуретичного гормону або альдостерону, метаболічному ацидозі тощо).

Гіперпротеїнемія (збільшення загальної кількості білків плазми) також буває абсолютною та відносною. Найчастіше розвивається відносна гіперпротеїнемія, яка спостерігається у тварин із хірургічними захворюваннями та розглядається як ознака зневоднення організму. Цей тип гіперпротеїнемії буває при опіках, генералізованому перитоніті, хронічному нефриті в стадії поліурії, респіраторному ацидозі, отруєннях, що проявляються поліурією, тощо. Абсолютна гіперпротеїнемія розвивається рідко і пов'язана з

підвищенням вмісту  $\gamma$ -глобулінів у результаті токсичного або інфекційного процесу. Збільшення загальної кількості білка можливе за рахунок «патологічних» білків – парапротеїнів. Такими білками є, зокрема, С-реактивний білок.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з методом визначення загальної кількості білка у сироватці крові собак з допомогою біуретової реакції.

**Обладнання та матеріали:** сироватка крові собак, фотоелектрокалориметр (ФЕК), стерильні пробірки, градуйовані піпетки (1, 2, 5 та 10 мл), 0,9 % розчин хлориду натрію, біуретовий реактив, кювети шириною 1 см.

**Принцип методу.** Біуретова реакція обумовлена наявністю в молекулі білка пептидних груп, які в лужному середовищі із міддю утворюють комплексні сполуки, в результаті чого, розчин білка набуває фіолетового забарвлення.

#### **Хід роботи.**

1. У пробірки внести по 0,1 мл сироватки крові собак та додати по 5 мл робочого біуретового реактиву.
  2. Вмістиме пробірок змішати, запобігаючи утворення піни та залишити на 30 хв.
  3. Виміряти оптичну щільність досліджуваних сироваток крові з робочим біуретовим реактивом на ФЕК в кюветі з товщиною 1 см при довжині хвилі 540–560 нм (зелений світлофільтр), порівнюючи їх із контролем, в якому сироватку замінюють 0,1 мл 0,9% розчину хлориду натрію.
  4. Провести розрахунок результатів за каліброваним графіком.
  5. Результати розрахунків занести до протоколу заняття.
- Проаналізувати отримані дані та зробити висновки, порівнявши отримані дані з референтними значеннями.



#### **Завдання 2. Визначити вміст $\gamma$ -глобулінів та інших фракцій білків у сироватці крові собак рефрактометричним методом**

#### **Теоретичні положення**

Зміни співвідношення окремих білкових фракцій при нормальному вмісті загального білка носять назву диспротеїнемій. Найбільш виражені диспротеїнемії при ураженні органів і систем, в яких здійснюється синтез білків плазми крові.

Основними причинами гіпоальбумінемій є:

✚ зниження синтезу альбумінів (утримання тварин на раціонах з низьким вмістом білків, дефекти перетравлювання та всмоктування білків у шлунково-кишковому тракті, деструктивні зміни в печінці тощо);

✚ інтенсивні втрати альбумінів організмом через нирки, при кровотечах, зв'язування і виведення з кровообігу альбумінів при анафілактичному шоці, внаслідок утворення ексудатів, трансудатів тощо.

Гіперальбумінемія спостерігається рідко, має відносний характер та проявляється внаслідок гіпо- та дегідратації.

Зниження концентрації  $\alpha$ -глобулінової фракції спостерігається при лімфолейкозі, мієломі, гострій дистрофії печінки, спадковому дефіциті альфа-1-антитрипсину.

Підвищення вмісту  $\alpha$ -глобулінів характерне для гострих і підгострих запальних процесів (крупозна пневмонія, пієлоцистит, холецистит та ін.), алергічних, стресових станів, некробіотичних процесів. Підвищення білків цієї фракції спостерігається також за механічної жовтяниці, злоякісних пухлин ( $\alpha$ 2-глобуліни), вагітності, альфа-2-плазмоцитоми.

Фракція  $\beta$ -глобулінів містить велику кількість ліпідів, оскільки вони ( $\beta$ -ліпопротеїн) приймають участь у транспорті холестерину і фосфоліпідів. У ній міститься 75 % усіх ліпідів крові. Підвищення вмісту білків цієї фракції завжди спостерігається при первинних та вторинних гіперліпопротеїнеміях. Також підвищення вмісту  $\beta$ -глобулінів спостерігається за хронічних інфекцій, цирозу і токсичних уражень печінки, обтураційної жовтяниці, злоякісних пухлин, кахексії, голодування, вагітності та ін.

Зниження вмісту  $\beta$ -глобулінів супроводжує гіпобеталіпопротеїнемію.

Розвиток гіпогаммаглобулінемії пов'язаний із спадковими ураженнями гуморального імунітету та плазмочитарної тканини або вторинним пригніченням імунореактивної тканини токсичними та токсикоінфекційними впливами, із втратою заліза (захворювання нирок, опіки, екземи тощо), лікуванням кортикостероїдами, імунодепресантами, хіміотерапією, терапією радіовипромінюванням тощо.

Гіпергаммаглобулінемія обумовлена загальним підвищенням вмісту практично усіх класів імуноглобулінів (при септичних інфекціях, пневмонії, пухлинах, токсичному ураженні печінки, обтураційній жовтяниці, аутоімунних захворюваннях, цирозі печінки, циститах, голодуванні та ін.).

**Мета роботи:** ознайомити студентів з рефрактометричним методом визначення вмісту  $\gamma$ -глобулінів та інших фракцій білків у сироватці крові собак рефрактометричним методом.

**Обладнання та матеріали:** сироватка крові собак, фотоелектрокалориметр, стерильні пробірки, градуйовані піпетки (1, 2, 5 мл), 0,9 % розчин хлориду натрію, основний фосфатний розчин, робочі фосфатні розчини № 1, 2, 3, 4, штативи, біуретовий реактив, кювети шириною 1 см.

### Хід роботи.

1. Встановити у штативі 6 пробірок на кожну пробу, помітивши їх числами 0, 1, 2, 3, 4, 5.
2. У пробірку № 0 внести 10 мл дистильованої води, а в пробірки № 1, 2, 3, 4 – по 5 мл відповідних робочих фосфатних розчинів.
3. У пробірку № 5 внести 0,5 мл сироватки крові досліджуваної собаки, 0,75 мл дистильованої води та 3,75 мл основного фосфатного розчину, закупорити пробкою та перемішати шляхом перевертання 5–6 разів.
4. З пробірки № 5 перенести по 0,5 мл суміші в пробірки № 1, 2, 3, 4 та 1 мл в пробірку № 0.
5. Вміст пробірок обережно перемішати, не викликаючи утворення пухирців повітря, та через 15 хвилин визначити оптичну щільність (ОЩ) розчинів в пробірках № 1, 2, 3, 4 проти контролю (№ 0) на ФЕК при червоному світофільтрі в кюветі шириною 1 см.
6. Вимірювання оптичної щільності (ОЩ) провести в зворотній послідовності: спочатку в пробірці № 4, а потім в пробірках № 3, 2, 1.
7. Розрахунок результатів провести за схемою:

ОЩ пробірки №1 – ОЩ пробірки №2 = ОЩ альбумінів.

ОЩ пробірки №2 – ОЩ пробірки №3 = ОЩ  $\alpha$ -глобулінів.

ОЩ пробірки №3 – ОЩ пробірки №4 = ОЩ  $\beta$ -глобулінів.

ОЩ пробірки №4 = ОЩ  $\gamma$ -глобулінів.

8. Взявши суму ОЩ альбумінів та всіх глобулінових фракцій за 100 %, знайти вміст кожної фракції у відносних відсотках. Знаючи концентрацію загального білка, провести перерахунок в абсолютні величини (табл. 3.2).

Таблиця 3.2. Фізіологічні параметри вмісту білкових фракцій у сироватці крові дорослої собаки

Показник	Вміст	
	%	г/л
Загальний вміст білка	100	50–70
Альбумін	~44	22–30,8
Глобуліни:	~52	26–36,4
$\alpha$ -глобулін	~14	7–9,8
$\beta$ -глобулін	~15	7,5–10,5
$\gamma$ -глобулін	~23	11,5–16,1
Фібриноген	~4	2–2,8

9. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки про можливі причини зміни співвідношення фракційного складу білків сироватки крові.



## **Заняття 7. СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИГЕНІВ ТА АНТИТІЛ**

### **Теоретичні положення**

Серологічними методами визначення антигенів та антитіл (серологічними реакціями) називають методи, у яких обов'язковим компонентом є сироватка крові (від лат. «*serum*») або антитіла (імуноглобуліни), отримані із імунної сироватки.

Усі серологічні реакції являються високоспецифічними методами виявлення антигенів *in vitro* та використовуються з метою виявлення специфічних антитіл у сироватці крові хворої тварини з допомогою стандартних антигенів-діагностикумів, а також для визначення певних антигенів (бактерій, грибів, вірусів) у біологічних рідинах організму за відомими стандартними сироватками із специфічними антитілами.

Якщо в реакції антитіл з антигенами беруть участь низькодисперсні антигени (бактерії, клітини), спостерігається феномен аглютинації; при взаємодії антитіл з високодисперсними антигенами (полісахариди, білки та їх комплекси) утворюються преципітати.

Кожна з імунних реакцій відбувається у дві фази. Перша фаза – специфічне зв'язування антигену з антитілом – невидима для нашого ока. Друга фаза – видима, доступна для спостереження та проявляється по-різному, в залежності від умов середовища, у яких відбувається реакція, а також від вихідного фізико-хімічного стану антигену. Так, у реакціях аглютинації і преципітації спостерігається осадження зміненого антигену у присутності електроліту (NaCl). У реакції лізису сенсibiliзований антитілом антиген адсорбує компоненти системи комплементу, і якщо антиген є клітиною, то комплемент викликає її руйнування. Все це вказує на те, що в організмі присутні антитіла, специфічні до даного антигену. Система комплементу – це каскад із 20 білків – ферментів плазми крові, які забезпечують імунну реакцію у відповідь на взаємодію антигену з антитілом. Ця система відповідає за фагоцитоз, руйнування чужорідних бактерій, клітин та інших антигенів, а також приймає участь у розвитку запальних реакцій. Активація каскаду білків системи комплементу може здійснюватися класичним шляхом, при якому стимулюючим фактором є взаємодія антигену з антитілом з утворенням однойменних комплексів антиген-антитіло або альтернативним шляхом (без участі імунних комплексів), коли в ролі цих факторів виступають С-реактивний білок, полісахариди, ендотоксини бактерій тощо. Існує також лектиновий шлях

активації системи комплементу. Незалежно від вихідного стимулюючого фактора, кінцевим продуктом активації системи комплементу є складний білок, здатний руйнувати мембрани клітин, що містять чужорідні антигени.

До реакцій імунітету відносяться реакції аглютинації, преципітації, лізису, зв'язування комплементу, нейтралізації токсину або вірусів та ін.

Серологічні реакції зазвичай проводяться за умов визначених кількісних співвідношень антигену та антитіла для визначення так званого титру.



### **Завдання 1. Визначити стійкість антитіл і комплементу до температури 56 °С**

**Мета роботи:** визначити стійкість антитіл та комплементу в імунологічній реакції гемолізу після обробки їх високою (56 °С) температурою.

**Обладнання та матеріали:** гемолітична сироватка до еритроцитів барана (антитіла), 2,5 %-ва суспензія еритроцитів крові барана у фізіологічному розчині (антиген), комплемент сироватки крові мурчака, фізіологічний розчин, штативи, пробірки, піпетки, водяна баня, термостат.

#### **Хід роботи.**

1. В пробірку № 1 до еритроцитів барана внести 0,5 мл гемолітичної сироватки, в пробірку № 2 – 0,5 мл комплементу, пробірка № 3 – контроль.
2. Перенести пробірки №№ 1 і 2 у водяну баню на 20 хв при температурі 56 °С, після чого використати у імунологічній реакції гемолізу.
3. В усі три пробірки внести компоненти імунологічної реакції згідно таблиці:

<b>№ пробірки</b>	<b>Еритроцити барана</b>	<b>Гемолітична сироватка</b>	<b>Комплемент</b>
<b>1</b>	<i>0,5 мл</i>	<b>0,5 мл (t 56 °С)</b>	<i>0,5 мл</i>
<b>2</b>	<i>0,5 мл</i>	<i>0,5 мл</i>	<b>0,5 мл (t 56 °С)</b>
<b>3</b>	<i>0,5 мл</i>	<i>0,5 мл</i>	<i>0,5 мл</i>

4. Вміст пробірок перемішати і помістити у термостат за температури 38 °С на 30 хв.

5. Через 30 хв прочитати реакцію. Звернути увагу на відсутність гемолізу у пробірці № 2.

6. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки про те, що комплемент нестійкий до нагрівання і після інкубації на водяній бані при температурі 56 °С втрачає свою біологічну активність. На відміну від комплементу, антитіла

витримують нагрівання до температури 60 °С. Термолабільність комплекменту використовують також у біотехнології з метою інактивації сироватки крові тварин, яку використовують при культивуванні стовбурових та інших соматичних клітин *in vitro*.



## **Завдання 2. Вивчити явище адсорбції антитіл (гемолізинів) на поверхні антигену (еритроцитів) (дослід Даніша)**

**Мета роботи:** на прикладі імунологічної реакції гемолізу ознайомити студентів із значенням реакції адсорбції антитіл (гемолізинів) на поверхні антигену (еритроцитів) в механізмі протікання імунологічної реакції між антигеном та антитілом при додаванні антигену окремими частинами.

**Обладнання та матеріали:** гемолітична сироватка до еритроцитів барана (антитіла), 2,5 %-ва суспензія еритроцитів крові барана у фізіологічному розчині (антиген), комплемент сироватки крові мурчака, фізіологічний розчин, штативи, пробірки, піпетки, водяна баня, термостат.

### **Хід роботи.**

1. У пробірку № 1 внести повний набір компонентів: 2,5 %-ву суспензію еритроцитів барана – 0,5 мл; гемолітичну сироватку – 0,5 мл; комплемент сироватки крові мурчака – 0,5 мл; в пробірку № 2: 2,5 %-ву суспензію еритроцитів барана – 0,25 мл; гемолітичну сироватку – 0,5 мл; комплемент сироватки крові мурчака – 0,5 мл:

<b>№ пробірки</b>	<b>Еритроцити барана</b>	<b>Гемолітична сироватка</b>	<b>Комплемент</b>
<b>1</b>	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
<b>2</b>	0,25 мл	0,5 мл	0,5 мл

2. Вмістиме пробірок змішати та помістити у термостат за температури 38 °С.

3. Через 30 хв вийняти пробірки та відмітити результати реакції.

4. У пробірку № 2 додатково внести 0,25 мл еритроцитів барана, що залишились, щоб їх кількість зрівнялась із пробіркою № 1, і знову проби помістити у термостат при вказаній температурі.

5. Через 30 хв проби вийняти та ще раз відмітити результати реакції.

6. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки, звертаючи увагу на те, що

додавання антигену окремими частинами до антитіл у подальшому не викликає гемолізу, оскільки реакція являє собою складний колоїдно-хімічний процес, на першому етапі якого відбувається адсорбція антитіл на поверхні антигену, і не протікає за типом кратних відношень.



### **Завдання 3. Розглянути механізм протікання реакції аглютинації та її модифікації**

**Мета роботи:** ознайомити студентів з механізмом протікання реакції аглютинації та її модифікаціями.

**Обладнання та матеріали:** набори для проведення реакції аглютинації, слайди, інші презентативні матеріали.

#### **Теоретичні положення**

Реакція аглютинації дає можливість виявити у сироватці хворої тварини специфічні антитіла, використовуючи стандартний мікробний діагностикум (серодіагностика захворювання, постановка серологічного діагнозу), а також визначити вид виділеного від хворої тварини мікроба-збудника за допомогою діагностичної аглютинуючої сироватки, яка містить специфічні антитіла (серологічна ідентифікація мікроба). Крім того, в клінічній ветеринарній практиці окрім діагностики інфекційних захворювань тварин, цю реакцію використовують для безпосереднього виявлення антигенів еритроцитів тварин, які визначають їх приналежність до груп кров, що важливо враховувати при гемотрансфузії.

Розрізняють реакцію прямої аглютинації корпускулярних антигенів (мікроорганізмів, еритроцитів), гемаглютинації (у випадку розчинного антигену, наприклад, вірусу грипу птиці, який володіє здатністю склеювати у суспензії еритроцити), реакцію затримки гемаглютинації, а також непрямой (пасивної) аглютинації.

**Реакція прямої аглютинації.** У цій реакції антитіла (аглютиніни) безпосередньо аглютинують корпускулярні антигени (аглютиногени). Зазвичай вони представлені суспензією інактивованих мікроорганізмів (реакція мікробної аглютинації) або еритроцитів (при визначенні груп крові тварин).

За характером утворення аглютинату розрізняють зернисту і пластівчасту аглютинації. Зерниста аглютинація відбувається при склеюванні антитілами еритроцитів або мікробів, які містять О-антиген. Бактерії, які мають джгутики (Н-антиген), аглютинують з утворенням великих пластівців. Проведення реакції аглютинації *in vitro* передбачає додавання електроліта (наприклад, фізіологічного чи буферного розчину), тобто в ній приймають участь 3 компоненти: антиген, антитіло та електроліт. В реакції аглютинації можна виділити дві стадії: на першій відбувається зв'язування антигенної детермінанти антигена з активним центром антитіла (з'єднання епітопа з паратопом); на другій – утворення аглютинату у

присутності електроліта, який знижує електричний заряд комплексів антиген-антитіло і прискорює їх склеювання з утворенням аглютинату.

Для визначення виду мікроорганізмів використовують стандартні діагностичні аглютинуючі сироватки. Їх отримують шляхом гіперімунізації лабораторних тварин суспензією бактерій. Титром такої сироватки є її найбільше розведення, при якому спостерігається виразна аглютинація відповідного антигену. Однак через складність антигенної структури бактерій, аглютинуюча сироватка містить антитіла не тільки до видоспецифічного, але і до групових антигенів, і може давати групову аглютинацію зі спорідненими видами бактерій. Титр антитіл до видоспецифічних антигенів у сироватці завжди вищий, ніж до групових. Для видалення групоспецифічних антитіл у сироватку послідовно додають мікроорганізми, до складу яких входять групові антигени (метод Кастеллані). Таким методом отримують адсорбовані сироватки, які містять антитіла лише до певного виду мікроба.

Найбільш поширені пластинчаста і розгорнута реакції аглютинації.

Пластинчасту реакцію аглютинації ставлять переважно на склі, хоча у ряді випадків (постановка роз-бенгал проби у разі діагностики бруцельозу тварин) її проводять з використанням лункових пластин. У цій реакції використовують сироватки з невеликим розведенням або нерозведені сироватки. Використовують її як експрес-метод виявлення антитіл або ідентифікації мікроорганізмів. За цією методикою краплю досліджуваної сироватки наносять на скло, до неї петлею вносять відому культуру бактерій чи інший антиген, перемішують і через 2–3 хвилини спостерігають за появою дрібнозернистої або пластівцевидної аглютинації. Для контролю використовують краплю фізіологічного розчину, в якому після внесення бактерій чи іншого антигену спостерігається помутніння. При використанні неадсорбованих сироваток реакція на склі має лише орієнтовне значення.

Розгорнуту реакцію аглютинації проводять у пробірках або лунках пластикових планшетів. Для цього у пробірки або лунки вносять різні розведення діагностичної сироватки (1:100, 1:1000, 1:1200, 1:1500 і т.д.) і вносять однакові кількості антигену. На позитивний результат вказує утворення на дні пробірки пухкого осаду у вигляді «парасольки», на негативний – осаду у вигляді «гудзиків». Оскільки титр групоспецифічних антитіл у сироватці значно нижчий, ніж титр видоспецифічних, групові реакції спостерігаються лише в невеликих розведеннях сироватки.

**Реакція прямої гемаглютинації.** Під час цієї реакції віруси склеюють еритроцити тварин та птиці за рахунок білка гемаглютиніну, який знаходиться у оболонці віріонів (залежно від складності їхньої організації). Механізм гемаглютинації полягає в адсорбції віріонів на поверхні еритроцитів і утворенні «містків» між ними, внаслідок чого еритроцити склеюються й осідають на дно пробірки або лунки планшета у вигляді «парасольки». Неаглютиновані еритроцити осідають у вигляді «гудзика».

Процес гемаглютинації може бути зворотним. Віруси, що адсорбувалися на еритроцитах, можуть звільнитися з їхньої поверхні під дією вірусного ферменту нейрамінідази.

**Реакція затримки гемаглютинації** – модифікація реакції прямої гемаглютинації, яка полягає у тому, що у реакцію додатково вводиться ще один компонент – сироватка, яка містить специфічні антитіла до вірусного антигену. При внесенні специфічних антитіл, вони нейтралізують вірус і він втрачає здатність аглютинувати еритроцити.

**Реакція непрямой (пасивної) аглютинації.** Дана реакція дозволяє виявляти некорпускулярні розчинні антигени, адсорбовані на корпускулярних носіях. Сутність реакції непрямой аглютинації полягає в тому, що антиген, який використовується для проведення реакції аглютинації з сироватками крові хворих тварин, попередньо адсорбують на імунологічно інертних частинках латексу, целюлози, оксиду барію, бентоніту, а також еритроцитах тварин або людини з першою групою крові. Особливо широкого розповсюдження набули реакції непрямой аглютинації з використанням еритроцитів. У реакції пасивної гемаглютинації навантажені антигеном еритроцити склеюються у присутності специфічних антитіл до даного антигену і випадають в осад (рис. 3.4). При цьому, еритроцити з адсорбованими на них розчинними антигенами називають сенсibilізованими, а реакція, в якій вони беруть участь, має назву реакції непрямой або пасивної гемаглютинації (РНГА або РПГА). Сама назва реакції підкреслює, що еритроцити виконують в ній лише пасивну роль.

Сенсibilізовані антигеном еритроцити використовують у реакції пасивної гемаглютинації як еритроцитарний антигенний діагностикум для виявлення антитіл (серодіагностика, встановлення серологічного діагнозу) або для виявлення антигенів (якщо еритроцити навантажити специфічними антитілами).

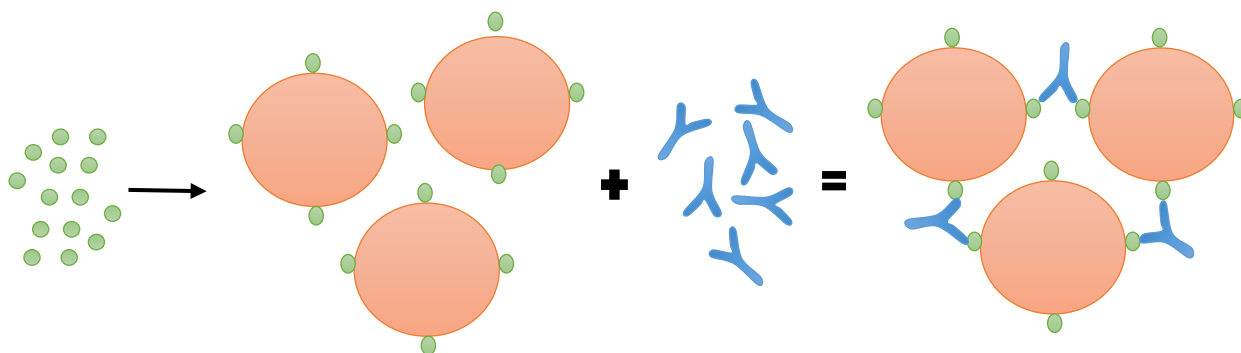


Рис. 3.4. Схема реакції пасивної гемаглютинації

Різні модифікації реакції аглютинації широко застосовують для серологічної діагностики парвовірусної інфекції свиней, рота-, коронавірусної інфекції ВРХ, паратифу, бруцельозу, токсоплазмозу, лептоспірозу, грипу, парагрипу тварин, хвороби Ньюкасла, грипу птиці та інших інфекційних захворювань тварин, а також для визначення груп крові тварин та її сумісності при трансфузії.

*По завершенню ознайомлення з механізмом протікання реакції аглютинації та її модифікаціями схематичні зображення протікання реакцій відобразити у протоколі заняття.*



### **Завдання 3.1. Провести перехресний тест на відповідність крові тварини-донора та реципієнта (метод з використанням мікропробірок)**

#### **Теоретичні положення**

За необхідності переливання крові постає питання сумісності крові донора з кров'ю реципієнта. У такому випадку необхідно визначити групи крові у тварин, оскільки при її несумісності у тварини-реципієнта може виникнути гемотрансфузійний шок. Системи груп (або групи) крові визначаються наявністю специфічних антигенів на поверхні еритроцитів. У людей існує система груп крові АВО, тоді як у тварин існує безліч різних систем груп крові. Знання груп крові у різних видів тварин важливе, оскільки переливання несумісної крові, коли тварина-донор має іншу групу крові, ніж тварина-реципієнт, може призвести до важких гемолітичних реакцій, а в деяких випадках навіть до смерті. Однією з таких гемолітичних реакцій є гемотрансфузійний шок.

Як відомо, гемотрансфузійний шок спричинюється наявністю у крові тварини-реципієнта антитіл (гемаглютининів) до антигенів (аглютиногенів) еритроцитів крові тварини-донора, утворенням у крові численних комплексів антиген-антитіло (еритроцит-антитіло), їх аглютинацією, активізацією системи комплементу та внутрішньосудинним руйнуванням (гемолізом) еритроцитів тварини-донора, у результаті чого в крові тварини-реципієнта з'являються у великій кількості вільний гемоглобін, біогенні аміни, тромбопластин та інші біологічно активні речовини, що насамперед призводить до виникнення ДВЗ-синдрому та порушення мікроциркуляції крові, змін артеріального тиску (раптове падіння або підвищення), гіпертермії, а згодом – і до інших клінічних ознак (порушення дихання та роботи ЦНС, нудота, блювання, кровотечі, гемоглобінурія).

Принципом усіх методів визначення сумісності груп крові у ветеринарії є видима реакція гемаглютинації між поверхневими антигенами еритроцитів тварини-донора та антитілами, які містяться в сироватці тварини-реципієнта (велика перехресна проба або великий перехресний тест). Крім того, з метою виявлення у сироватці крові тварини-донора антитіл до еритроцитів крові тварини-реципієнта проводять малу перехресну пробу (тест). При цьому визначення сумісності крові тварини донора та реципієнта проводять найчастіше з використанням предметних скелець або пробірок.

**Мета роботи:** провести перехресний тест на відповідність крові тварини-донора та реципієнта з допомогою мікропробірок.

**Обладнання та матеріали:** кров тварин, фізіологічний розчин NaCl, шприци різного об'єму, мікропробірки, пробірки без антикоагулянта, пробірки з антикоагулянтом, центрифуга, водяна баня, мікроскоп, піпетки, скляні палички, предметні та покривні скельця, олівці.

**Хід роботи.**

1. *Отримання сироватки крові та суспензії еритроцитів.* Для отримання сироватки крові необхідно відцентрифугувати 3 мл цільної крові тварини-донора та реципієнта, відібрану у окремі пробірки без вмісту антикоагулянту, при 1000 g або 3400 об/хв протягом 10 хв. Таку ж процедуру виконати для отримання суспензії еритроцитів, але кров відібрати у пробірки з ЕДТА.

2. *Промивання еритроцитів.* Ресуспендувати 0,25 мл еритроцитів у 2–4 мл фізіологічного розчину NaCl, відцентрифугувати при 1000 g або 3400 об/хв впродовж 1 хв, видалити супернатант і повторити процедуру двічі.

3. *Приготування робочої суспензії еритроцитів.* Для отримання робочої суспензії еритроцитів (4 %) необхідно ресуспендувати 0,2 мл еритроцитів у 4,8 мл фізіологічного розчину NaCl.

4. *Проведення тесту.* Тест виконують у мікропробірках. Першу мікропробірку позначити як «Великий перехресний тест», другу – «Малий перехресний тест», третю – «Контроль». Змішування реактивів провести, як показано в нижченаведеній таблиці:

Тварина	Великий перехресний тест	Малий перехресний тест	Контроль
Реципієнт	2 краплі сироватки крові	1 крапля робочої суспензії еритроцитів	1 крапля робочої суспензії еритроцитів тварини-реципієнта + 2 краплі сироватки крові тварини реципієнта
Донор	1 крапля робочої суспензії еритроцитів	2 краплі сироватки крові	1 крапля робочої суспензії еритроцитів тварини-донора + 2 краплі сироватки крові тварини донора

5. Після змішування складових тесту закрити пробірки та інкубувати впродовж 15 хв за температури 37 °С у водяній бані, після чого вмістиме відцентрифугувати при 1000 g або 3400 об/хв впродовж 15 секунд.

6. Обережно ресуспендувати еритроцитарний осад. З допомогою скляної палички помістити краплю ресуспендованих еритроцитів на предметне

скло, накрити покривним скельцем та проглянути під мікроскопом за збільшення  $\times 100$  і  $\times 400$ , відзначаючи наявність чи відсутність аглютинації еритроцитів.

7. Результати перехресного тесту на відповідність крові тварини-донора та реципієнта з допомогою мікропробірок занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки про можливість переливання крові від тварини-донора тварині-реципієнту, звертаючи увагу на наявність чи відсутність аглютинації еритроцитів.

**Інтерпретація.** При позитивній реакції великого перехресного тесту, яка свідчить про несумісність крові, у суміші з'являються дрібні зернятка (склеєні еритроцити), які помітні неозброєним оком. У даному випадку тварині-реципієнту, сироватка крові якої аглютинувала еритроцити, не можна переливати кров тварини-донора, еритроцити якої були аглютиновані. При несумісності крові також спостерігається гемоліз (порівняно з контролем).

Аглютинацію слід відрізнити від утворення монетних стовпчиків. Це легко зробити при сильній аглютинації, але може бути важко – при слабкій. Мікроскопічно в агрегатах аглютинованих еритроцитів клітини зліті разом, випадково орієнтовані та накладаються одна на одну; у монетному стовпчику еритроцити вирівняні сплюснутими поверхнями один до одного і виглядають як «стоси монет».

При негативній реакції, яка свідчить про сумісність крові, суміш увесь час залишається рівномірної консистенції. У даному випадку тварині-реципієнту, сироватка крові якої не аглютинувала еритроцити, можна переливати кров тварини-донора, еритроцити якої не були аглютиновані.

Дану інтерпретацію слід застосувати і для малого перехресного тесту. При цьому також необхідно зважати і на результат тесту в контрольних мікропробірках.



### **Завдання 3.2. Визначити сумісність крові при трансфузії у тварин (метод з використанням предметних скельць)**

**Мета роботи:** визначити сумісність крові при трансфузії у тварин з використанням предметних скельць.

**Обладнання та матеріали:** 4 %-ві суспензії еритроцитів та інактивовані сироватки крові тварин, чисті знежирені предметні скельця, піпетки, скляні палички, олівці.

#### **Хід роботи.**

1. Підписати предметні скельця, на яких будуть змішуватися еритроцити і сироватка крові від різних тварин залежно від їх кількості.

2. На предметні скельця за допомогою скляних паличок нанести по одній краплі інактивованих впродовж 30 хв на водяній бані за температури 56 °С сироваток тварин-реципієнтів.

3. На предметні скельця поряд із інактивованими сироватками помістити по одній краплі суспензії еритроцитів від тварин-донорів.

4. Відмітивши час, іншими чистими та сухими скляними паличками перемішати суспензії еритроцитів з сироватками крові до одержання рівномірної суміші.

5. Провести візуальне визначення сумісності груп крові протягом 5 хв при похитуванні скла.

6. У випадку настання аглютинації (появи дрібних зерняток (склеєних еритроцитів), які помітні неозброєним оком), проте не раніше ніж через 3 хв, до краплини, де відбувається аглютинація, з допомогою чистої скляної палички додати одну краплину фізіологічного розчину і продовжувати спостереження при похитуванні предметного скла.

7. Результати визначення сумісності крові занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки про можливість переливання крові від тварин-донорів тваринам-реципієнтам, звертаючи увагу на наявність чи відсутність аглютинації еритроцитів.

**Інтерпретація.** Інтерпретація аналогічна, як у разі проведення перехресного тесту на відповідність крові тварини-донора та реципієнта.



### **Завдання 3.3. Визначити групи крові у котів**

#### **Теоретичні положення**

Для визначення безпосередньо груп крові у тварин, зокрема собак, котів, свиней та коней, доступні імунохроматографічні карти, визначення груп крові в яких засновано на принципі імунодифузії, та картки експрес-тестів, визначення груп крові в яких засновано на принципі аглютинації.

На сьогодні у ВРХ виявлено 11 систем груп крові, відповідність до яких визначається наявністю на еритроцитах більше 85 різних антигенів (кожну систему характеризують лише кілька антигенних факторів), у коней – 8 систем груп крові з теоретично можливою комбінацією 400 000 груп крові, у свиней – 16 систем груп крові, у овець – 6 систем груп крові, у кролів – 7 систем груп крові, у собак – 8 систем груп крові, у котів – 1 система групи крові, яка містить 3 групи крові: А, В і АВ. Як і у людини, антигени групи крові у котів визначаються специфічними вуглеводами на мембранах еритроцитів. N-гліколіл-нейрамінова кислота визначає антиген А, а N-ацетил-нейрамінова кислота визначає антиген В, причому однакові кількості обох кислот виявляються на АВ-еритроцитах. У котів з групою крові В відсутній фермент

гідроксилаза, який перетворює N-ацетил-нейрамінову кислоту в N-гліколіл-нейрамінову кислоту. Антигени групи крові успадковуються як проста аутосомна ознака, де А домінує над В. Коти мають природні антитіла, які відповідають за потенційно небезпечні для життя реакції на переливання крові. У котів з групою крові В анти-А антитіла є сильними аглютинінами та гемолізінами, особливо класу IgM. Навпаки, анти-В антитіла у котів з групою крові А є слабкими аглютинінами та гемолізінами (належать до класу IgG та IgM). Коти з групою крові АВ не мають природних антитіл і можуть безпечно отримувати кров від кішок типу А або В (універсальні реципієнти).

**Мета роботи:** визначити групи крові у котів за допомогою експрес-тесту RapidVet-H, заснованому на реакції аглютинації.

**Обладнання та матеріали:** набір експрес-тестів RapidVet-H для визначення груп крові котів, кожен з яких включає тестову картку аглютинації, яка містить 3 тестових поля («Auto-Agglutination Saline Screen», «Patient Test» – група А і В), пластиковий флакон з розчинником, пластикові піпетки і мішалки, стабілізована ЕДТА кров котів.

**Принцип методу.** Визначення груп крові тварин, зокрема і котів, з допомогою експрес-тесту, заснованому на реакції аглютинації, полягає в тому, що аглютинація відбувається тоді, коли еритроцити, що містять на поверхні своєї мембрани одну з груп А-, В- або АВ-антигенів, взаємодіють з висушеною антисироваткою до відповідного специфічного антигену, нанесеного на тестове поле картки.

#### **Хід роботи.**

1. Підписати тестову картку аглютинації.
2. *Провести тест на аутоаглютинацію.* Для цього необхідно нанести 1 краплю розчинника (50 мкл) на поле «Auto-Agglutination Saline Screen», після чого туди ж внести з допомогою піпетки 1 краплю (50 мкл) зразка досліджуваної крові. Використовуючи піпетку для змішування матеріалів, змішати розчинник з краплею крові по всій поверхні тестового поля протягом 10 секунд.
3. *Провести тест на визначення групи крові.* Нанести по 1 краплі розчинника (50 мкл) на поля «Patient Test» – група А і В, після чого туди ж внести з допомогою піпетки по 1 краплі (50 мкл) зразка досліджуваної крові. Використовуючи піпетку для змішування матеріалів, змішати розчинник з краплями крові по всій поверхні тестових полів протягом 10 секунд.
4. Обережно змішати вміст кожного з полів картки шляхом її нахилання вздовж своєї осі протягом < 1 хвилини, слідкуючи, щоб не було перетікання вмістимого з інших полів.
5. Нахилити картку під кутом 10–20 градусів, щоб надлишок крові стік до нижньої частини тестових полів та оцінити матеріал, що залишився у

верхніх частинах тестових полів, на предмет наявності чи відсутності аглютинації (рис. 3.5).

6. Результати визначення групи крові занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки про можливість переливання дослідженої крові котам з відповідною групою крові.

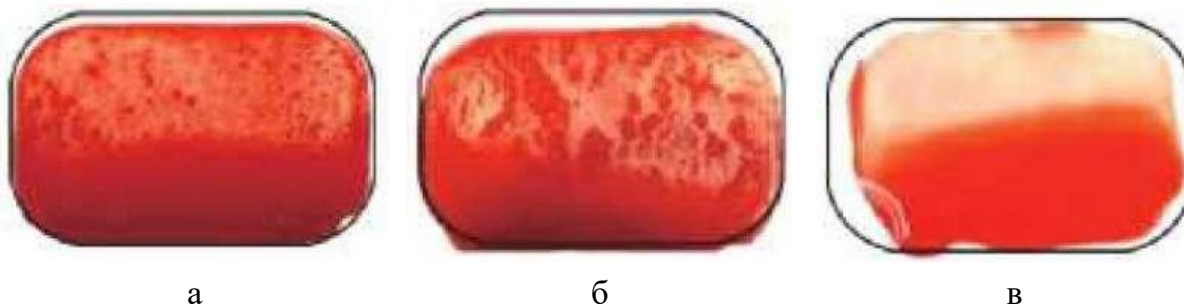


Рис. 3.5. Тестові поля тестової картки аглютинації експрес-тесту для визначення груп крові котів: *а* і *б* – наявність аглютинації, *в* – відсутність аглютинації

**Інтерпретація.** Якщо тест проводиться вірно, то хоча *б* в одному з тестових полів з написом «Patient Test» відбудеться реакція аглютинації (рис. 3.5). При цьому, якщо аглютинація добре видна в тестовому полі для групи А, то тестована кров має групу А; якщо аглютинація добре видна в тестовому полі для групи В, то тестована кров має групу В; якщо аглютинація добре видна в обох тестових полях, то тестована кров має групу АВ.



#### **Завдання 3.4. Визначити групи крові у собак**

##### **Теоретичні положення**

Існує 8 основних систем груп крові собак, позначених як DEA (Dog Erythrocyte Antigens, антиген собачих еритроцитів) від 1 до 8. Самою важливою системою групи крові, яка має важливе клінічне значення при переливанні крові, є DEA 1, яка визначається трьома алелями – DEA 1.1 (40–60 %), 1.2 (10–20 %) та 1.3 (зустрічається рідко), кожен з яких не визначає окрему групу крові, а, швидше, свідчить, про різний ступінь прояву експресії. Собаки можуть бути позитивними на DEA 1.1 або 1.2, або негативними щодо них обох. Гострі гемолітичні реакції після трансфузії крові виникають лише у собак з негативним показником DEA 1.1, 1.2. Разом з тим, оскільки такі собаки не мають природних антитіл, реакція буде спостерігатися лише після їх сенсibiliзації еритроцитами крові з DEA 1.1, 1.2 (вироблення антитіл триває 7–10 діб після контакту).

**Мета роботи:** визначити групи крові у собак за допомогою експрес-тесту RapidVet-H (Canine DEA 1), заснованому на реакції аглютинації.

**Обладнання та матеріали:** набір експрес-тестів RapidVet-H (Canine DEA 1) для визначення груп крові собак, кожен з яких включає тестову картку аглютинації, яка містить 3 тестових поля («Auto-Agglutination Saline Screen», «DEA 1.1 Positive Control», «Patient Test»), пластиковий флакон з розчинником, пластикові піпетки і мішалки, стабілізована ЕДТА кров собак.

**Принцип методу.** Аналіз заснований на реакції аглютинації, яка відбувається, коли еритроцит, що містить антиген DEA 1.1 на поверхні мембрани, взаємодіє з мишачим моноклональним антитілом, специфічність якого доведена до DEA 1.1, адсорбованим на тестовій платі. Моноклональне антитіло розчиняється розчинником до форми антисироватки, і ретельно перемішується з цілісною кров'ю пацієнта. Всі DEA 1.1-позитивні еритроцити реагують з антисироваткою, викликаючи аглютинацію. Антисироватка не реагує з усіма DEA 1.1-негативними еритроцитами.

#### **Хід роботи.**

1. Підписати тестову картку аглютинації.
2. Провести тест на аутоаглютинацію. Для цього необхідно нанести 1 краплю розчинника (50 мкл) на поле «Auto-Agglutination Saline Screen», після чого туди ж внести з допомогою піпетки 1 краплю (50 мкл) зразка досліджуваної крові. Використовуючи піпетку для змішування матеріалів, змішати розчинник з краплею крові по всій поверхні тестового поля протягом 10 секунд.
3. Провести тест на визначення групи крові. Нанести по 1 краплі розчинника (50 мкл) на поля «DEA 1.1 Positive Control» та «Patient Test», після чого туди ж внести з допомогою піпетки по 1 краплі (50 мкл) зразка досліджуваної крові. Використовуючи піпетку для змішування матеріалів, змішати розчинник з краплями крові по всій поверхні тестових полів протягом 10 секунд.
4. Обережно змішати вмістиме кожного з полів картки шляхом її нахилання вздовж своєї осі протягом < 1 хвилини, слідкуючи, щоб не було перетікання вмістимого з інших полів.
5. Нахилити картку під кутом 10–20 градусів, щоб надлишок крові стік до нижньої частини тестових полів та оцінити матеріал, що залишився у верхніх частинах тестових полів, на предмет наявності чи відсутності аглютинації.
6. Результати визначення групи крові занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки про можливість переливання дослідженої крові собакам з відповідною групою крові.

**Інтерпретація.** Якщо тест проводиться вірно, то в тестовому полі з написом «DEA 1.1 Positive Control» відбудеться реакція аглютинації. При

цьому, якщо аглютинація добре видна в тестовому полі з написом «Patient Test», то тестована кров позитивна на антиген DEA 1.1; якщо аглютинація відсутня в тестовому полі з написом «Patient Test», то тестована кров негативна на антиген DEA 1.1.



### **Завдання 3.5. Визначити наявність антитіл до збудника бруцельозу великої рогатої худоби з допомогою роз-бенгал проби (РБП)**

**Мета роботи:** дослідити сироватку крові великої рогатої худоби на наявність антитіл до збудника бруцельозу.

**Обладнання та матеріали:** досліджувані сироватки крові великої рогатої худоби, бруцельозний антиген (роз-бенгал антиген) для РБП (завись інактивованих *V. abortus*, забарвлених бенгальським рожевим), позитивна і негативна сироватки крові великої рогатої худоби, 0,5 %-ий фенолізований фізіологічний розчин, емальвані лункові пластини, напівавтоматичні піпетки.

**Принцип методу.** Принцип РБП заснований на здатності бруцельозного антигену аглютинуватися гомологічними антитілами сироватки крові тварин, хворих на бруцельоз або імунізованих бруцельозними вакцинами.

**Хід роботи.** Реакцію проводять на чистих сухих емальованих діагностичних пластинках з лунками за температури не нижче 18 °С.

1. З допомогою напівавтоматичної піпетки внести на дно лунки пластинки по 0,03 мл досліджуваних сироваток крові ВРХ.

2. За допомогою іншої напівавтоматичної піпетки в кожен лунку поруч з досліджуваною сироваткою внести по 0,03 мл роз-бенгал антигену.

3. Шляхом погойдування пластинки на протязі 4 хв ретельно змішати антиген з досліджуваними сироватками до отримання в кожній лунці однорідної рідини, розподіляючи її при цьому по всій поверхні лунки.

4. На початку роботи необхідно також поставити контроль антигену з негативною і позитивною бруцельозними сироватками в тих самих дозах, а також контроль антигену на спонтанну аглютинацію (до 0,03 мл фізіологічного розчину додати 0,03 мл антигену).

5. Протягом 4 хв після змішування сироваток з антигеном при злегка нахиленому положенні пластинки візуально провести облік результатів реакції, звертаючи увагу на наявність чи відсутність феномену аглютинації у лунках.

6. Результати реакції занести до протоколу заняття та зробити висновки про наявність чи відсутність у сироватці крові досліджуваних тварин антитіл до збудника бруцельозу великої рогатої худоби.

**Інтерпретація.** Реакцію вважають позитивною при наявності вираженої аглютинації забарвленого бруцельозного антигену у вигляді дрібних або

великих пластівців рожевого кольору, що виділяються на білому тлі лунки. Реакцію вважають негативною при відсутності аглютинації (суміш гомогенна, рівномірно забарвлена).



## **Заняття 8. МЕТОДИ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ**

### **Теоретичні положення**

Широке поширення у ветеринарії, зокрема клінічній та експериментальній імунології, терапії, онкології, репродуктології останнім часом отримали імуоферментні методи досліджень.

Імуоферментними називаються методи, засновані на реєстрації комплексу антиген-антитіло за допомогою антитіл, маркованих певними ферментами (пероксидаза хрому, лужна фосфатаза, глюкозооксидаза, ацетилхолінестераза, каталаза, лізоцим та інші), з подальшим утворенням легко реєстрованих хромогенних продуктів ензиматичного перетворення додаткових компонентів реакції. Головною особливістю методів імуоферментного аналізу (ІФА) є саме застосування у якості мітки ферменту – функціонально активної білкової молекули, що володіє каталітичною дією (одна молекула ферменту, використовуваного у якості мітки, здатна за нормальних умов за 1 хв катаболізувати  $10^6$  молекул відповідного субстрату).

Отримавши попередньо кон'югат ферменту з антигеном або антитілом, протікаючу реакцію між антигеном і антитілом оцінюють не за її вторинними проявами (аглютинацією, преципітацією, лізисом еритроцитів), а за перетворенням субстрату ферментом, яке знаходиться у прямій залежності від кількості компонентів реакції антиген-антитіло, які вступили у взаємодію.

Для реєстрації активності ферментної мітки використовують флуориметричний, хемілюмінесцентний, електрохімічний та інші методи, однак найбільш широке поширення набула спектрофотометрія у видимій частині спектру з використанням імуоферментних аналізаторів (рис. 3.6).



Рис. 3.6. Імуоферментний аналізатор (ІФА-рідер)

В основному, імуноферментний аналіз або ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) застосовується для виявлення специфічних антигенів на поверхні клітинної мембрани, а також антигенів або антитіл у сироватці крові чи інших біологічних рідинах організму тварин. Він відноситься до простих, чутливих, швидких і добре відтворюваних методів досліджень.



### **Завдання 1. Розглянути види імуноферментного аналізу та принципи його проведення**

**Мета роботи:** ознайомити з видами імуноферментного аналізу та принципами його проведення.

**Обладнання та матеріали:** набори для проведення імуноферментного аналізу, імуноферментний аналізатор, слайди, інші презентативні матеріали.

#### **Теоретичні положення**

Імуноферментний аналіз дозволяє виявляти антигени і антитіла у пробах у винятково низьких концентраціях і є практично універсальним.

У даний час розроблено кілька різновидів імуноферментного методу:

- ✚ гомогенний ІФА – усі стадії аналізу протікають у водному середовищі;
- ✚ гетерогенний або твердофазний ІФА – один із компонентів реакції (антиген або антитіло) мобілізують на спеціальних твердих носіях – полістиролових планшетах або пробірках, з обов'язковою стадією розділення зв'язаних (прореагувавших) і вільних (не прореагувавших) компонентів імунної реакції шляхом багаторазового відмивання.

Гомогенний ІФА інакше називають ІФА без поділу компонентів. Аналіз проводять у пробірці, де всі імунологічні та ферментативні реакції відбуваються у єдиній суміші розчинів, без поділу і видалення проміжних продуктів. Такий аналіз можна провести лише у тому випадку, якщо активність ферменту у вільному кон'югаті відрізняється від активності ферменту у кон'югаті зв'язаному. Таким чином, суть гомогенного варіанту ІФА полягає в інгібуванні або індукції активності ферментної мітки у результаті взаємодії імунореагентів.

Відомо, що каталітична активність ферменту сильно залежить від його просторової структури, обумовленої численними нековалентними і дисульфідними зв'язками. Однак нековалентні хімічні зв'язки неміцні і легко руйнуються або суттєво послаблюються під впливом різних факторів. Прикладом таких впливів можуть бути додаткові нековалентні взаємодії, які призводять до зміни просторової структури молекули ферменту, а отже, і його каталітичної активності. Якщо активність мічених ферментом антигенів,

зв'язаних з антитілами, помітно відрізняється від активності вільних мічених антигенів, то можна виміряти ферментативну активність досліджуваного зразка без поділу вільних і зв'язаних з антитілами мічених антигенів.

Гомогенний ІФА застосовують в основному для швидкого виявлення низькомолекулярних антигенів: токсинів, стероїдних гормонів, гаптенів і лікарських препаратів у біологічних рідинах, наприклад сечі. У цьому випадку у якості кон'югату використовують шукану лікарську речовину (антиген), мічену ферментом (антиген-фермент). При відсутності у сечі лікарської речовини всі антитіла, спрямовані проти цього антигену, зв'яжуться з міченою ферментом лікарською речовиною (антиген-фермент), і увійшовши у комплекс «антитіло-антиген-фермент», молекули ферменту втратять свою активність. Якщо ж у досліджуваному зразку сечі шуканий антиген є, то мічена ферментом лікарська речовина (антиген-фермент) буде конкурувати з тією ж лікарською речовиною, але без ферменту (антиген), за зв'язування з антитілами, кількість яких обмежена. У цьому випадку менше число молекул ферменту втратить свою активність, оскільки поряд з комплексами «антитіло-антиген-фермент» будуть утворюватися і комплекси «антитіло-антиген». Частина комплексу «антиген-фермент» залишиться у незв'язаному стані і зможе каталізувати розщеплення субстрату, змінюючи колір розчину. У даному випадку ферментативна активність кон'югату прямо пропорційна кількості лікарської речовини у досліджуваному зразку. Реакцію аналізованого зразка порівнюють з негативною реакцією нормальної сечі і позитивною реакцією стандартного розчину лікарської речовини.

Найбільшого поширення в біології та ветеринарній медицині отримали різні варіанти гетерогенного ІФА. Цю групу методів називають також ІФА з поділом компонентів, твердофазним ІФА (ТІФА), фермент-залежним імуносорбентним аналізом. Аналіз проводять у кілька етапів, кожний з яких завершується видаленням розчинів з планшету і промиванням його буфером з додаванням детергенту.

Основою гетерогенного ІФА є прикріплення імунореагентів – антигенів або антитіл до твердої фази із збереженням їх імунової активності. Неприєднані компоненти видаляють у процесі обов'язкової процедури відмивання після кожного етапу аналізу.

У ході проведення ТІФА до імунореагентів, які «сидять» на твердій фазі, приєднуються комплементарні антигени або антитіла. У результаті цього, згідно поставленого завдання, на твердій фазі, як на фундаменті, будується «будівля» в два або більше «поверхів» – дво- або багат шарові імунні комплекси. Потім утворені імунні комплекси мітять ферментом, який входить до складу кон'югату, які на заключному етапі аналізу виявляють за допомогою хромогенної субстратної суміші. Твердофазні імуноферментні системи завдяки високій чутливості та методичній простоті дуже зручні для виявлення імуних комплексів, визначення ізотипів антитіл, приналежності мікроорганізмів, для лабораторної діагностики різних інфекційних хвороб тварин.

У якості твердої фази для проведення ТІФА використовують такі матеріали, як полістирол, полівінілхлорид, поліпропілен, целюлоза, нітроцелюлоза, нейлон, гелі декстрану, поліакриламід, агарози та ін. Тверда фаза може бути у вигляді пробірок, планшетів для мікротитрування, але в даний час найчастіше використовують пластикові планшети для титрування з 96 лунками, які мають плоске дно.

Процедура прикріплення імунореагентів до пластику називається *сенсibiliзацією твердої фази*. Більшість антигенів різної хімічної природи (білки, нуклеїнові кислоти, пептиди, полісахариди, ліпополісахариди) і антитіла самовільно адсорбуються на поверхні пластику. Ступінь адсорбції залежить від фізико-хімічних властивостей молекул, від концентрації молекул у розчині, від співвідношення площі зв'язування до обсягу внесеного зразка, а також від температури і часу інкубації.

Гетерогенний ІФА можна використовувати і при роботі з корпускулярними антигенами: клітинами бактерій, еукаріот, вірусами, хромосомами та ін. Корпускулярні антигени прикріплюють на пластикову поверхню або шляхом звичайної адсорбції, або висушуванням.

Найбільш простими варіантами ТІФА, при яких утворюються двошарові імунні комплекси, є прямі неконкурентні методи (рис. 3.7).

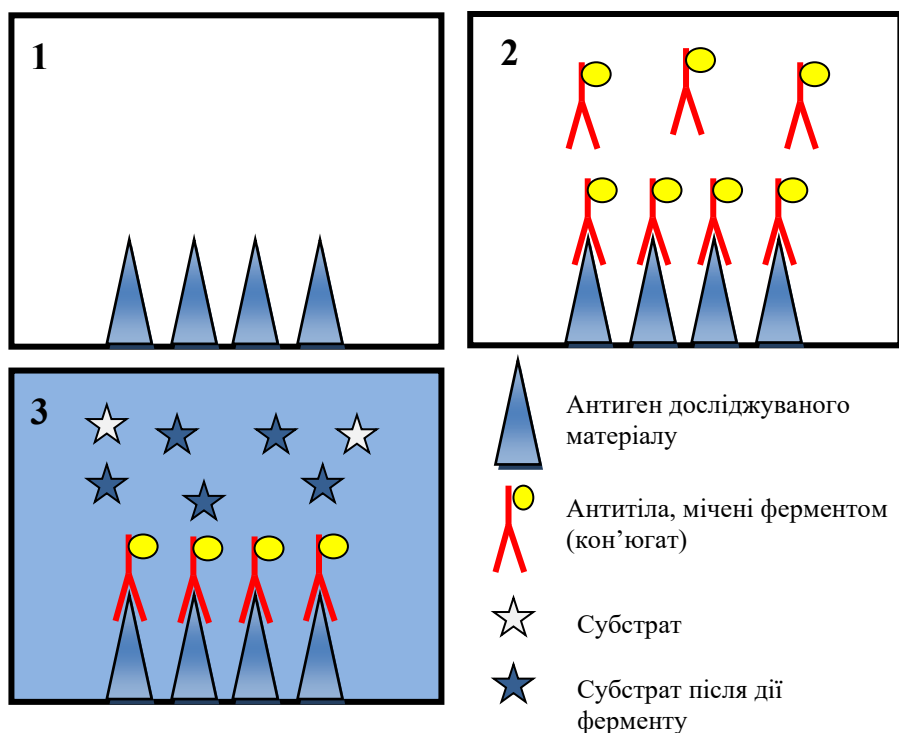


Рис. 3.7. Принцип проведення прямого неконкурентного ТІФА: 1 – внесення досліджуваного матеріалу, який містить антиген, та його адсорбція на твердій фазі; 2 – внесення специфічних антитіл, мічених ферментом (кон'югату); 3 – взаємодія ферменту із субстратом, що призводить до зміни його кольору

У разі проведення прямого ТІФА лунки планшету сенсibiliзують розчином антигену або антитіл, блокують залишені вільні місця на твердій фазі білком, після чого у лунки додають кон'югат – мічені ферментом антитіла або антигени. При цьому кон'югат зв'язується з твердою фазою лише у тому випадку, якщо до пластику прикріплений комплементарний імунореагент – «фундамент» імуного комплексу. Такий варіант ІФА переважно використовують для виявлення антигену, адсорбованого на твердій фазі.

Непрямий метод ТІФА проводять з використанням антивидових кон'югатів, що дозволяє вирішувати проблеми серодіагностики самих різних захворювань тварин з допомогою обмеженого набору кон'югатів (рис. 3.8).

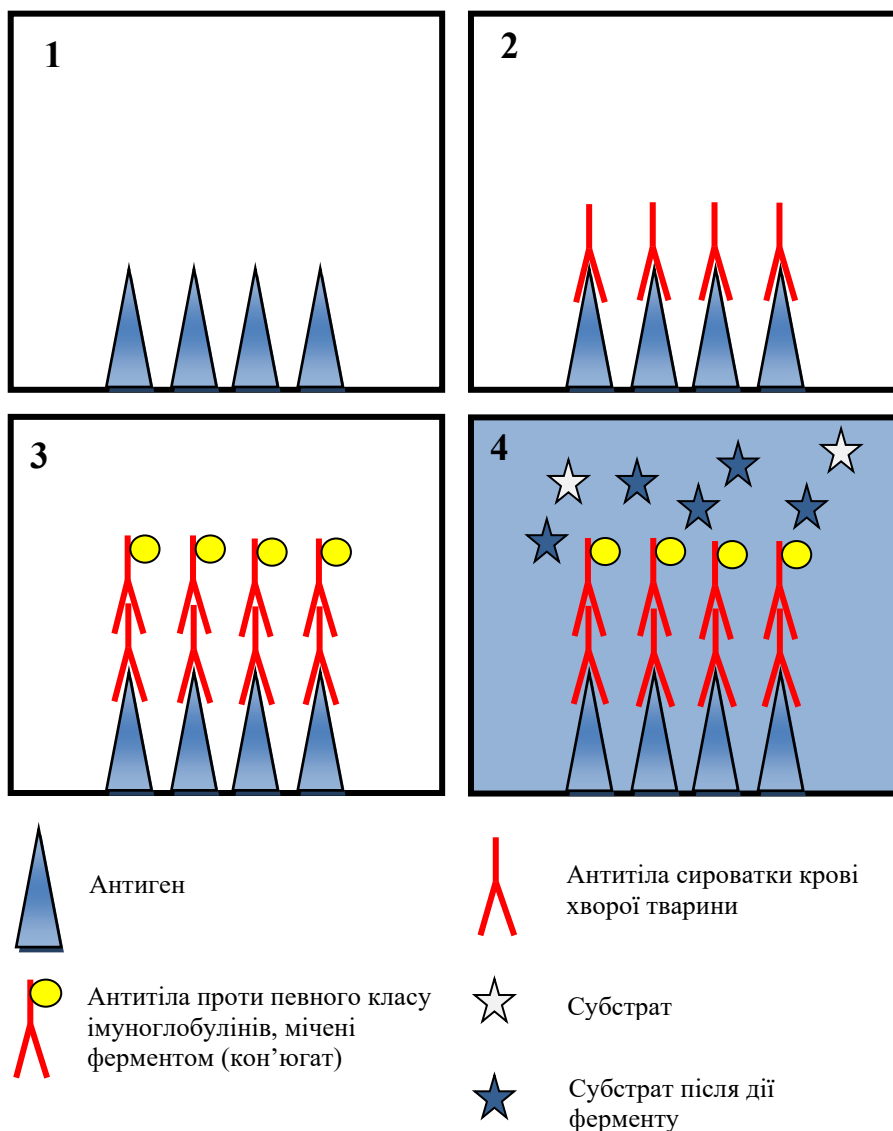


Рис. 3.8. Принцип проведення непрямиго ТІФА:

- 1 – адсорбція антигену на твердій фазі;
- 2 – внесення сироватки крові тварини, яка містить специфічні антитіла;
- 3 – внесення антитіл проти певного класу імуноглобулінів, мічених ферментом (кон'югат);
- 4 – взаємодія ферменту із субстратом, що призводить до зміни його кольору

Таким чином, у разі проведення непрямого ІФА, маючи у розпорядженні лише один кон'югат – антитіла проти певних імуноглобулінів тварини, мічені пероксидазою, можна ідентифікувати у сироватці крові тварини безліч специфічних антитіл, спрямованих проти різних антигенів-збудників хвороб і не лише.

Для визначення у зразках антигенів і імунних комплексів також широко застосовується «сендвіч»-варіант ІФА (рис. 3.9).

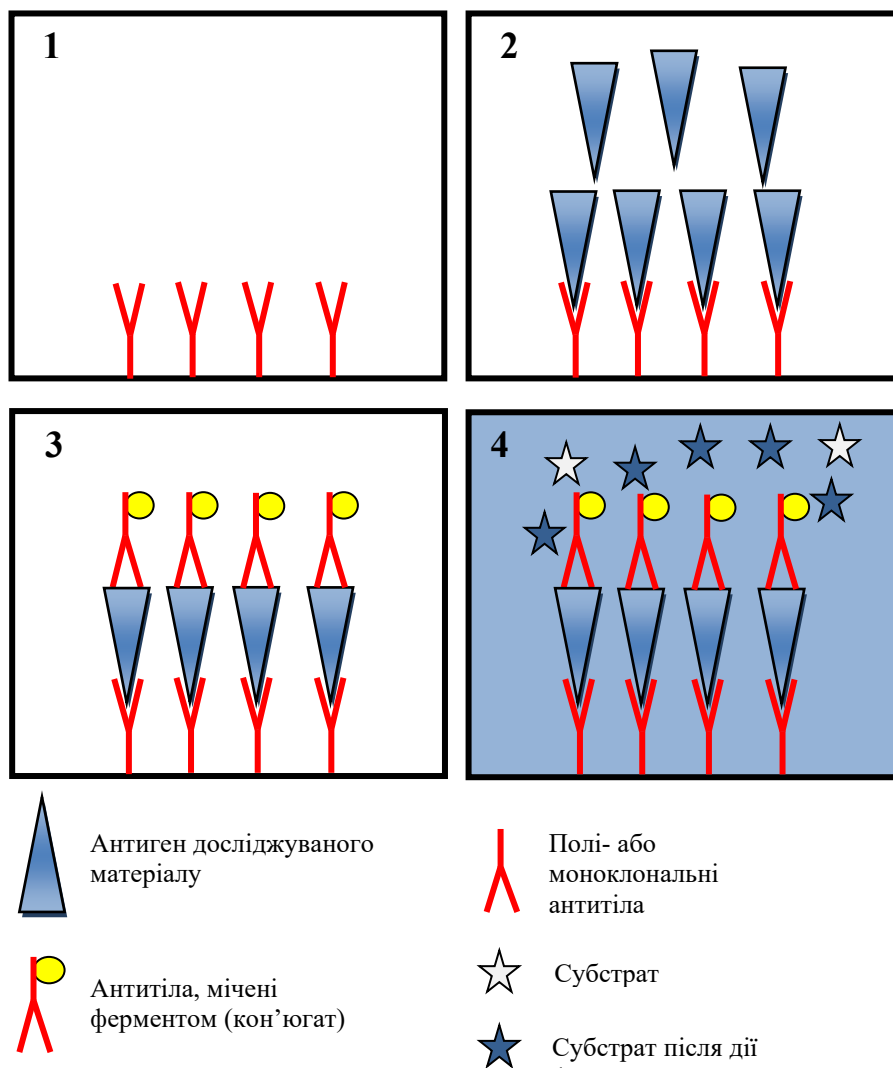


Рис. 3.9. Принцип проведення «сендвіч»-варіанту ІФА:  
 1 – адсорбція специфічних антитіл на твердій фазі; 2 – внесення досліджуваного матеріалу, який містить антиген; 3 – внесення специфічних до антигену антитіл, мічених ферментом (кон'югат); 4 – взаємодія ферменту із субстратом, що призводить до зміни його кольору

«Сендвіч»-варіант ІФА проводиться за наступною схемою. Очищені високоафінні поліклональні або моноклональні антитіла до певного антигену адсорбують на твердій фазі та блокують вільну поверхню пластику. Потім у відміті лунки вносять досліджуваний матеріал, який містить або не містить

антиген, а також позитивний і негативний контролі. Після інкубації і процедури відмивання у лунки вносять кон'югат – мічені ферментом антитіла до шуканого антигену. Далі, після відмивання, у лунки вносять розчин субстратної суміші та стежать за розвитком кольорової реакції. В утвореному імунному комплексі шуканий антиген виявляється «затиснутим» між молекулами антитіл, через що дану модифікацію ТІФА і називають «сендвіч»-варіантом.

Крім простого неконкурентного варіанту ТІФА, коли на першій стадії у системі може бути присутнім тільки досліджуваний антиген і специфічні антитіла до нього з надлишком центрів зв'язування, застосовують і більш складний конкурентний метод ІФА. У останньому випадку у системі діє не лише досліджуваний антиген, але і його аналог, який конкурує за центри специфічного зв'язування антитіл, які присутні у відносній нестачі.

Отже, за допомогою ІФА виявляють в біологічних матеріалах речовини білкової природи (антитіла, антигени інфекційного та неінфекційного походження, ферменти, токсини, лікарські речовини, гормони тощо), тому даний метод набув широкого застосування в різних галузях ветеринарної медицини: клінічній та експериментальній мікробіології, вірусології та паразитології (діагностика інфекційних та паразитарних хвороб тварин); біохімії (дослідження вмісту ферментів у біологічних рідинах); токсикології (дослідження вмісту токсинів у біологічних рідинах); фармакології (дослідження вмісту лікарських речовин у біологічних рідинах); ендокринології (дослідження вмісту гормонів у біологічних рідинах), а також для контролю технології виробництва у фармацевтичній та мікробіологічній промисловостях.

*По завершенню ознайомлення з принципами проведення імуноферментного аналізу за діагностики хвороб тварин схематичні зображення протікання аналізу відобразити у протоколі заняття.*



### **Завдання 1.1. Виявити специфічні антитіла проти антигенів у сироватці крові собак з допомогою імуноферментного аналізу**

**Мета роботи:** виявити специфічні антитіла проти антигенів у сироватці крові собак з допомогою імуноферментного аналізу.

**Обладнання та матеріали:** розчин антигену підібраної концентрації, сироватки крові імунованих собак (позитивний контроль), сироватки крові здорових собак (негативний контроль), досліджувані сироватки крові собак, кон'югат – кролячі антитіла, вироблені проти імуноглобулінів IgG собаки, мічені пероксидазою хрому, розчин фосфатного буферу з твіном (0,05 % за об'ємом) – ФБ-Т, 1 %-ий розчин бичачого сироваткового сальбуміну (БСА), піпетки 10–100 мкл, наконечники до піпеток, планшети, штатив для пробірок, стерильні пробірки, спектрофотометр, холодильник, термостат.

### **Хід роботи.**

1. Лунки планшету, за винятком першого стовпця (1А–1Н), сенсibiliзувати антигеном (концентрацію розчину слід підібрати заздалегідь). В лунки першого стовпця планшету внести по 100 мкл ФБ-Т.

2. Після видалення з лунок незв'язаних компонентів і трьохкратної промивки планшету вільні ділянки твердої фази заблокувати 1%-им розчином БСА у ФБ-Т, вносячи у кожен лунку по 150–200 мкл розчину.

3. Інкубувати 1 год при 37 °С.

4. Під час інкубації блокуючого розчину приготувати послідовні розведення досліджуваних сироваток від 1:100 до 1:12800 на ФБ-Т; 0,8 мл «позитивної» сироватки крові (сироватки імунізованих собак) у заздалегідь підбраному розведенні, наприклад, 1:800, та 1,6 мл «негативної» сироватки крові здорових собак у розведенні 1:400. Всі пробірки з сироватками повинні бути підписані.

5. Після видалення блокуючого розчину і триразового відмивання лунок внести по 100 мкл розчинів сироваток: «позитивну» сироватку – у лунки другого стовпця (2А–2Н); «негативну» сироватку – у лунки третього і четвертого стовпців (3А–3Н, 4А–4Н); вісім досліджуваних сироваток у розведеннях від 1:100 до 1:12800 – у лунки 5–12 рядів А–Н.

6. Інкубувати 1 год при 37 °С, після чого лунки тричі промити ФБ-Т.

7. В усі лунки, крім 1Е–1Н, внести по 100 мкл кон'югату у робочому розведенні у ФБ-Т.

8. Лунки 1Е–1Н заповнити промивочним буфером.

9. Інкубувати 1 год при 37 °С, планшет тричі промити.

10. В усі лунки внести по 100 мкл субстратної суміші, накрити планшет фольгою або чорним папером і стежити за розвитком кольорової реакції. У залежності від швидкості ферментативної реакції, яку контролюють візуально, інкубація триває 10–30 хв при кімнатній температурі.

11. Зупинити реакцію додаванням у кожен лунку 50 мкл розчину  $H_2SO_4$ .

12. За допомогою спектрофотометра виміряти оптичну щільність розчинів у лунках при довжині хвилі 492 нм.

13. Результати дослідження занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** За результатами вимірювання оптичної щільності (ОЩ) в ІФА-ридері обчислюють середні арифметичні ОЩ позитивного (2А–2Н) і негативного (3А, 4А–3Н, 4Н) контролів і порівнюють їх з ОЩ досліджуваних сироваток. У залежності від використовуваних в ІФА реагентів і на підставі попередніх дослідів позитивними (тобто містять специфічні антитіла) вважають сироватки, оптична щільність яких, наприклад, дорівнює або перевищує середнє арифметичне значення позитивного контролю, або перевищує середнє

арифметичне значення негативного контролю на 2–3 стандартних (середніх квадратичних) відхилення.



### **Завдання 1.2. За допомогою імуноферментного аналізу визначити у сироватці крові жуйних глікопротеїни, асоційовані з вагітністю**

**Мета роботи:** за допомогою імуноферментного аналізу (експрес-тесту IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test) виявити у сироватці крові жуйних глікопротеїни, асоційовані з вагітністю.

**Обладнання та матеріали:** досліджувані зразки (цільна кров, плазма або сироватка крові) корови, вівці чи кози, набір експрес-тесту IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test (планшети з лунками; набір реагентів, необхідних для проведення імуноферментного аналізу: позитивний та негативний контролю, детекторний розчин, кон'югат (специфічні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому), субстрат (3,3',5,5'-тетраметилбензидин), стоп-розчин, дистильована або деіонізована вода) та інструкція до його використання, піпетки, таймер, паперовий рушник, ФЕК.

**Принцип методу.** Метод базується на детекції в крові, плазмі чи сироватці крові жуйних (корів, овець, кіз) за допомогою імуноферментного аналізу фракції глікопротеїнів, асоційованих з вагітністю, які виробляються клітинами трофобласту плаценти. За наявності відповідні глікопротеїни досліджуваних зразків при внесенні в лунки планшету з'єднуються зі специфічними моноклональними антитілами, якими покриті стінки лунок планшету. Фіксовані на стінці лунок за допомогою специфічних моноклональних антитіл глікопротеїни виявляють за допомогою внесення в лунки кон'югату – специфічних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому. При цьому після інкубації вмістимого лунок та відмивання незв'язаного кон'югату в лунки додають субстрат – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, який катаболізується під впливом ферменту, що призводить до появи видимої неозброєним оком кольорової реакції.

#### **Хід роботи.**

1. Розмістити у планшеті лунки для позитивного та негативного контролю, а також для досліджуваних зразків.

2. У визначені лунки планшету внести відповідно по 100 мкл позитивного і негативного контролю, а також досліджуваних зразків крові (плазми, сироватки).

3. В кожену заповнену лунку планшету внести по 3 краплі детекторного розчину, вмістиме лунок змішати шляхом легкого похитування планшету і інкубувати протягом 7 хв за температури 18–26 °С.

4. Вмістиме лунок вилити у ємність для збору рідини та тричі промити дистильованою або деіонізованою водою. Залишки води видалити за допомогою паперового рушника.

5. В кожену заповнену лунку планшету внести по 3 краплі розчину кон'югату, вмістиме лунок змішати шляхом легкого похитування планшету і інкубувати протягом 7 хв за температури 18–26 °С.

6. Вмістиме лунок вилити у ємність для збору рідини та тричі промити дистильованою або деіонізованою водою. Залишки води видалити за допомогою паперового рушника.

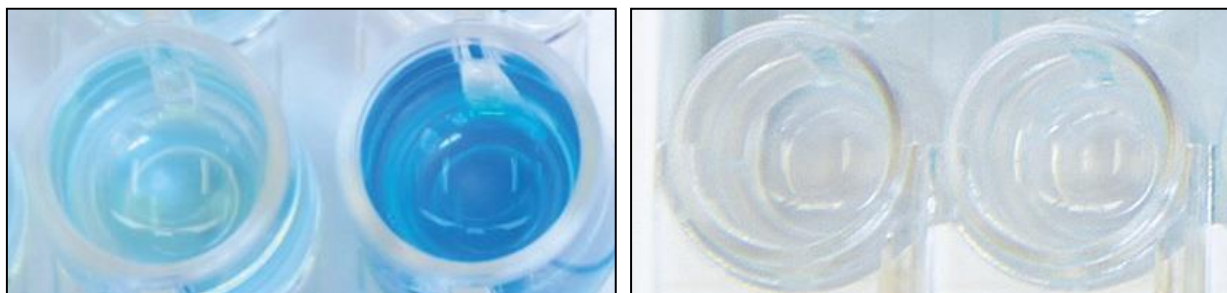
7. В кожену заповнену лунку планшету внести по 3 краплі розчину субстрату, вмістиме лунок змішати шляхом легкого похитування планшету, інкубувати протягом 7 хв за температури 18–26 °С, після чого в лунки додати по 3 краплі стоп-розчину.

8. Для якісної оцінки вмісту в досліджуваних зразках крові (плазмі, сироватці крові) глікопротеїнів, асоційованих з вагітністю, провести візуальну оцінку кольорової реакції (зміни кольору вмістимого) в кожній лунці та порівняти її з позитивним та негативним контролем.

9. Для кількісної оцінки вмісту в досліджуваних зразках крові (плазмі, сироватці крові) глікопротеїнів, асоційованих з вагітністю, визначити оптичну щільність вмістимого досліджуваних лунок при довжині хвилі 450 нм та порівняти її з оптичною щільністю позитивного та негативного контролів.

10. Результати дослідження занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** Обчислення результатів визначення у крові (плазмі, сироватці крові) жуйних глікопротеїнів, асоційованих з вагітністю, базується на візуальній оцінці кольорової реакції в кожній лунці та її порівнянні з позитивним та негативним контролем. При цьому зміна кольору субстрату до блакитного свідчить про наявність у досліджуваному зразку глікопротеїнів, а відсутність кольорової реакції – про відсутність (якісна оцінка) (рис. 3.10).



а

б

Рис. 3.10. Результати визначення у крові (плазмі, сироватці крові) жуйних глікопротеїнів, асоційованих з вагітністю: а – зміна кольору субстрату до блакитного; б – відсутність кольорової реакції

Кількісне визначення у сироватці крові жуйних глікопротеїнів, асоційованих з вагітністю, з використанням ФЕКу базується на оцінці оптичної щільності вмістимого досліджуваних лунок при довжині хвилі 450 нм та її порівнянні з оптичною щільністю позитивного і негативного контролів.



## САМОСТІЙНА РОБОТА



### Тема 5. РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ Й МЕТОДИ, ЗАСНОВАНІ НА РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ



#### Завдання 1. Розглянути механізм протікання реакції преципітації (імунодифузії) та її модифікації

**Мета роботи:** ознайомити студентів з механізмом протікання реакції преципітації (імунодифузії) та її модифікаціями.

**Обладнання та матеріали:** набори для проведення реакції преципітації, слайди, інші презентативні матеріали.

#### Теоретичні положення

Преципітація або осадження імунних комплексів відбувається внаслідок взаємодії антитіл з *розчинними антигенами* (токсини мікроорганізмів, екстракти тканин та органів, уражених збудником), в результаті чого відбувається їх агрегація, що проявляється помутнінням прозорих рідин або випаданням осаду (преципітату). Різні різновиди реакції преципітації проводять або в рідкому середовищі, або найчастіше в твердих гелях агару. Метод, заснований на реакції преципітації, також називається методом імунодифузії. Суть реакції полягає в тому, що антигени і антитіла, поміщені в різні лунки, вирізані в агаровому гелі, дифундують назустріч один одному і при взаємодії утворюють комплекси, які осідають у вигляді ліній преципітації. Даний метод використовується, наприклад, для діагностики інфекційного гепатиту у тварин.

У реакції преципітації, як і в аглютинації, кількість осаду (преципітату), що утворюється, визначається відносними пропорціями реагентів (рис. 3.11). При низьких концентраціях антигену, як і антитіл, явний осад не утворюється. Зі збільшенням кількості антигену утворюється більша кількість осаду, поки його кількість не досягне максимального значення. Однак із додаванням ще більшої кількості антигену кількість осаду поступово зменшується, оскільки співвідношення концентрації антитіл до антигену повинно бути оптимальним. Ця закономірність є результатом того факту, що антитіла

двовалентні і, отже, можуть перехресно зв'язувати лише два епітопи одночасно, але складні антигени, як правило, є полівалентними та мають багато епітопів.

Взаємодія розчинного антигену (преципітиногену) і антитіла (преципітину) в реакції преципітації відбувається в присутності електроліту (наприклад, 0,85 %-ого розчину натрію хлориду).

Реакція преципітації має високу чутливість і специфічність. Вона дає змогу виявити антиген у розведенні 1 : 1000000 і 1 : 10000000. У якості преципітиногенів можуть бути використані білки тваринного, рослинного і бактеріального походження: кров, сироватка крові, фільтрати культур мікроорганізмів або тканин, уражених ними.

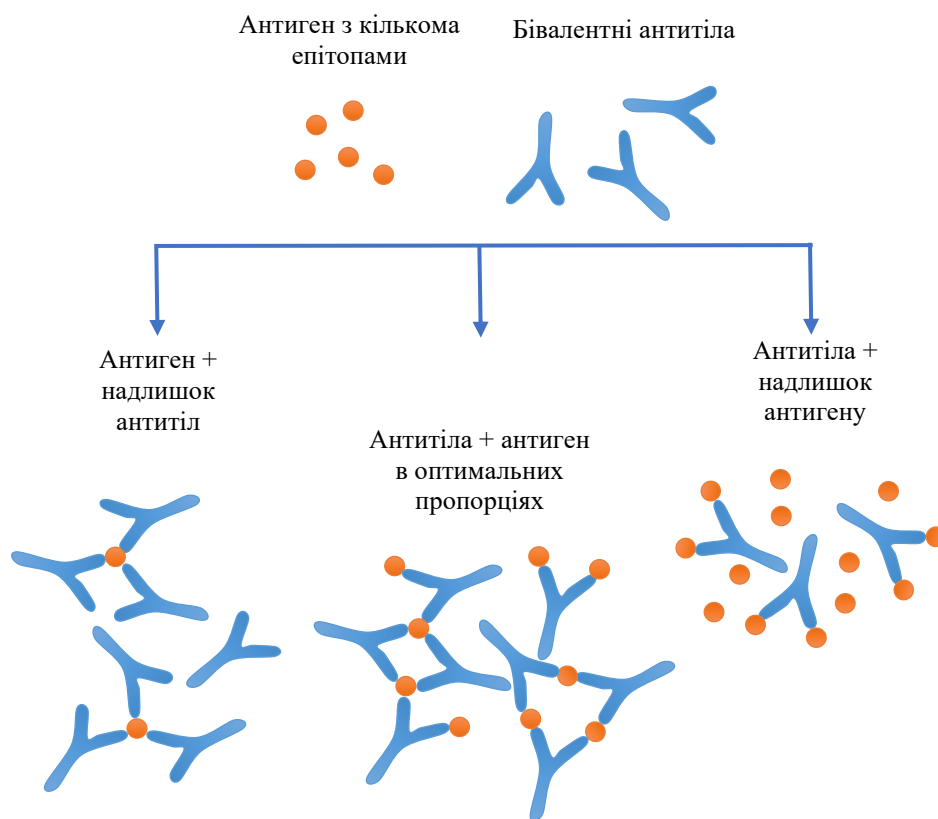


Рис. 3.11. Механізм імунопреципітації

Явище імунопреципітації в гелях широко використовується у цілому ряді важливих методик, що застосовуються для вивчення антитіл, а також для виявлення і кількісного визначення розчинних антигенів. Імунопреципітація заснована на дуже простому принципі. У товщі гелю існує водна фаза, через яку легко дифундує більшість макромолекул. Коли складний антиген переміщується у ділянку, що містить антитіла, то при оптимальному співвідношенні концентрацій взаємодіючих компонентів утворюються видимі лінії преципітації. Таким чином, феномен преципітації полягає в тому, що антитіла (преципітини), з'єднуючись із розчинними антигенами (преципітиногенами), зумовлюють утворення осаду (преципітату) або

помутніння розчину. За титр реакції приймають найбільше розведення антигена, яке дає позитивний результат. Реакцію зазвичай проводять у розташованих горизонтально тонких шарах агарового гелю на скляних підкладках. Імунодифузія антигену в агаровому гелі, що містить антитіла (або антиген), що приводить до утворення ліній чи кілець преципітації, їх товщини або діаметр пропорційний концентрації антигену (антитіл). Існують різні модифікації методу імунодифузії.

**Проста імунодифузія (реакція Удена).** Агаровий гель, змішаний з преципітуючою сироваткою, поміщають у вузькі пробірки і зверху нашаровують розчин антигену. Дифундуючи у гель, антиген зв'язується з відповідними антитілами, утворюючи мутні лінії преципітації.

**Подвійна імунодифузія за Оклі і Фулторпом.** На відміну від попереднього методу, у подвійній імунодифузії реагенти розділені шаром нейтрального гелю, який не містить реагентів. На поверхню гелю, змішаного із специфічною сироваткою, вносять шар нейтрального гелю, після застигання якого нашаровують антиген. Дифундуючи назустріч один одному, антиген і антитіла зустрічаються у шарі нейтрального гелю та утворюють лінії преципітації.

**Проста радіальна імунодифузія за Манчіні** (рис. 3.12). Метод використовують в основному для кількісного визначення антигенів. Найчастіше досліджують білкові антигени, наприклад, білки сироватки крові, цереброспінальної рідини, секретів залоз, екстрактів із органів тощо.

Кільця преципітації, які свідчать про позитивний результат простої радіальної імунодифузії за Манчіні

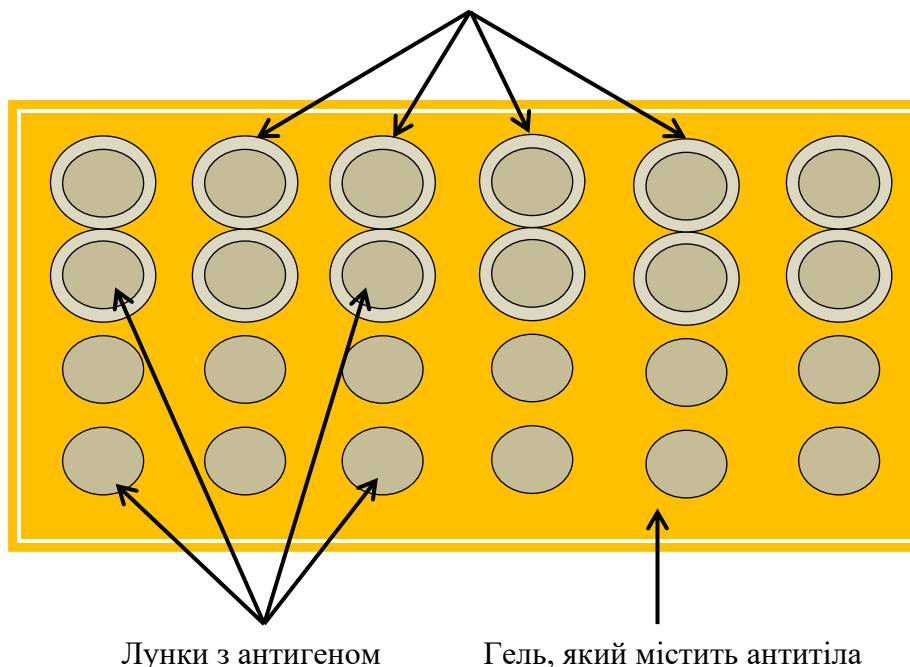


Рис. 3.12. Схематичне зображення простої радіальної імунодифузії за Манчіні

На рівну поверхню рівномірним шаром наносять гель, який містить антитіла. У гелі вирізають лунки і заповнюють їх розчином антигену. Молекули антигену радіально дифундують з лунки і, зустрівшись з антитілами, утворюють кільце преципітації.

До тих пір, поки в лунці зберігається надлишок антигенів, діаметр кільця преципітації поступово збільшується. Вимірюють діаметр утворених преципітуючих кілець та інтерпретують дані стосовно кількості антигену, який міститься у досліджуваній рідині.

**Подвійна радіальна імунодифузія за Ухтерлоні (рис. 3.13).** У шарі агарового гелю рівномірної товщини на певній відстані один від одного вирізають лунки для антигену і антисироватки, після чого заповнюють їх відповідними реагентами. Антигени і антитіла дифундують в гель, з'єднуючись один з одним, і утворюють імунні комплекси, які преципітують у лунках гелю, стаючи видимими у вигляді ліній преципітації.

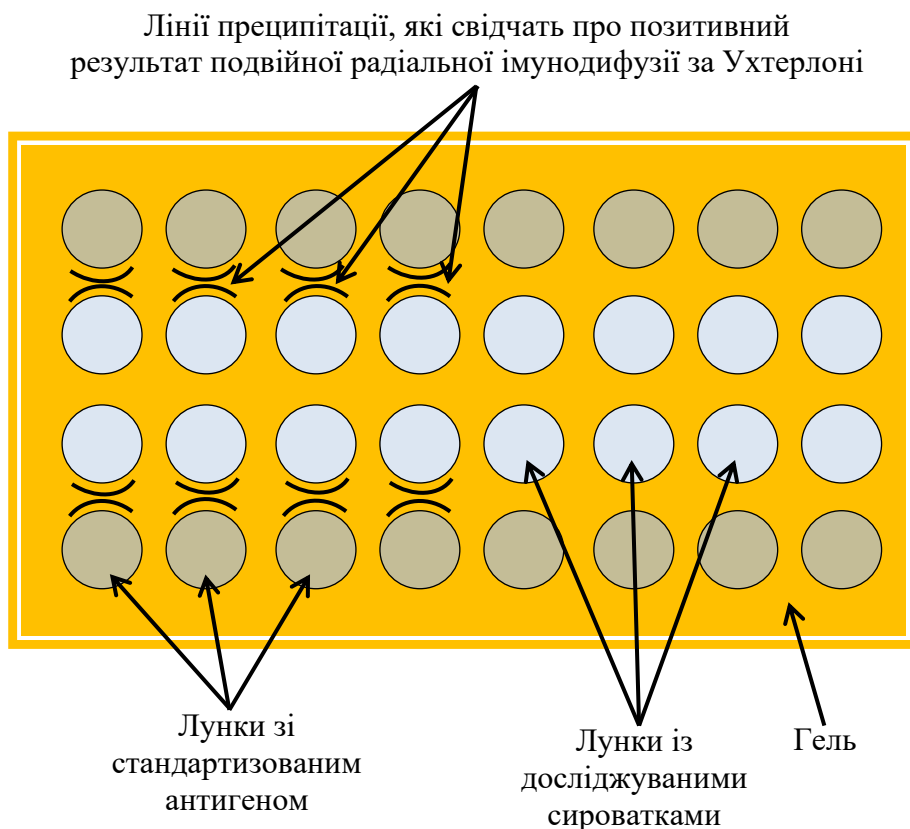


Рис. 3.13. Схематичне зображення простої радіальної імунодифузії за Ухтерлоні

Подвійну радіальну імунодифузію застосовують головним чином для якісного аналізу, наприклад, для визначення наявності антигенів у різних рідинах (у сироватці крові, цереброспінальній рідині тощо), для оцінки чистоти препаратів при виділенні антигенів, для порівняння відомих антигенів і антитіл з невідомими, а також з метою спостереження за перебігом імунізації тварин.

## **Підготовка інгредієнтів для проведення реакції імунодифузії.**

**Приготування гелю.** Найчастіше в якості гелеутворюючих агентів застосовують агар або агарозу. Готувати агар бажано тільки для одного експерименту або, в крайньому випадку, для декількох дослідів, оскільки багатократне розігрівання перед кожним дослідженням призводить до випаровування рідини і зміни концентрації та фізико-хімічних властивостей агару.

Відважують певну кількість агару, переносять його в колбу і додають необхідний об'єм фізіологічного розчину NaCl або буферу. Колбу з сумішшю ставлять у киплячу водяну баню до повного розчинення агару. Потім у розчин додають один з консервантів для запобігання росту мікроорганізмів, наприклад 0,01–0,05 %-ий розчин азиду натрію ( $\text{NaN}_3$ ), 0,1 %-ий розчин фенолу. Необхідно стежити за тим, щоб агар був не тільки стерильним, але і максимально прозорим. Він не повинен містити сторонніх механічних домішок, особливо ворсинок від марлі чи вати. Для поліпшення формування імунопреципітату іноді додають 2–4 %-ий розчин поліетіленгліколю або декстрини.

**Підготовка скельця і заливка агару.** Імунодифузії проводять на скельцях, найчастіше предметних, або на відмитих від емульсії фотопластинах. Знежирені скельця бажано покрити тонким шаром 1%-го водного розчину агару і висушити за кімнатної температури або за температури 70 °С. До таких скельця добре прилягає дифузійний гель. Для отримання однакової товщини агару скельця поміщують на горизонтальну поверхню. Залиті агаром скельця поміщують у вологу камеру, наприклад, у ексикатор, на дно якого наливають воду з антисептиком. Скельця можна помістити у ексикатор у вологій чашці Петрі.

**Підготовка лунок.** Для прорізування лунок у агарі застосовують стандартні штампи, що складаються з трубок-пробійників. Залежно від поставленого завдання, використовують штампи, що містять 4, 5 або 7 трубок-пробійників. Зовнішні діаметри трубок можуть варіювати від 3 до 5 мм. Для постановки імунодифузії за Манчіні використовують окремі трубки-пробійники або ін'єкційні голки зі сточеним кінцем. У цьому випадку під скельце з агаром кладуть трафарет і пробійником прорізають контури лунок. Агарові пробки відсмоктують за допомогою вакуумного насоса.

**Вимоги до температури для проведення імунодифузії.** Результати імунодифузії істотно не залежать від температури. Реакція може бути проведена за температури 4, 20 або 37 °С. Зручніше за все працювати за кімнатної температури (20 °С).

**Вимоги до електролітів.** У якості електролітів використовують 0,15 М NaCl або фосфатний, або барбіталовий буфер.

**Вимоги до постановки реакції.** Для того щоб уникнути підсихання агару, дослідження на одному склі повинно бути поставлене у максимально короткий термін (10–15 хв). В лунки, в залежності від їх діаметра, вміщується від 2 до 40 мкл розчину реагенту. При заповненні лунок доверху рідина не повинна

переливатися через край. Відразу ж після заповнення лунок реагентами скельця переносять у ексікатор. Імунодифузія може тривати від 2 до 7 діб.

У ветеринарній медицині феномен імунопреципітації використовується для діагностики лейкозу, бруцельозу та інфекційного епідидиміту великої рогатої худоби, міксоматозу кролів тощо.

*По завершенню ознайомлення з механізмом протікання реакції преципітації (імунодифузії) та її модифікаціями схематичні зображення протікання реакцій відобразити у протоколі заняття.*



### **Завдання 1.1. Визначити кількість антигену у сироватці крові тварин за методом Манчіні**

**Мета роботи:** визначити кількість антигену у сироватці крові тварин за методом Манчіні.

**Обладнання та матеріали:** досліджувані сироватки крові тварин, стандартні розчини антигену, моноспецифічна антисироватка, 3%-й Васто-агар на фізіологічному розчині, чисті предметні скельця, нівелірний столик, волога камера, вимірювальний інструмент (точність до 0,1 мм), піпетки, які дозволяють дозувати об'єми від 1 до 10 мкл, пробійник з внутрішнім діаметром 2 мм, водяна баня, калібровочний графік.

#### **Хід роботи.**

1. Приготувати розчин антисироватки, яка знаходиться у ліофілізованому стані у ампулах (робочий титр вказаний на ампулі, наприклад, 1:20). Необхідно приготувати половинні розведення антисироватки на фізіологічному розчині (наприклад, 1:10), оскільки в подальшому вона буде змішуватися у співвідношенні 1:1 з розплавленим агаром і її кінцевий титр буде відповідати вказаному на ампулі.

2. Помістити флакон з агаром на фізіологічному розчині у водяну баню за температури 50 °С та розплавити.

3. Помістити антисироватку з половинним титром у водяну баню при температурі 50 °С.

4. Нагрівають нівелірний столик і предметні скельця, щоб шар агару з антисироваткою рівномірно розподілився по поверхні скла. Підігрівають також піпетки.

5. Змішати 1 мл 3%-го агару з 1 мл антисироватки, у якій концентрація антитіл вдвічі перевищує її робочий титр, зазначений на ампулі, у співвідношенні 1:1, (підтримувати температуру 50 °С). Вилити суміш на предметне скло, яке знаходиться на нівелірному столику. Після застигання

протягом 10 хв 2 мл робочого гелю утворюють на предметному склі шар товщиною 2 мм.

6. У шарі агару пробійником вирізати лунки діаметром 2 мм на відстані 15 мм одна від одної. Таким чином на склі зробити кілька рядів лунок.

7. У лунки одного ряду внести за допомогою піпетки 2 мкл нерозведеного стандартного розчину антигену, а також його розведення 1:2; 1:4; 1:8 і т.д. Лунки іншого ряду заповнити досліджуваними сироватками.

8. Пластини інкубувати у вологій камері протягом 24–48 год.

9. По закінченні інкубації виміряти діаметри кілець преципітації і за калібровочною кривою визначити концентрацію антигену.

10. Результати розрахунків занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.



### **Завдання 1.2. Визначити наявність антигену у сироватці крові тварин за методом Оухтерлоні**

**Мета роботи:** визначити наявність антигену у сироватці крові тварин за методом Оухтерлоні.

**Обладнання та матеріали:** досліджувані сироватки крові тварин, стандартні розчини антигену, 1,5 %-й Васто-агар на фізіологічному розчині, фізіологічний розчин (0,15 М NaCl), предметні скельця, нівелірний столик, волога камера, вимірювальний інструмент, піпетки, які дозволяють дозувати об'єми від 1 до 40 мкл, пробійник з внутрішнім діаметром 4 мм, водяна баня.

#### **Хід роботи.**

1. Помістити флакон з агаром на фізіологічному розчині у водяну баню при температурі 50 °С та розплавити.

2. Встановити нівелірний столик у горизонтальному положенні і злегка нагріти його поверхню.

3. Помістити на нівелірний столик предметні скельця та дочекатися доки вони нагріються.

4. Розплавлений агаровий гель розлити по 2 мл на предметні скельця. Як тільки агар затвердіє – пластинки готові до використання. Для посилення зчеплення гелю з поверхнею скла предметні скельця попередньо можна покрити 1%-им водним розчином агару.

5. У агарі, який розлитий тонким шаром на предметних скельцях, за допомогою штампку зробити круглі лунки на однаковій відстані одна від одної (4–10 мм).

6. У один ряд лунок внести досліджувану сироватку, у інший – розчин антигену у різних розведеннях або різні антигени. Приготувати розведення антигену слід наступним чином:

- ✓ відібрати піпеткою 40 мкл вихідного розчину антигену і помістити у першу лунку на планшеті;
- ✓ в інші п'ять лунок внести по 20 мкл фізіологічного розчину; приготувати послідовні дворазові розведення, переносячи по 20 мкл розчину антигену з однієї лунки у іншу за допомогою автоматичної піпетки, кожен раз добре перемішуючи знову отримане розведення.

7. Пластини інкубувати у вологій камері протягом 24–48 год при кімнатній температурі.

8. По закінченні інкубації виявити наявність чи відсутність ліній преципітації між лунками з досліджуваною сироваткою та розчином антигену.

9. Результати роботи занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.



## **Тема 6. РЕАКЦІЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ. ІМУНОХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ**



### **Завдання 1. Розглянути механізм протікання реакції зв'язування комплексу за діагностики хвороб тварин**

**Мета роботи:** ознайомити з механізмом протікання реакції зв'язування комплексу за діагностики хвороб тварин.

**Обладнання та матеріали:** набори для проведення реакції зв'язування комплексу, слайди, інші презентативні матеріали.

#### **Теоретичні положення**

Специфічна взаємодія антитіла і антигену супроводжується адсорбцією до утвореного імунного комплексу комплексу. У зв'язку з тим, що процес адсорбції комплексу комплексом антиген-антитіло не можна спостерігати візуально, як індикатор у цю реакцію введена гемолітична система, яка складається із суспензії еритроцитів і відповідної гемолітичної сироватки, за допомогою якої виявляють зв'язування комплексу.

Цю реакцію в основному застосовують для виявлення антитіл у сироватці крові хворих тварин при бактеріальних, вірусних, протозойних інфекціях (бруцельозі, лістеріозі, сапі тощо). Реакція зв'язування комплексу відноситься до складних серологічних реакцій, у яких, крім антигену, антитіла і комплексу, бере участь ще й гемолітична система, яка виявляє результати реакції.

Для постановки реакції зв'язування комплексу необхідні: сироватка крові тварини, комплекс, гемолітична система, а також ізотонічний розчин хлориду натрію. Реакцію ставлять у серологічних пробірках.

Гемолітична система складається з еритроцитів барана, які отримують з дефібринованої крові барана шляхом триразового відмивання ізотонічним розчином хлориду натрію, і гемолітичної сироватки, отриманої шляхом імунізації лабораторних тварин баранячими еритроцитами. Еритроцити сенсibilізують, приєднуючи до них сироватку при температурі 37 °С. Протягом 30 хв сенсibilізації утворюється комплекс антиген-антитіло, де в якості антигену виступають еритроцити, а в якості антитіла – гемолізину. Лізис сенсibilізованих еритроцитів барана настає тільки у разі приєднання до гемолітичної системи комплементу (активованій комплемент утворює мембраноатакуючий комплекс, який пошкоджує мембрану еритроцитів). При його відсутності лізис еритроцитів не відбувається. Гемолітичну сироватку випускають у готовому вигляді у ампулах, на етикетці яких зазначений її титр, тобто максимальне розведення сироватки, яке ще викликає гемоліз при додаванні до еритроцитів у присутності комплементу.

При постановці реакції сироватку використовують у потрібному титрі. Наприклад, якщо титр гемолітичної сироватки становить 1 : 1200, то титр сироватки в робочому розведенні має бути 1 : 400. У якості комплементу використовують свіжу сироватку крові морської свинки (протягом 24–48 год після отримання) або сухий комплемент у ампулах. Попередньо перед постановкою реакції комплемент розводять у співвідношенні 1:10 і титрують для встановлення титру – найбільшого розведення комплементу, яке дає гемоліз еритроцитів при з'єднанні з гемолітичною системою, яка використовується у даній реакції.

Антигеном для реакції зв'язування комплементу є суспензії убитих бактерій, екстракти, приготовані з цих суспензій, окремі хімічні фракції мікробів. Основна вимога до антигену – відсутність пригнічення активності комплементу. Він не повинен володіти антикомплементами властивостями. Для виявлення цих властивостей антигену комплемент додатково титрують у присутності використовуваного в реакції антигену.

Реакція зв'язування комплементу відбувається у дві фази: у першій фазі відбувається взаємодія антигену з антитілом за участю комплементу; у другій – виявляється ступінь зв'язування комплементу за допомогою гемолітичної системи (рис. 3.14). Результати реакції зв'язування комплементу залежать від наявності у досліджуваній сироватці антитіл. Якщо досліджувана сироватка крові тварини містить антитіла, гомологічні стандартному антигену, використовуваному у реакції, то утворюється комплекс антиген-антитіло (рис. 3.14, а), який приєднує комплемент (рис. 3.14, б). При додаванні гемолітичної системи в цьому випадку гемолізу не відбудеться (рис. 3.14, в), оскільки весь комплемент витрачається на специфічний зв'язок з комплексом антиген-антитіло.

Таким чином, відсутність гемолізу у реакції зв'язування комплементу свідчить про її позитивний результат (досліджувана тварина – хвора). При цьому, неушкоджені еритроцити є візуальним свідченням того, що комплемент, доданий в процесі постановки реакції, був адсорбований комплексом, утвореним стандартизованим антигеном та антитілами досліджуваної сироватки крові.



По завершенню ознайомлення з механізмом протікання реакції зв'язування комплементу за діагностики хвороб тварин схематичні зображення протікання реакції відобразити у протоколі заняття.

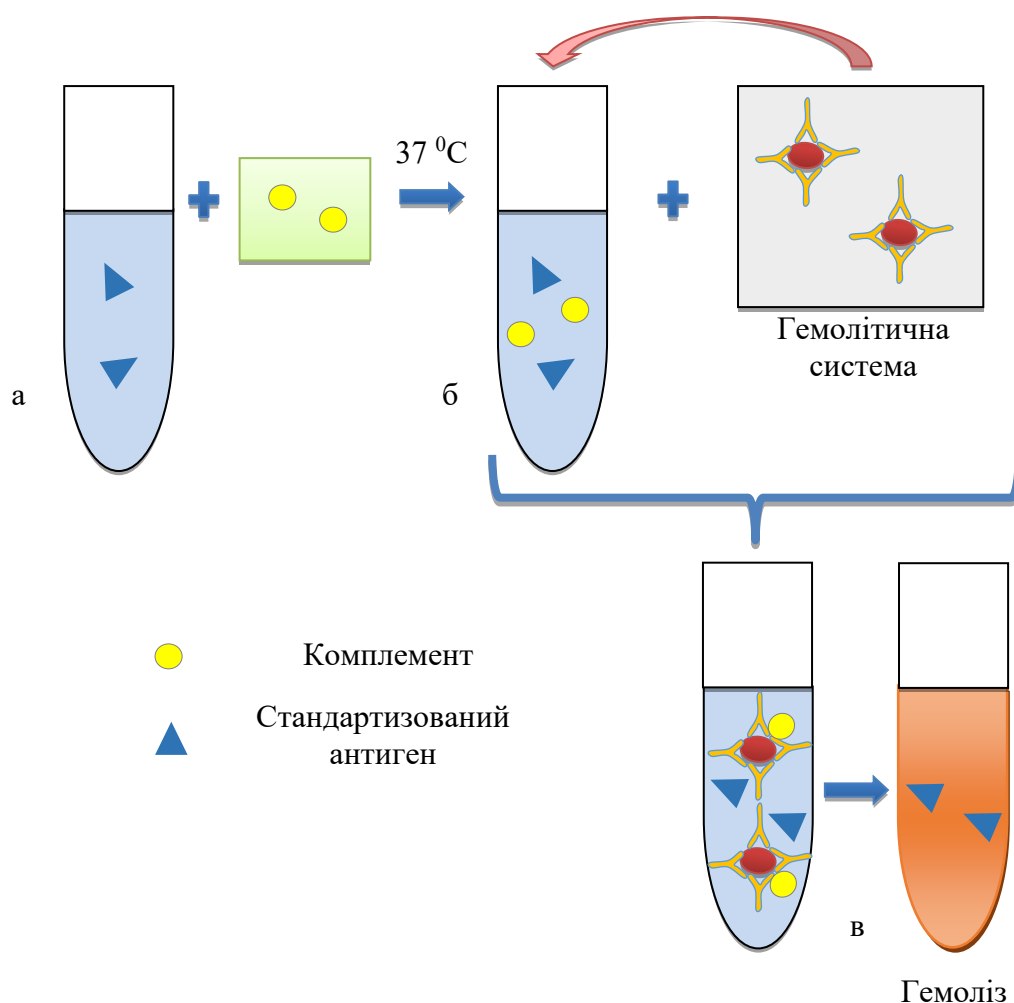


Рис. 3.15. Схематичне зображення перебігу реакції зв'язування комплементу з негативним результатом



**Завдання 1.1. Визначити наявність антитіл у сироватці крові тварин за допомогою реакції зв'язування комплементу**

**Мета роботи:** визначити наявність антитіл у сироватці крові тварин за допомогою реакції зв'язування комплементу.

**Обладнання та матеріали:** планшети для мікротитрування, водяна баня, піпетки на 10–100 мкл, сухий комплемент, гемолізін, 3 %-ва суспензія еритроців барана, інактивована досліджувана сироватка крові тварин, позитивна сироватка тварин, фізіологічний розчин, стерильні пластикові або скляні пробірки, піпетки, центрифуга.

### **Хід роботи.**

1. Відтитрувати гемолізін.
2. Відтитрувати комплемент.
3. Відтитрувати стандартний антиген.
4. У перший ряд лунок планшету внести послідовні розведення досліджуваної сироватки. У лунки другого ряду внести по 0,025 мл негативної сироватки тварин (негативний контроль). У лунки третього ряду внести 0,025 мл позитивної сироватки тварин (позитивний контроль).
5. У лунки першого, другого і третього рядів внести по 0,025 мл оптимального розведення стандартного антигену.
6. У лунки всіх рядів додати по 0,025 мл титрованого комплементу та інкубувати протягом 1 год за температури 37 °С.
7. У кожен лунку додати по 0,025 мл сенсibiliзованих еритроцитів, злегка перемішати та інкубувати протягом 1 год за температури 37 °С.
8. Провести облік реакції.
9. Результати обліку реакції занести до протоколу заняття та зробити висновок. Результати реакції можуть бути враховані лише у тому випадку, якщо у другому ряді лунок відбувся гемоліз еритроцитів, а у третьому – не відбувся гемоліз еритроцитів гемолітичної системи.

**Інтерпретація.** Відсутність гемолізу у лунках з досліджуваною сироваткою крові свідчить про те, що тварина хвора. Гемоліз еритроцитів характеризує негативний результат реакції та свідчить, що досліджувана тварина здорова.



### **Завдання 2. Визначити наявність вірусу панлейкопенії у біологічних рідинах кошенят з використанням експрес-тесту**

**Мета роботи:** за допомогою швидкого тесту для діагностики панлейкопенії котів визначити наявність вірусного антигену у фекальних чи блювотних масах кошенят.

**Обладнання та матеріали:** кошенята з підозрою на панлейкопенію (з ознаками розладів шлунково-кишкового тракту), набір компонентів швидкого тесту для діагностики панлейкопенії котів (тест-касета, піпетка, пробірка з буферним розчином, зонд для забору зразка) з інструкцією до використання.

**Принцип роботи тесту.** Основою роботи тесту є імунохроматографічний аналіз, який заснований на реакції між антигеном і відповідним йому антитілом в біологічних матеріалах (сеча, цільна кров, сироватка або плазма крові, слина, фекалії тощо). Даний вид аналізу здійснюється переважно за допомогою індикаторних тест-касет, які забезпечують швидкість проведення тестування. Тест-касета в цих тестах являє собою нітроцелюлозну мембрану, заправлену у пластикову касету, на якій позначені: місце внесення зразка для дослідження

(S), місце появи результатів специфічного тесту (T), місце розташування контрольної смуги (C), назва маркеру, для виявлення якого розроблений даний швидкий тест.

Імунохроматографічний аналіз часто позначається в літературі також як стрип-тест, QuikStrip cassette, QuikStrip dipstick, експрес-тест або експрес-аналіз, що пов'язано зі швидкістю проведення цього методу дослідження. Результати визначаються візуально в період від 3 до 20 хвилин.

У тестах, заснованих на принципі імунохроматографічного аналізу, використовуються три типи антитіл:

1. «Рухомі» моноклональні антитіла, специфічні до досліджуваного антигену, кон'юговані з колоїдним золотом – барвником, який можна легко ідентифікувати навіть в найменших концентраціях. Ці антитіла нанесені поблизу ділянки внесення у тест-смужки біологічної рідини (сечі, крові, буферного розчину з вмістом антигену тощо).

2. Поліклональні антитіла, специфічні до досліджуваного антигену, іммобілізовані в тест-зоні смужки, яка позначається літерою «Т».

3. Вторинні антитіла, специфічні до моноклональних антитіл, іммобілізовані в контрольній зоні тест-смужки, яка позначається літерою «С» (рис. 3.16, 3.17).

В основі імунохроматографічного аналізу лежить специфічна взаємодія антигенів і антитіл на хроматографічній мембрані після змочування її рідиною досліджуваного зразка або буферним розчином з вмістом антигену. Така взаємодія відбувається внаслідок дифузного переміщення забарвленого колоїдним золотом індикаторного імуного компонента (моноклональних антитіл), який заздалегідь нанесений на мембрану, та антигенів досліджуваного зразка після нанесення останнього на мембрану, у сторону тест-смужок. Таким чином, попередньо жорстко сорбовані необхідні відомі компоненти додаткових імунологічних реакцій, які дозволяють сконцентрувати барвник у вигляді забарвленої смуги, необхідні для візуального виявлення специфічної імуної реакції в певній зоні-смугі хроматографічної мембрани.

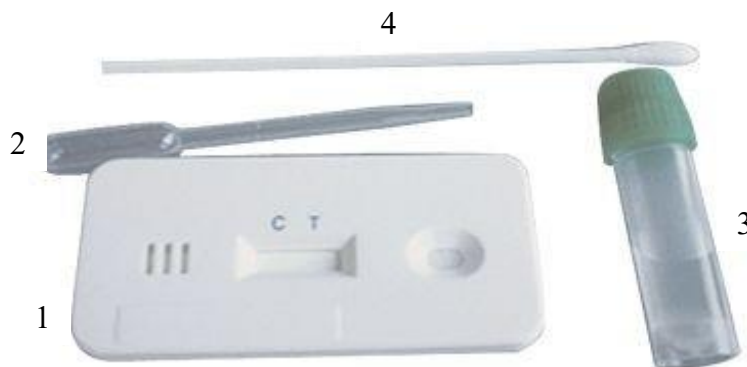


Рис. 3.16. Набір швидкого тесту для діагностики панлейкопенії котів: 1 – тест-кассета, 2 – піпетка, 3 – пробірка з буферним розчином, 4 – зонд для забору зразка

### Хід роботи.

1. Провести за допомогою зонда забір зразка блювотних мас або фекалій з анального отвору кошеняти або із землі.
2. Занурити просочений зразком зонд у пробірку з буферним розчином. Струсити пробірку для кращого розчинення зразка.
3. Вийняти тест-касету з упаковки і покласти її на горизонтальну поверхню.
4. Додати 3 краплі розведеного зразка в лунку для зразка на касеті.
5. Провести облік реакції результатів тестування в межах 5–10 хвилин, звертаючи увагу на наявність чи відсутність забарвлених тест-смужок.
6. Результати обліку реакції занести до протоколу заняття та зробити висновок.

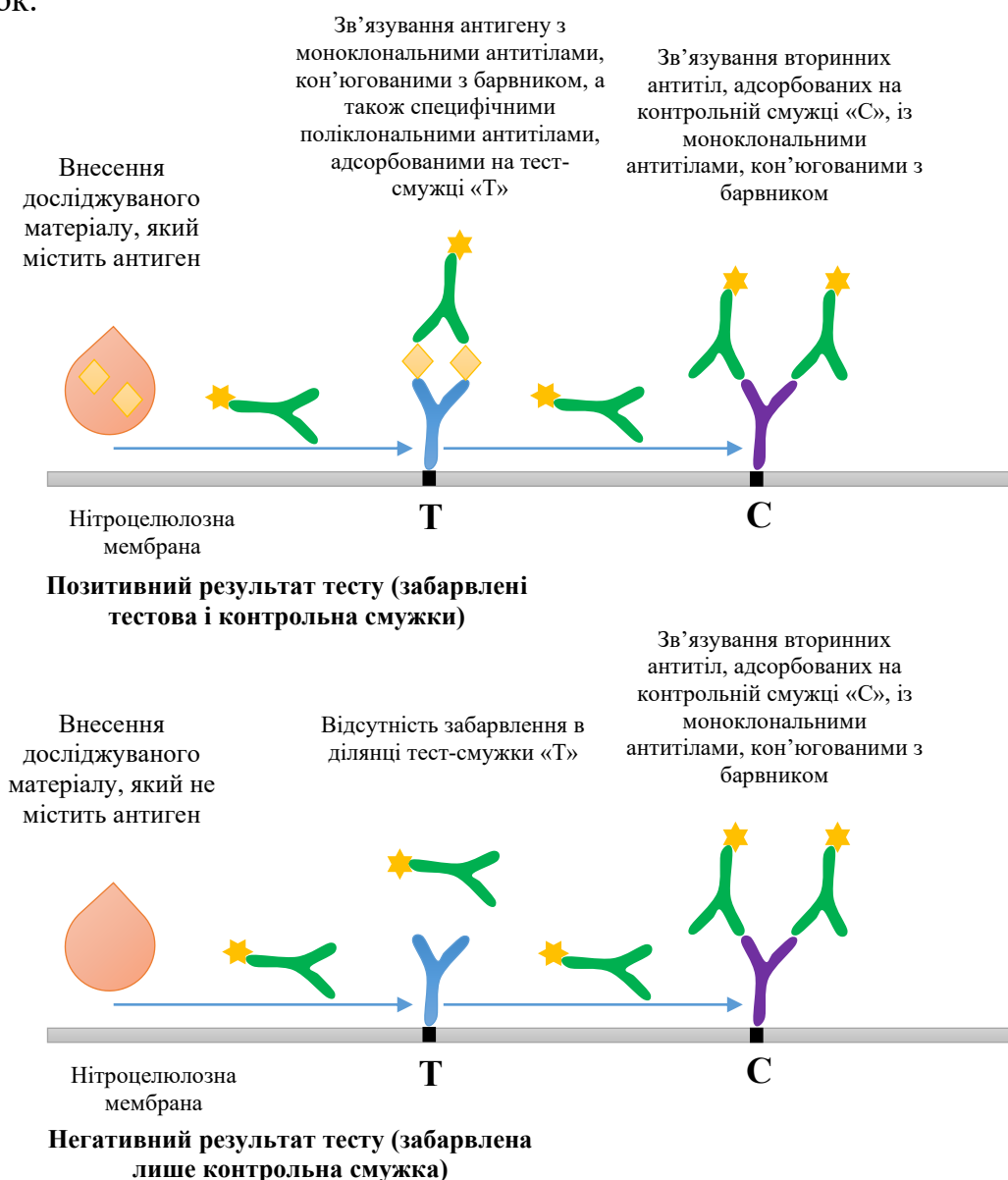


Рис. 3.17. Принцип проведення імунохроматографічного аналізу з використанням експрес-тесту та інтерпретація результатів його проведення

**Інтерпретація.** Введений у тест-систему «з надлишком» індикаторний забарвлений імунний компонент (моноклональні антитіла) дифундує по хроматографічній мембрані далі від місця прояву специфічної імунної реакції і зупиняється у контрольній смужі внаслідок імунологічної взаємодії з жорстко іммобілізованим там імунним компонентом відомої специфічності – вторинними антитілами до моноклональних антитіл (3.17). Забарвлення контрольної смуги, яка позначається літерою «С», свідчить про те, що дослідження було проведене коректно. За наявності у досліджуваному зразку специфічного антигену, останній з'єднується як з моноклональними антитілами, так і з специфічними поліклональними антитілами у тест-зоні смужки, яка позначається літерою «Т», та візуалізується.



### **Завдання 3. Визначити наявність вірусу імунодефіциту та лейкемії у котів з використанням експрес-тесту**

**Мета роботи:** за допомогою швидкого тесту для діагностики імунодефіциту та лейкемії котів визначити наявність вірусних антигенів у крові котів.

**Обладнання та матеріали:** коти з підозрою на вірусний імунодефіцит чи/та лейкемію, набір компонентів швидкого тесту для діагностики імунодефіциту та лейкемії котів (тест-касета, піпетка, пробірка з буферним розчином) з інструкцією до використання.

#### **Хід роботи.**

1. За допомогою стерильної голки та шприца провести забір зразка крові, сироватки або плазми.
2. Вийняти тест-касету з упаковки і покласти її на горизонтальну поверхню.
3. В лунки для зразків тест-касети додати по одній краплі досліджуваного зразка та відразу ж додати туди по 2–3 краплі буферного розчину.
4. Провести облік реакції результатів тестування в межах 5–10 хвилин, звертаючи увагу на наявність чи відсутність забарвлених тест-смужок.
5. Результати обліку реакції занести до протоколу заняття та зробити висновок.

**Інтерпретація.** Одночасна візуалізація тест-смужок, які позначаються літерами «Т» і «С», свідчать про коректність проведення аналізу та наявність антигену у досліджуваному зразку. Візуалізація лише тест-смужки, яка позначається літерою «С», свідчить про коректність проведення аналізу та те, що у досліджуваному зразку антиген відсутній. Відсутність візуалізації тест-смужки, яка позначається літерою «С», за одночасної візуалізації тест-смужки,

яка позначається літерою «Т» чи без її візуалізації, свідчить про некоректність проведення аналізу.



## **Тема 7. МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ ХВОРОБ, ЯКІ ПРОТІКАЮТЬ ЗА ПРИНЦИПОМ АЛЕРГІЧНИХ РЕАКЦІЙ**





### **Теоретичні положення**

Під алергією розуміють змінену, підвищену чутливість організму до повторного потрапляння у нього чужорідних речовин – алергенів. Умовно виділяють дві групи алергенів: алергени зовнішнього середовища (екзоалергени) і алергени, що утворюються у самому організмі (ендоалергени). У якості алергенів можуть бути слина кровосисних паразитів і комах, речовини навколишнього середовища (цвіль, пилок, домашній пил), кутикулярні виділення гельмінтів, продукти життєдіяльності інфекційної мікрофлори, лікарські препарати, побутова хімія та косметичні засоби, епідермальні агенти (шерсть, лупа), залозисті секрети (наприклад, які утворюються при запаленні перианальних залоз), компоненти їжі (м'ясо птиці, риби, яєць, молока тощо), аутоалергени (при аутоімунних захворюваннях). У організм тварин алергени проникають переважно перкутанно, через дихальні шляхи та шлунково-кишковий тракт.

Існує дві основні класифікації алергічних реакцій: за швидкістю розвитку (класифікація Кука) та за патогенезом (класифікація Кумбса і Джелла).

За класифікацією Кука алергічні реакції поділяються на дві групи – *негайного* і *сповільненого* типу. Реакції першої групи виникають, як правило, від кількох хвилин до кількох годин після повторного контакту організму тварини з алергеном. Для максимального прояву реакцій другої групи потрібен довший час – дві-три доби.

Серед класифікацій реакцій гіперчутливості загальноприйнятою є класифікація згідно патогенезу, запропонована Кумбсом і Джелом у 1963 році, згідно якої усі алергічні реакції ділять на чотири типи:

-  **I тип** (реакції негайного типу; реагіновий, анафілактичний, atopічний тип);
-  **II тип** (цитотоксичний тип);
-  **III тип** (реакції типу феномена Артюса; імунокомплексний тип);
-  **IV тип** (алергічні реакції сповільненого типу; гіперчутливість сповільненого типу).

Анафілактичні, цитотоксичні і імунокомплексні реакції відносяться до реакцій негайного типу, реакції гіперчутливості сповільненого типу – до сповільнених.

Перше потрапляння алергену в організм тварини викликає розвиток сенсibiliзації – імунологічно опосередкованого підвищення чутливості

організму до алергену, обумовленого виробленням специфічних антитіл або продукцією специфічних сенсibilізованих Т-лімфоцитів (активна сенсibilізація). Пасивну сенсibilізацію можна викликати шляхом передачі стану сенсibilізації тварині через антитіла або Т-лімфоцити, що знаходяться в сироватці крові або інших рідинах (ексудат, сеча та ін.) сенсibilізованої тварини. У зв'язку з цим, деякі автори також виділяють гуморальний (В-залежний) і клітинний (Т-залежний) типи алергічних реакцій.

Таким чином, в основі розвитку алергічних реакцій лежать імунологічні механізми.

У патогенезі алергічних реакцій виділяють три стадії:

1. *Імунологічну* – у ході якої відбувається вироблення і накопичення специфічних антитіл і з'єднання їх з повторно проникнувшими або персистуючими в організмі алергенами. Ця стадія розпочинається з моменту першого потрапляння алергену, його захоплення антигенпрезентуючою клітиною та презентації антигенних пептидів наївним Т-лімфоцитам-хелперам, які диференціюються у Т-лімфоцити-хелпери I або II типу та стимулюють утворення специфічних Т-цитотоксичних лімфоцитів або антитіл.

Важливу роль у реалізації імунологічної стадії алергічних реакцій (особливо I типу) відіграє ІЛ-4, продукований активованими Т-лімфоцитами-хелперами II типу, який не лише підсилює проліферацію В-лімфоцитів, а й підвищує експресію рецептора (FcεR) до Fc-фрагменту IgE на базофілах і тучних клітинах.

Розвиток сенсibilізації закінчується при повторному потрапленні алергену з утворенням на клітинах-мішенях, які адсорбували на собі специфічні по відношенню до алергена антитіла (переважно імуноглобуліни класу E і G), комплекси антиген-антитіло. Даний механізм розвитку імунологічної стадії характеризує алергічні реакції I, II і III типів.

У патогенезі імунологічної стадії алергічних реакцій IV типу приймають участь не антитіла, а Т-лімфоцити. Під час першого потрапляння антигена, його захоплення антигенпрезентуючими клітинами та презентації Т-лімфоцитам-хелперам і Т-цитотоксичним лімфоцитам – останні сенсibilізуються. Під час повторного потрапляння антиген з'єднується з рецепторами сенсibilізованих Т-лімфоцитів, внаслідок чого вони зазнають морфологічної і біохімічної перебудови та набувають здатності продукувати лімфокіни, які стимулюють інші імунокомпетентні клітини до міграції у зону зосередження алергену (патобіохімічна стадія IV типу алергічних реакцій).

2. *Патобіохімічну* – яка характеризується утворенням і вивільненням у ході імунної реакції клітинами-мішенями біологічно активних речовин (гістаміну, серотоніну, еозинофільних хемотаксичних чинників еозинофілів і нейтрофілів, гепарину, протеаз, лейкотрієнів, тромбоцитаривуючих чинників, простагландинів, ІЛ-1, ІЛ-3, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6 тощо).

3. *Патофізіологічну* – яка є стадією клінічних проявів патогенної дії утворених медіаторів на клітини, органи і тканини організму.



## **Завдання 1. Вивчити особливості перебігу анафілаксії у морських свинок**

### **Теоретичні положення**

Анафілаксія (анафілактичний шок) – системна алергічна реакція негайного типу, яка виникає у результаті підвищеної і якісно зміненої чутливості організму до повторного *парентерального* введення алергену та є наслідком швидкого масованого IgE-опосередкованого виділення медіаторів тучними клітинами і базофілами периферичної крові. Анафілаксія є системною та найбільш гострою та небезпечною з-поміж алергічних реакцій I типу.

Клінічний прояв анафілаксії у різних видів тварин визначається системою органів, які найбільш чутливі до дії медіаторів. Велика кількість клінічних ознак при анафілаксії є результатом взаємодії вазоактивних молекул, виділених тучними клітинами і базофілами, з їх рецепторами, які присутні на ендотеліальних клітинах судин, гладеньких м'язах бронхів, шлунково-кишкового тракту, матки, сечового міхура.

**Мета роботи:** ознайомити студентів з особливостями перебігу анафілаксії у морських свинок.

**Обладнання та матеріали:** сироватка коня, стерильні шприци з ін'єкційними голками, 5 %-ий розчин йоду, вата, ножиці, пінцет, піддослідні тварини (морські свинки), лоток.

### **Хід роботи.**

1. За три тижні до проведення досліду сенсibiliзувати морських свинок підшкірним уведенням 0,1–0,2 мл сироватки коня (при цьому у якості алергенів будуть виступати білки сироватки).

2. У день досліду сенсibiliзованим свинкам у порожнину серця або внутрішньоочеревинно повторно увести 1–2 мл тієї ж сироватки. У випадку введення сироватки коня морським свинкам безпосередньо в кров можна спостерігати швидкоплинну анафілактичну реакцію зі смертельним кінцем, у другому випадку – анафілаксія буде протікати у легкій формі та не супроводжуватися загибеллю.

3. Спостерігати за розвитком основних змін у поведінці тварин, маніфестація яких буде спостерігатися через 20–30 хв після повторного введення сироватки.

4. У разі загибелі тварин провести розтин трупів, звертаючи основну увагу на стан серця, легень та печінки.

5. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.



## **Завдання 2. Виявити імуноглобуліни класу Е у сенсibilізованих бензилпеніциліном тварин методом пасивної шкірної анафілаксії**

### **Теоретичні положення**

В нормі здорові тварини не реагують на гуморальні антигени, ін'єковані інтрадермально. Разом з тим, якщо той чи інший антиген (алерген) ін'єкувати інтрадермально сенсibilізованій тварині, це спровокує розвиток у шкірі локального запального процесу. Вазоактивні молекули, виділені тучними та іншими клітинами протягом 10–30 хвилин після ін'єкування алергену, призведуть до появи почервоніння (еритеми) та припухлості – як наслідок розширення капілярів та збільшення їх проникності (феномен Овері). З огляду на це, досить часто для діагностування у тварин алергічних реакцій I типу застосовують інтрадермальне введення гуморальних (водних розчинів) алергенів.

Схожий принцип виявлення сенсibilізованих тим чи іншим алергеном тварин лежить і в основі методу пасивної шкірної анафілаксії. При цьому комплекс «тканинний базофіл-специфічне антитіло (IgE)-алерген» утворюється не в організмі сенсibilізованої тварини, а в організмі (шкірі) клінічно здорової тварини, яку дослідник використовує, як плацдарм для зустрічі алергену із специфічним антитілом.

**Мета роботи:** виявити імуноглобуліни класу Е у сенсibilізованих бензилпеніциліном тварин шляхом пасивної шкірної анафілаксії.

**Обладнання та матеріали:** досліджувані сироватки крові тварин, бензилпеніциліну натрієва сіль, вода для ін'єкцій, внутрішньошкірні ін'єктори (стерильні шприци з ін'єкційними голками), 70 %-ий розчин спирту, вата, ножиці, клінічно здорове теля з наявністю непігментованих ділянок шкіри.

### **Хід роботи.**

1. Ножицями вистригти на непігментованій ділянці шкіри клінічно здорового теляти шерсть та протерти 70 %-им розчином спирту.

2. Внутрішньошкірно ін'єкувати у різні місця підготовленої шкіри теляти по 0,2–0,3 мл кожної з тестуючих сироваток крові тварин.

3. Через 24–48 годин (саме стільки часу необхідно для адсорбції антитіл (Ig E) уведеної тестуючої сироватки на тканинних базофілах шкіри, а отже – розвитку пасивної сенсibilізації) теляті внутрішньовенно ввести стерильний водний розчин бензилпеніциліну натрієвої солі у дозі 5 тис ОД/кг маси тіла.

4. Протягом наступних 1–72 годин спостерігати за місцями внутрішньошкірного введення сироваток, звертаючи увагу на наявність чи відсутність локального запального процесу.

5. Результати дослідження занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** При позитивній реакції на антиген (алерген) у шкірі теляти у місці ін'єкції сироватки крові від сенсibilізованої тварини уже через кілька годин після введення алергену розвивається локальний запальний процес, який можливий завдяки тому, що введена сироватка здатна протягом тривалого часу (до 8 тижнів) затримуватися у місці введення. Для кращої візуалізації запальної реакції тварині доцільно внутрішньовенно ввести якийсь органічний барвник, наприклад фарбу Еванса. При цьому барвник з'єднується з альбумінами сироватки крові та в нормі не виходить за межі судин. Проте у випадку підвищеної проникності капілярів мічений фарбою альбумін виходить із судинного русла у тканини та візуалізує місце запалення.



### **Завдання 3. Змоделювати гіперчутливість сповільненого типу на прикладі постановки туберкулінової проби**

#### **Теоретичні положення**

Четвертий тип алергічних реакцій за Кумбсом і Джелом носить назву гіперчутливості сповільненого типу або клітинно-опосередкованої гіперчутливості. Реакції сповільненого типу розвиваються у сенсibilізованому організмі через 24–72 години після контакту з алергеном. При цьому роль антитіл, як це відбувається у алергічних реакціях попередніх типів, виконують сенсibilізовані Т-лімфоцити-хелпери та цитотоксичні Т-лімфоцити, які, контактуючи за допомогою специфічних антигенрозпізнавальних рецепторів з антигеном, представленим на антигенпрезентуючих клітинах, активуються та набувають здатності до проліферації, що у свою чергу призводить до збільшення кількості цієї популяції лімфоцитів з виділенням медіаторів клітинного імунітету – запальних цитокінів.

Синтезовані цитокіни викликають скупчення у місці локалізації алергену макрофагів та інших лімфоцитів, в результаті чого виникає запалення та елімінація антигену. Клінічно це проявляється розвитком гіперергічного запалення: утворюється клітинний інфільтрат, клітинну основу якого становлять мононуклеари – лімфоцити і моноцити. Клітинний тип реакції лежить в основі розвитку численних інфекційних захворювань, зокрема туберкульозу, бруцельозу, сапу.

Туберкульоз – інфекційне хронічне захворювання тварин, птахів і людини, яке характеризується утворенням у різних органах типових безсудинних вузликів (туберкул) з наявністю сирнистого розпаду.

Захворювання у тварин викликають мікобактерії туберкульозу видів *Mycobacterium bovis* (велика рогата худоба), *Mycobacterium tuberculosis* (люди, свині, кішки, собаки) і *Mycobacterium avium* (домашні і дикі птахи).

Одним з основних методів діагностики туберкульозу у тварин є проведення внутрішньошкірної туберкулінової проби, а у коней – офтальмопроби.

**Мета роботи:** змоделювати гіперчутливість сповільненого типу на прикладі постановки туберкулінової проби.

**Обладнання та матеріали:** туберкулін для ссавців з розчинником, внутрішньошкірні ін'єктори, 70 %-ий розчин спирту, вата, ножиці, кронциркуль, тварини (корови).

**Принцип методу.** Внутрішньошкірне введення тваринам туберкуліну являє собою шкірну алергічну пробу, покликану виявити тварин, сенсibilізованих туберкульозним антигеном, у яких хвороба перебуває у латентному періоді. Туберкулін – діагностичний препарат, який містить екстракт з *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* або *Mycobacterium avium*.

У разі відсутності в організмі тварини збудника туберкульозу, при потраплянні у шкіру антигени, які містяться у туберкуліні, захоплюються антигенпрезентуючими клітинами – клітинами Лангерганса. Антигени процесуються, а їх пептидні фрагменти презентуються на поверхні клітин Лангерганса разом із молекулами МНС II класу для розпізнавання наївним Т-лімфоцитам-хелперам. У процесі поглинання, перетравлення і презентації антигенних пептидів клітини Лангерганса активуються і виділяють ряд медіаторів (фактор некрозу пухлин-альфа, гамма-інтерферон, IL-12 та ін.), які при контакті з наївними Т-лімфоцитами-хелперами сприяють їх диференціюванню у периферичних органах імуногенезу у специфічні по відношенню до розпізнаного антигену Т-лімфоцити-хелпери I класу. Останні проліферують та мігрують у напрямку зосередження антигену – дерму, де також виділяють ряд цитокінів (фактор некрозу пухлин-альфа, гамма-інтерферон, IL-1, IL-3 та ін.), які сприяють міграції у місце локалізації антигену макрофагів, інших лімфоцитів, базофілів, та розвитку незначного локального запального процесу, що проявляється у збільшенні товщини складки шкіри.

У разі присутності в організмі сенсibilізованої тварини збудника туберкульозу антигени, які містяться у туберкуліні, через 24–72 години викликають розвиток значно сильнішого локального запального процесу, порівняно з несенсibilізованою твариною, оскільки в організмі сенсibilізованої тварини вже присутні у значній кількості активовані Т-лімфоцити (при цьому не затрачається час на проліферацію специфічних їх клонів).

### **Хід роботи.**

1. У корів вистригти шерсть на межі передньої та середньої третин ший, очистити та одноразово обробити 70 %-им розчином спирту.
2. Складку шкіри у місці введення туберкуліну зафіксувати між великим та вказівним пальцями та виміряти кронциркулем її товщину.
3. Кожній тварині ввести по 0,1 мл туберкуліну (згідно інструкції щодо його застосування) внутрішньошкірно з використанням

внутрішньошкірного ін'єктора. Вводити туберкулін у пошкоджену шкіру забороняється.

4. Шляхом пальпації місця введення туберкуліну підтвердити його внутрішньошкірну локалізацію.

5. Через 72 години після ін'єкції кронциркулем виміряти товщину складки шкіри у місці введення туберкуліну, звертаючи увагу на ступінь прояву локального запального процесу у місці введення туберкуліну у міліметрах товщини складки.

6. Результати дослідження занести до протоколу заняття. Проаналізувати отримані дані та зробити висновки.

**Інтерпретація.** У разі відсутності в організмі тварини збудника туберкульозу складка шкіри потовщується не більше, ніж на 2 мм порівняно з товщиною складки шкіри до введення туберкуліну.

Сумнівний результат – складка шкіри потовщується більше, ніж на 2 мм, але менше, ніж на 3 мм порівняно з товщиною складки шкіри до введення туберкуліну.

У разі наявності в організмі тварини збудника туберкульозу складка шкіри потовщується більше, ніж на 3 мм порівняно з товщиною складки шкіри до введення туберкуліну.



## **Тема 8. ОТРИМАННЯ ІМУННИХ СИРОВАТОК. ПОНЯТТЯ ПРО ГІБРИДОМИ ТА МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА**



### **Завдання 1. Отримати імунну сироватку від кроля**

#### **Теоретичні положення**

Сироватка крові тварин, яка містить антитіла до того чи іншого антигену, називається імунною сироваткою (антисироваткою). У більшості випадків імунну сироватку отримують експериментальним шляхом, імунізуючи тварин антигеном. Також імунну сироватку можна отримати від тварин, які перехворіли на ту чи іншу інфекційну чи паразитарну хворобу. Зазвичай імунна сироватка застосовується в якості лікувального або діагностичного засобу.

У числі основних вимог до імунних сироваток – їх висока специфічність та високий вміст антитіл. За специфічністю розрізняють полівалентні (поліспецифічні) і моновалентні (моноспецифічні) антисироватки. Полівалентні сироватки містять антитіла до багатьох антигенів, моноспецифічні – до одного антигена.

Отримати моноспецифічні сироватки можна, використовуючи для імунізації тварин високоочищені антигени, або очищуючи нативні сироватки від антитіл небажаної специфічності. З метою очищення нативних сироваток від антитіл небажаної специфічності використовують:

- ✚ імуноафінний метод, у основі якого лежить зв'язування антитіл певної специфічності відповідними антигенами, іммобілізованими на твердофазному носіїві, з послідуочим розділенням отриманих комплексів антиген-антитіло та виділенням антитіл;

- ✚ метод адсорбції за Каstellані. При цьому до нативної імуноної сироватки, яка містить групоспецифічні перехресно реагуючі антитіла, послідовно додають мікроорганізми, у склад яких входять всі групоспецифічні антигени, адсорбуючи таким чином гомологічні антитіла.

Такі адсорбовані моноспецифічні імуноні сироватки містять антитіла до різних детермінант молекули антигена, які гетерогенні за класовою приналежністю та авідністю, оскільки синтезуються різними клонами лімфоцитів, залученими у імунону відповідь.

Антитіла – ефекторні молекули гуморального імунонїтету. Синтез антитіл запускаяють антигени, які надходять в організм ззовні (при інфекціях, вакцинації, дії ксенобіотиків) або утворюються ендогенно. Як правило, антитіла специфічно взаємодіють з комплементарними антигенами. Існують, однак, антитіла, які взаємодіють з антигенними-детермінантами, загальними для різних антигенів. Такі антитіла відомі як перехреснореагуючі або гетероспецифічні. Антитіла існують у мільйонах різновидів і кожна молекула антитіла має унікальну ділянку зв'язування антигенної детермінанти. У більшості випадків антитіла представлені сироватковими глікопротеїнами, мігруючими у складі фракції  $\gamma$ -глобулінів при електрофорезі білків сироватки крові. Тому для позначення сироваткової фракції антитіл часто застосовують термін « $\gamma$ -глобуліни». Розрізняють п'ять класів антитіл (імуноглобулінів): *IgM*, *IgG*, *IgA*, *IgE*, *IgD*.

Ідентичними за всіма характеристиками є антитіла, продуковані одним клоном лімфоцитів до однієї антигенної детермінантної групи антигену, тобто моноклональні антитіла.

Для імунізації тварин готують корпускулярні чи розчинні антигени з різним ступенем очищення, залежно від завдань дослідження.

Властивості імуноної сироватки, яка відповідає певним вимогам, залежить від кратності, термінів і способу введення антигену та його дози.

**Мета роботи:** отримати імунону сироватку від кроля.

**Обладнання та матеріали:** кріль, підготовлені інактивовані антигени *E. coli*, штатив для пробірок, стерильні пробірки, ампули, піпетки, голки та шприци, вата, 70%-ий розчин етанолу.

### Хід роботи.

1. Імунізувати кролика нативним інактивованим корпускулярним антигеном *E. coli*. Антиген вводити з допомогою стерильної голки та шприца у крайову вену вушної раковини п'ятикратно з інтервалом 6 днів згідно схеми:

Послідовність імунізацій	Дні імунізації	Антиген	
		об'єм, мл	кількість клітин
1	1	0,25	$2,5 \cdot 10^8$
2	7	0,5	$5 \cdot 10^8$
3	13	1,0	$1 \cdot 10^9$
4	19	2,0	$2 \cdot 10^9$
5	25	3,0	$3 \cdot 10^9$

2. Через 10–14 днів після закінчення курсу імунізації у імунізованого кроля відібрати 5–10 мл крові.

3. Кров перенести у стерильну пробірку та помістити у термостат на 30–60 хв за температури 37 °С. При цьому кров згорнеться з утворенням згустку вишнево-червоного кольору: спочатку пухкого, а після ретракції – щільного. З метою отримання більшої кількості сироватки, пробірку на кілька годин можна помістити у холодильник.

4. Пастерівською піпеткою відшарувати утворений фібриновий згусток від стінки пробірки, а прозору опалесціючу рідину світо-жовтого кольору – сироватку – перенести у іншу стерильну пробірку.

5. Відцентрифугувати сироватку протягом 10–15 хв за відцентрової сили 300 g та надосад (власне сироватку) розлити у стерильні скляні ампули.

6. Результати проведеної роботи занести до протоколу заняття. Проаналізувати методику отримання імунної сироватки від кроля та зробити висновок.



### Завдання 2. Розглянути принципи отримання гібридом і моноклональних антитіл

**Мета роботи:** розглянути принципи отримання гібридом та моноклональних антитіл.

**Обладнання та матеріали:** презентатор, слайди, інші презентативні матеріали.

### Теоретичні положення

Для багатьох досліджень, пов'язаних з вивченням біологічних структур, велику цінність представляють реагенти, які здатні специфічно взаємодіяти з даними структурами. Універсальним реагентом, що володіє такою властивістю, є молекула імуноглобуліну. Незважаючи на те, що імуноглобуліни взаємодіють

лише з антигенами, які викликають імунну відповідь, для більшості структур вдається підібрати такі умови, за яких вони самі стають антигенами та індукують утворення комплементарних антитіл (при кон'югації з сильними імуногенами). Саме цим пояснюється широке розповсюдження імунологічних методів, пов'язаних з використанням антитіл, в різних областях біології і медицини.

Імунна система виробляє специфічні антитіла на величезну кількість антигенів. В основі такої здатності лежить наявність великої різноманітності клонів лімфоцитів, кожен з яких синтезує антитіла з вузькою специфічністю. У відповідь на певний антиген втягується безліч клонів лімфоцитів, що зумовлює високу гетерогенність одержуваних антитіл. Так, при імунізації тварини комплексом гаптен-білок утворюється до восьми тисяч антитіл різної специфічності, залежно від кількості антигенних детермінант. Спектр секретованих антитіл змінюється у ході імунної відповіді, а також залежить від генетичного статусу тварини, яка використовується для імунізації. Неспецифічне зв'язування антитіл і їх перехресна реактивність викликають серйозні проблеми у зв'язку із застосуванням антисироваток для ідентифікації і кількісного визначення антигенів у різних галузях досліджень.

В основу методу напрацювання антитіл одного типу з вузькою специфічністю (моноклональних антитіл) покладена здатність нормальних плазматичних клітин імунної системи організму після злиття з перещеплюваними пухлинними (мієломними) клітинами зберігати властивість синтезувати антитіла. При цьому новоутворена популяція клітин носить назву гібридних клітин або гібридом.

Проте між поняттями «гібридна клітина» і «гібридома» існує деяка відмінність. Гібридна клітина – це клітина, що утворилася під впливом біологічних, хімічних і фізичних факторів при злитті двох або більшої кількості соматичних клітин, в результаті чого відбулось усупільнення клітинних мембран, цитоплазми і, головне, хромосомних апаратів – носіїв генетичної програми життєдіяльності клітин. Унікальність даного феномена полягає в тому, що гібридні клітини виявляються не «виродками», нездатними до нормальної життєдіяльності, а навпаки, вони успадковують і об'єднують в собі властивості обох батьківських клітин, в тому числі і здатність до поділу і специфічного біосинтезу. Про гібридому говорять у тому випадку, якщо це стосується переважно злиття імунних лімфоцитів і мієломних клітин.

Таким чином, при злитті батьківських селезінкових клітин (плазмоцитів) з мієломними клітинами перші передають дочірнім клітинам здатність виробляти специфічні антитіла, а другі – здатність до необмеженого росту.

Тобто, моноклональні антитіла є продуктом секреції однієї антитілопродукуючої клітини, або її нащадків (клону клітин), що утворилися в процесі ділення цієї клітини. Всі моноклональні антитіла, що є продуктом одного клону клітин, представлені ідентичними молекулами. Звідси випливають основні властивості моноклональних антитіл:

- ✚ усі молекули моноклональних антитіл мають однакову специфічність, тобто направлені проти однакових місць зв'язування (антигенних детермінант) на якому-небудь конкретному антигені, тоді як поліклональна сироватка містить у своєму складі антитіла до різних ділянок зв'язування антигенів і навіть до різних антигенів;
- ✚ усі молекули моноклональних антитіл володіють однаковою спорідненістю до зв'язування з антигеном (афінність), тобто моноклональні антитіла бувають високоафінними (міцно зв'язують антиген) і низькоафінними (утворюють легко дисоціюючий комплекс з антигеном). Поліклональна сироватка завжди представлена антитілами різної афінності;
- ✚ усі молекули моноклональних антитіл мають один ізотип і субізотип імуноглобулінів, чого не можна сказати про антитіла поліклональної сироватки.

Всі перераховані вище властивості моноклональних антитіл дають їм переваги перед антитілами поліклональних сироваток при використанні їх у діагностичних цілях, де знайшли своє саме широке застосування, зокрема для діагностики вірусних, бактеріальних, паразитарних хвороб тварин; для ідентифікації поверхневих антигенів еукаріотичних клітин (CD-антигенів); з терапевтичною метою.

Гібридомна технологія отримання моноклональних антитіл включає декілька етапів: імунізацію тварин; культивування мієломних клітин; злиття клітин мієломи з імунними спленоцитами; скринінг антитіл; клонування гібридомних клітин; розмноження клонованих гібридом; зберігання гібридом і клонів; очищення моноклональних антитіл (рис. 3.18). Зазвичай вся процедура отримання моноклональних антитіл займає близько 2–3 міс.

Велике значення при отриманні гібридом надається пухлинній лінії клітин, яка повинна відповідати певним вимогам. Існує ряд критеріїв для вибору пухлинної лінії клітин у якості партнера для злиття:

- ✚ природа клітин повинна бути такою, щоб об'єднання їх хромосом з хромосомами нормальних лімфоцитів (плазмоцитів) не супроводжувалося дисфункціональними розладами біосинтезу антитіл. Цю вимогу найкраще задовільняють генетично (сингенні) і епігенетично (клітини того ж типу тканинного диференціювання) споріднені клітини. Для В-лімфоцитів такими спорідненими клітинами є плазмоцити (мієломи), а для Т-лімфоцитів – Т-лімфоми;
- ✚ клітини повинні легко рости у культурі, мати час генерації близько 12 годин і, по можливості, проліферувати на мінімальних поживних середовищах;
- ✚ бажано, щоб пухлинні клітини-партнери були здатні рости у черевній порожнині сингенних тварин, забезпечуючи за цією ознакою хорошу спадковість гібридним клітинам у плані отримання асцитів, як джерела великих кількостей моноклональних антитіл;

- ✚ клітини-партнери повинні володіти високою здатністю до гібридизації (хоча б кожна сота клітина із загальної кількості повинна давати життєздатний гібрид);
- ✚ пухлинні клітини повинні бути мутантними за певними генами, контролюючими синтез життєво необхідних ферментів, для того, щоб пухлинний партнер по гібридизації не міг рости при культивуванні у спеціальних селективних середовищах.

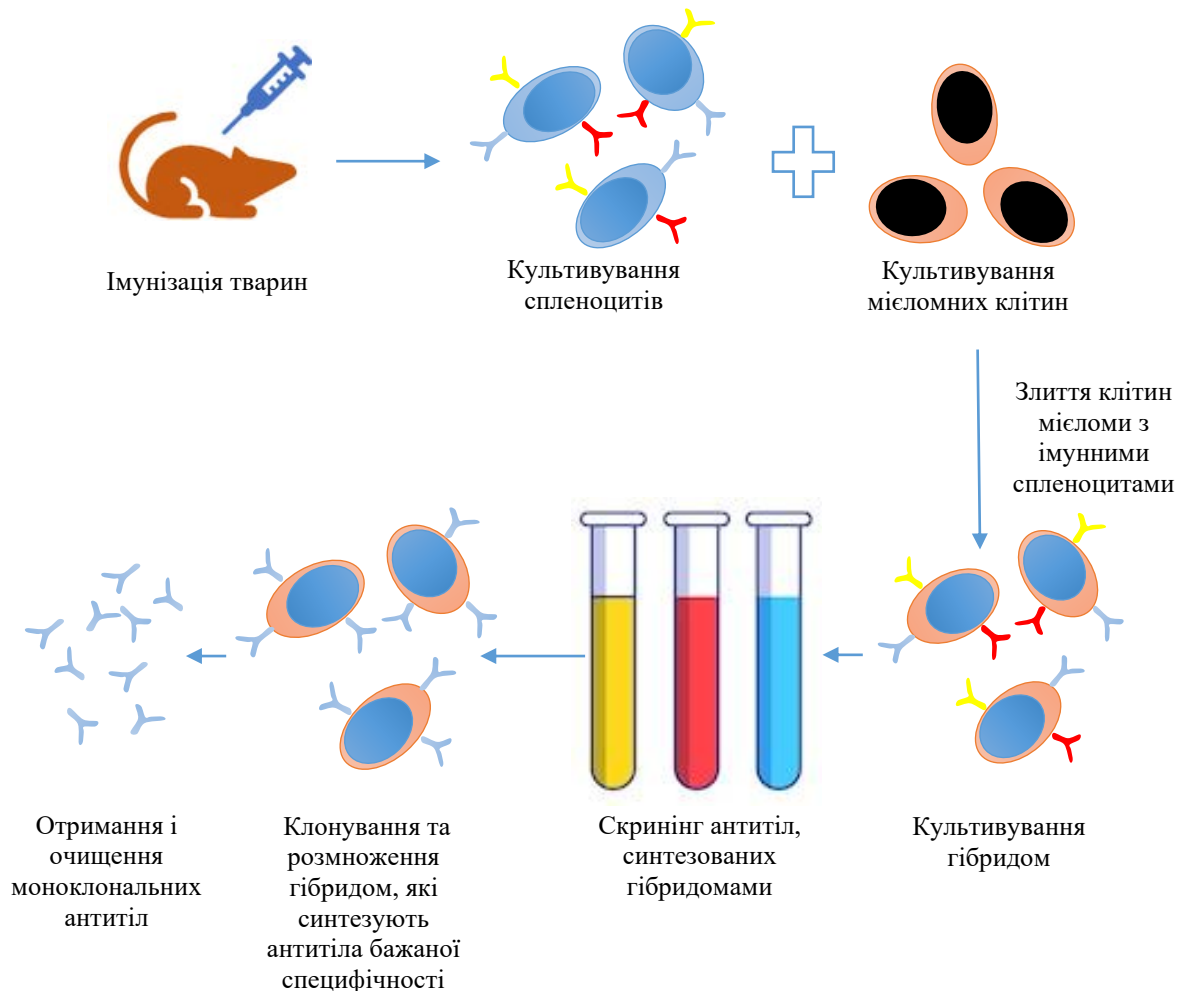


Рис. 3.18. Схема отримання моноклональних антитіл

Як відомо, у клітинах ссавців існує два шляхи синтезу нуклеотидів – основний, при якому нуклеотиди синтезуються заново з амінокислот і вуглеводів, і запасний, так званий метаболічний шунт, для якого характерне використання попередників пуринів – гіпоксантину і тимідину. Синтез нуклеотидів другим шляхом може відбуватися лише в тому випадку, коли у клітинах присутній фермент гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансфераза (ГГФРТ). Цей фермент також забезпечує включення в ДНК і РНК таких антиметаболітів, як 8-азагуанін або 6-тіогуанін, що призводить до загибелі клітин. Тому, якщо пухлинні клітини культивувати на середовищі, яке містить

8-азагуанін, то зможуть вижити тільки мутанти, у яких відсутня функціонально активна ГГФРТ. Цей простий прийом широко використовується для отримання пухлинних клітин-партнерів для гібридизації. Клітини таких ліній здатні рости, синтезуючи свої нуклеотиди *de novo* з вуглеводів і амінокислот.

Аналог фолієвої кислоти аміноптерин блокує синтез нуклеотидів *de novo*. Однак клітини, які синтезують ГГФРТ і його субстрати – гіпоксантин і тимідин, зберігають життєздатність у присутності аміноптерину. Тому гібридні клітини, увібравши у себе геном нормального лімфоцита, який містить нормальний ген ГГФРТ, виживають на відміну від батьківських пухлинних клітин у селективному середовищі, яке містить гіпоксантин-аміноптерин-тимідин (НАТ). Другий партнер по гібридизації – лімфоцити, як правило, в культурі не проліферують і відмирають впродовж 7–14 днів.

У даний час існує безліч різних типів маркованих (дефектних за ГГФРТ) мієломних ліній клітин лабораторних тварин (миші, щурі) і людини. Найбільш широке поширення одержали мишачі мієломи (генотипу BALB/c).

Імунізацію при отриманні гібридом проводять з метою вироблення у тварини-донора спленоцитів, популяції В-лімфоцитів, які продукують антигенспецифічні імуноглобуліни. При цьому В-лімфоцити, як один з партнерів для отримання гібридом, мають володіти здатністю до злиття з плазмочитомними клітинами і знаходитися у стадії неповної дифференціації у зрілі плазматичні клітини. Тому всі процедури гібридизації передбачають взяття лімфоцитів у імунованих тварин у перші шість днів після введення останньої дози антигену.

Оскільки при імунізації тварин різними антигенами імунна відповідь виробляється на всі антигенні детермінанти і компоненти введеного матеріалу і відібрати потрібні антитіла досить складно – для імунізації тварин бажано використовувати очищені антигени. Основна мета імунізації полягає у збільшенні частки клітин, які продукують антитіла заданої специфічності, і перевести ці клітини у функціональний стан, при якому вони здатні зливатися і утворювати антитілопродукуючі гібридні клітини.

Існує два основних способи імунізації тварин при отриманні гібридом: імунізація *in vivo* і імунізація *in vitro*. Задовільною вважається середня специфічна ефективність гібридизації, рівна 10–15 %. Вона досягається у більшості випадках двократним введенням тваринам невеликих доз білкових антигенів з інтервалом, який перевищує час проходження піку первинної імунної відповіді. При отриманні гібридом застосовують різні схеми імунізації, намагаючись підвищити кількість клітин, які утворюють антитіла, і збільшити у остаточному підсумку вихід антигенспецифічних гібридом. Зазвичай це роблять, імунізуючи ряд тварин і вибираючи клітини селезінки тих особин, у яких найвищий титр антитіл. Однак, не дивлячись на високий рівень антитіл у сироватках крові імунованих тварин, не завжди вдається істотно підвищити ефективність гібридизації.

Останнім часом стали інтенсивно розроблятися методи імунізації *in vitro*. Особливе значення надається імунізації *in vitro* в цілях отримання гібридом на

основі лімфоцитів людини у силу імперативної заборони імунізації *in vivo*. На сьогоднішній день опубліковано цілий ряд робіт, у яких досить докладно описані методичні підходи щодо імунізації спленоцитів *in vitro* і отримання на їх основі гібридом.

Методи гібридизації імунних спленоцитів з мієломними клітинами бувають біологічні (за допомогою вірусів типу Сендай), хімічні (з допомогою речовин типу лізолецитину або поліетиленгліколю) і фізичні (за допомогою електричного поля).

Гібридизація за допомогою вірусу Сендай не завжди дає позитивні результати. Деякі автори пояснюють це тим, що не всі клітини мишачої мієломи мають рецептори для даного вірусу.

Оскільки мембрани клітин заряджені і електропровідні, то, зрозуміло, були зроблені спроби, які опинилися вельми вдалимими, викликати гібридизацію клітин за допомогою впливу електричного або магнітного поля. Ефективність електрогібридизації, як правило, вища, ніж гібридизація біологічними і хімічними методами. Технологія електрогібридизації дозволяє проводити процес під візуальним контролем через мікроскоп і відразу відокремлювати гібридні клітини від негібридних, та виключає необхідність метаболічної селекції. Однак даний метод вимагає дорогого устаткування і високої кваліфікації персоналу. Тому найбільше поширення в даний час отримали хімічні методи гібридизації з використанням поліетиленгліколю (ПЕГ) з молекулярною масою від 1000 до 6000 Да.

При використанні поліетиленгліколю частота гібридизації становить зазвичай один гібрид на кожні  $2 \times 10^5$  клітин селезінки.

При культивуванні спленоцитів концентрація клітин у культурі не повинна перевищувати 0,5–1 млн/мл. Культуру клітин необхідно вести у культуральному середовищі, до якого вона адаптована. Основним середовищем для отримання гібридом є середовище Ігла у модифікації Дюльбекко.

Перед злиттям мієломних клітин з імунними спленоцитами 96-лункові планшети необхідно засіяти фідерними клітинами (опромінені клітини селезінки, тимоцити, диплоїдні фібробласти легеневої тканини). Ці клітини слугують джерелом різних ростових і стимулюючих факторів, необхідних у тому випадку, якщо кількість гібридомних клітин буде незначною.

Після гібридизації, через 7–14 днів, у лунках виростають колонії гібридних клітин і виникає необхідність тестування супернатанту на наявність специфічних антитіл. Щодо скринінгу, то він заснований на детекції взаємодії антитіл зі специфічними антигенами. У гібридомній технології найчастіше використовують різні варіанти імуноферментного аналізу, імунофлуоресценції, реакцію зв'язування комплементу. Методи преципітації і аглютинації не можуть бути використані, оскільки моноклональні антитіла, специфічні до однієї детермінанти, не можуть утворити множинних зв'язків з антигеном.

Ідентифіковані гібридами клонують. Слід відмітити, що клонування є тим етапом гібридомної технології, який лімітує пропускну здатність всього методу. Тому дуже важливо ретельно провести скринінг, відібрати необхідні гібридоми

і для уникнення переростання антитілопродукуючих клітин клітинами, які втратили здатність секретувати антитіла, як можна швидше провести клонування. З цією метою широко використовується два методичних підходи: клонування методом граничних (лімітуючих) розведень і клонування у напіврідкому агарі. У першому випадку готують розведення у ростовому середовищі, що містить 5 клітин на 0,5 мл середовища, і розсаджують по 100 мкл у лунки 96-лункових планшетів, або клітини розсіюють з розрахунку одна клітина на лунку. При клонуванні у напіврідкому агарі гібридні клітини вносять у 0,5 %-ий розчин агару, приготований на культуральному середовищі. Клітини при цьому способі зазвичай вносять у агар з розрахунку 20–40 клітин на лунку 24-х лункового планшета. Через 7–10 днів утворені клони переносять у лунки 96-лункових планшетів. Після клонування гібридні клітини можуть бути вирощені в культурі у значних кількостях. Як правило, концентрація антитіл в культуральній рідині досягає 10–100 мкг/мл.

Вирощення гібридом у організмі експериментальних тварин (наприклад, мишей) забезпечує кращу продукцію моноклональних антитіл, порівняно з їх отриманням *in vitro*. Для культивування гібридних клітин *in vivo* і для отримання асцитної рідини, яка містить моноклональні антитіла, мишам вводять внутрішньоочеревинно гібридні клітини у кількості  $2-4 \times 10^7$  на тварину. Асцит формується на 7–14 добу після інокуляції клітин. Отримані антитіла піддаються ретельному аналізу з метою визначення їх властивостей і подальшого практичного використання.

Таким чином, технологія отримання гібридом, які секретують моноклональні антитіла, складається з безлічі важливих етапів, правильне і якісне виконання яких забезпечує успіх роботи та досягнення поставлених цілей.

*По завершенню ознайомлення з технологією отримання гібридом схематичні зображення технології відобразити у протоколі заняття.*



### Питання для самоконтролю

1. З допомогою яких клітин реалізується набутий (адаптивний) гуморальний та клітинний імунітет?
2. Яким чином пов'язані специфічна та неспецифічна ланки імунітету?
3. Які два основні завдання вирішує імунітет?
4. До якої популяції імунокомпетентних клітин відносять лімфоцити?
5. Які існують субпопуляції лімфоцитів?
6. У які ефекторні клітини диференціюються Т- і В-лімфоцити у лімфоїдних органах?
7. З якою метою проводять визначення інтенсивності реакції гіперчутливості повільного типу?

8. Що лежить в основі методу визначення кількості Т-лімфоцитів у крові тварин?
9. Опишіть принцип методу визначення кількості теофілінчутливих та теофілінрезистентних Т-лімфоцитів крові тварин методом розеткоутворення з еритроцитами барана.
10. З якою метою рекомендується проводити визначення абсолютної і відносної кількості Т-лімфоцитів-хелперів у крові тварин?
11. На чому базується метод визначення кількості «активних» Т-лімфоцитів у крові тварин?
12. Назвіть причини підвищення вмісту Т-лімфоцитів та окремих їх субпопуляцій у крові тварин.
13. Що являють собою В-лімфоцити, що виявляють в периферійній крові тварин?
14. На чому базується метод визначення кількості В-лімфоцитів у крові тварин?
15. Коли спостерігається підвищення та зниження вмісту В-лімфоцитів у крові тварин?
16. Що лежить в основі реакції бласттрансформації лімфоцитів під впливом Т- та В-клітинних міогенів?
17. Як інтерпретують показник бласттрансформації лімфоцитів крові тварин після стимуляції мітогеном?
18. Чому білковий склад плазми крові характеризує функціональний стан неспецифічної реактивності організму?
19. У якому органі синтезується основна маса білків плазми крові тварин?
20. Дайте визначення гіпо- та гіперпротеїнемії.
21. Внаслідок чого розвивається абсолютна гіпопротеїнемія?
22. Які причини виникнення відносної гіпопротеїнемії?
23. Які можуть бути причини зміни альбумін-глобулінового коефіцієнта крові тварин?
24. Які причини виникнення абсолютної та відносної гіперпротеїнемії?
25. Які виділяють фракції білків сироватки крові?
26. На чому ґрунтується метод визначення загальної кількості білка у крові тварин за допомогою біуретової реакції?
27. Назвіть основні причини гіпо- та гіперальбумінемій.
28. Які причини зміни вмісту у крові тварин різних фракцій глобулінів?
29. Які методи дослідження імунітету називають серологічними? З якою метою їх застосовують?
30. Коротко охарактеризуйте фази серологічних реакцій.
31. За якої умови у серологічних реакціях спостерігається феномен аглютинації?
32. Чому після інкубації на водяній бані при температурі 56 °С комплемент не здатний гемолізувати комплекси еритроцит-гемолізину?
33. Яка причина того, що у досліді Даніша додавання антигену окремими частинами до антитіл у подальшому не викликає гемолізу еритроцитів?

34. Що можливо визначити у імунологічній лабораторії за допомогою реакції аглютинації?
35. Які типи реакції аглютинації існують? Коротко охарактеризуйте кожну з них.
36. Для діагностики яких хвороб тварин та птиці використовують реакції аглютинації?
37. Чим спричинюється гемотрансфузійний шок у тварин?
38. Що являють собою імуноферментні методи? У чому їх суть?
39. Розшифруйте аббревіатуру «ELISA».
40. Що у ІФА застосовують у якості мітки?
41. Що у ІФА розуміють під «кон'югатом»?
42. Які існують різновиди ІФА?
43. У чому відмінність гомогенного від гетерогенного або твердофазного ІФА? У чому їх суть?
44. Коротко охарактеризуйте конкурентний метод ІФА.
45. Що є основою твердофазного ІФА? Чому він так називається?
46. Що використовують у якості твердої фази для проведення твердофазного ІФА?
47. Що розуміють під сенсibiliзацією твердої фази?
48. Коротко охарактеризуйте прямий варіант твердофазного ІФА?
49. У чому суть непрямого варіанту твердофазного ІФА?
50. Поясніть «сендвіч»-варіант ІФА.
51. Опишіть принцип методу визначення у сироватці крові жуйних глікопротеїнів, асоційованих з вагітністю.
52. На якому принципі заснована імунопреципітація?
53. У чому реакція імунопреципітації (імунодифузії) відрізняється від реакції аглютинації? За якої умови у серологічних реакціях спостерігається феномен преципітації?
54. Які існують модифікації методу імунодифузії? Коротко охарактеризуйте їх.
55. У які етапи проходить підготовка інгредієнтів для проведення реакції імунодифузії?
56. Які вимоги до постановки реакції імунодифузії, температури для її проведення та електролітів?
57. У чому суть реакції зв'язування комплементу?
58. Що являє собою гемолітична система у реакції зв'язування комплементу?
59. Про що свідчить наявність або відсутність гемолізу у реакції зв'язування комплементу?
60. Що лежить в основі імунохроматографічного аналізу?
61. Які типи антитіл використовуються у імунохроматографічному аналізі?
62. Дайте визначення алергії.
63. Що таке алергени? Які групи алергенів ви знаєте?
64. Які снують класифікації алергічних реакцій?
65. Як швидко розвиваються алергічні реакції негайного типу?

66. Як швидко розвиваються алергічні реакції сповільненого типу?
67. Які типи алергічних реакцій за Кумбсом і Джелом відносять реакції негайного типу?
68. Який тип алергічних реакцій за Кумбсом і Джелом відносять реакції сповільненого типу?
69. Дайте визначення сенсibiliзації. Які типи сенсibiliзації Ви знаєте?
70. Скільки існує стадій патогенезу алергічних реакцій? Дайте коротку характеристику кожній.
71. Назвіть основні медіатори алергічних реакцій та їх ефекти.
72. Дайте коротку характеристику патогенезу алергічних реакцій IV типу.
73. Які є методи діагностики алергічних реакцій?
74. Що собою являє туберкулінова проба? Як інтерпретують її результати?
75. Дайте визначення імунній сироватці.
76. Що являють собою антитіла?
77. Скільки існує класів антитіл?
78. Охарактеризуйте принцип отримання імунних сироваток.
79. Що являє собою гібридомна клітина (гібридома)?
80. Що покладено в основу методу напрацювання антитіл одного типу з вузькою специфічністю (моноклональних антитіл)?
81. Якими двома основними властивостями володіють гібридомні клітини?
82. Скільки етапів включає в себе гібридомна технологія отримання моноклональних антитіл?
83. Назвіть критерії для вибору пухлинної лінії клітин у якості партнера для злиття з плазматичними клітинами.
84. Які є шляхи синтезу нуклеотидів клітинами ссавців?
85. Яким чином вдається домогтися виживання у селективному середовищі для злиття пухлинних клітин з плазматичними клітинами лише гібридом?
86. Чому всі процедури гібридизації передбачають взяття лімфоцитів у імунізованих тварин у перші шість днів після введення останньої дози антигену?
87. Назвіть два основних способи імунізації тварин при отриманні гібридом. Коротко їх охарактеризуйте.
88. Яка частота гібридизації при використанні поліетиленгліколю?
89. Які існують методичні підходи щодо клонування гібридомних клітин?



## АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК

- В-лімфоцити, 105*  
*Т-лімфоцити, 101, 103, 104*  
*Аглютиніни, 118*  
*Аглютиногени, 118*  
*Агранулоцитоз, 83*  
*Активність комплементу сироватки крові, 71*  
*Алергія, 154*  
*Анбазофілія, 81*  
*Анеозинофілія, 81*  
*Антиген, 49*  
*Аутоаглютинація еритроцитів, 125*  
*Базофілія, 81*  
*Бактерицидна активність сироватки крові, 68*  
*Біуретова реакція, 111*  
*Бласттрансформація лімфоцитів, 107*  
*Введення антигену, 53*  
*Взяття крові у тварин, 41*  
*Визначення груп крові, 124, 126*  
*Вроджений імунітет, 58*  
*Гемолізину, 76*  
*Гемотрансфузійний шок, 121*  
*Гетерофільні аглютиніни, 75*  
*Гібридна клітина, 163*  
*Гібридома, 163*  
*Гіпергаммаглобулінемія, 113*  
*Гіперпротеїнемія, 110, 111*  
*Гіперчутливість сповільненого типу, 158*  
*Гіпогаммаглобулінемія, 113*  
*Гіпопротеїнемія, 110*  
*Глобуліни, 109*  
*Гуморальна неспецифічна резистентність, 67*  
*Гуморальний специфічний імунітет, 97*  
*Дефібринована кров, 48*  
*Еозинофіли, 92*  
*Еозинофілія, 81*  
*Життєздатність імунокомпетентних клітин, 38*  
*Зсув ядра нейтрофілів, 82*  
*Імунітет, 58*  
*Імунна сироватка крові, 160*  
*Імунодифузія, 139*  
*Імуноферментний аналіз, 129, 130*  
*Імунохроматографічний аналіз, 150*  
*Інтерферон, 67*  
*Клітинний специфічний імунітет, 97*  
*Лабораторні тварини, 22*  
*Лейкограма, 79*  
*Лейкоконцентрат, 31, 32*  
*Лейкопенія, 80*  
*Лейкоцити, 59*  
*Лейкоцитоз, 80*  
*Лізоцимна активність, 69*  
*Лімфоцити, 25*  
*Лімфоцитоз, 83*  
*Лімфоцитопенія, 83*  
*Моноклональні антитіла, 164*  
*Моноцитоз, 83*  
*Моноцитопенія, 83*  
*Набутий імунітет, 97*  
*Нейтропенія, 82*  
*Нейтрофіли, 28, 62, 62, 82*  
*Нейтрофілія, 81*  
*НСТ-тест, 61*  
*Опсонізація, 60*  
*Опsono-фагоцитарна реакція, 62*  
*Пасивна шкірна анафілаксія, 157*  
*Перитонеальні макрофаги, 33*  
*Пероксидазна активність, 66*  
*Плазма крові, 49*  
*Преципітини, 140*  
*Преципітиногени, 140*  
*Природні (натуральні) кілери, 93*  
*Реакція аглютинації, 118*  
*Реакція гіперчутливості сповільненого типу, 99*  
*Реакція зв'язування комплементу, 146*  
*Реакція преципітації, 139*  
*Сенсибілізація твердої фази, 132*  
*Серологічна реакція, 115*  
*Спленоцити, 35*  
*Сумісність крові, 121, 123*  
*Тимоцити, 34*  
*Фагоцитарна активність, 63*  
*Фагоцитарне число, 63*  
*Фагоцитарний індекс, 63*  
*Фагоцитоз, 59, 64*  
*Феномен розеткоутворення, 101*  
*Функціональна активність лейкоцитів, 59*  
*Циркуючі імунні комплекси, 77*



## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bianco C., Prilrick R., Nussenzweig V.A. Population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complex. *J. Exp. Med.*, 1970. Vol. 134. № 4. P. 702–720.
2. Boyum A. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue antigens*, 1974. № 4. P. 269–274.
3. Brian Catchpole, Harm HogenEsch. *Day's Veterinary Immunology: Principles and Practice*. 3rd edition. CRC Press, 2023. 432 p.
4. Cooke R.A. The immunology of allergic disease. *The American Journal of Medicine*. 1947. Vol. 3. № 5. P. 523–534.
5. Coombs P.R., Gell P.G. Classification of Allergic Reactions Responsible for Clinical Hypersensitivity and Disease. *Clinical Aspects of Immunology*. Ed. by Gell R.R. Oxford University Press, Oxford, 1968. P. 575–596.
6. David Wild. *The immunoassay handbook : theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques – 4th Edition*. Elsevier Science, 2013. 1036 p.
7. Elizabeth Villiers and Jelena Ristić. *Manual of Canine and Feline Clinical Pathology – 3rd ed*. BSAVA, 2016. 614 p.
8. *Handbook of vertebrate immunology / Paul Pierre Pastoret et al*. London: Academic Press, 1998. 674 p.
9. Hilal Ahmed Parray, Shivangi Shukla, Sweetly Samal et al. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International Immunopharmacology*. 2020. Vol. 85.
10. Jondal M., Holm G., Wigzell H. Surface markers on human T and B lymphocytes: A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep blood cells. *J. exp. Med.* 1972. Vol. 136. № 2. P. 207–215.
11. Kenichiro Yagi, Marie K. Holowaychuk. *Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking*. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2016. 387 p.
12. Kerman R.H., Smith R., Stefani S.S. et al. Active T-Rosette-forming Cells in the Peripheral Blood of Cancer Patients. *Cancer research*. 1976. Vol. 36. P. 3274–3278.
13. Mehmet Akkose, Cigdem Cebi Sen, Adnan Kirmit et al. Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) and progesterone concentrations in Holstein heifers following two methods of estrus synchronization. *Veterinaria México OA*. 2019. Vol. 6, No. 2.
14. Michael J. Day, Ronald D. Schultz. *Veterinary Immunology. Principles and Practice*. Second Edition. Apple Press, 2014. 336 p.
15. Michael J. Day. *Clinical immunology of the dog and cat*. Second Edition. Manson Publishing, 2008. 448 p.

16. Samantha Zaroff, Grace Tan. Hybridoma Technology: The Preferred Method for Monoclonal Antibody Generation for in vivo Applications. *BioTechniques*. 2019. Vol. 67(3). P. 90–92.
17. Tizard Ian R. *Veterinary immunology: 10 edition*. Elsevier, 2018. 552 p.
18. Абул К. Аббас, Ендрю Г. Ліхтман, Шив Піллай. *Основи імунології: функції та розлади імунної системи: посібник: пер. 6-го англ. вид. / наук. ред. пер.: Валентина Чоп'як*. Київ: ВСВ «Медицина», 2020. 328 с.
19. Анацький А.С. *Методичні вказівки до практичних занять з дисципліни «Генетична інженерія та основи імунології» для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»*. Кам'янське: Дніпровський держ. тех. університет, 2017. 62 с.
20. Баєва О.В., Церковнюк Л.С. *Практикум з мікробіології, вірусології, імунології. Морфологія і фізіологія мікроорганізмів. Інфекція. Імунітет*. Київ: Книга Плюс, 2023. 208 с.
21. *Біохімія: практикум / Д.О. Мельничук та ін.* Київ: ВЦ НУБіП України, 2012. 528 с.
22. *Ветеринарна імунологія : підручник (2-е вид.) / Мазуркевич А. Й. та ін.* Київ: ВЦ НУБіП України, 2024. 410 с.
23. Гундашева Д. *Биометодология за хуманното използване на лабораторни животни в медикобиологични и научни изследвания. Руководство за упражнения по организация на експеримента*. Стара Загора: КОТА, 2008. 120 с.
24. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. *Ветеринарна вірусологія: підручник (3-тє вид.)*. Одеса: Олді плюс, 2022. 416 с.
25. *Клінічна та лабораторна імунологія. Національний підручник / Кузнецова Л.В. та ін.* Київ: ООО «Поліграф плюс», 2012. 922 с.
26. Колесник А.В., Сікура А.О. *Лабораторний практикум з біохімії. Методичні рекомендації до лабораторних робіт зі змістового модулю «Білки і пептиди» для студентів біологічного факультету денної та заочної форми навчання*. Ужгород, 2023. 33 с.
27. *Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В.В. Влізло та ін.* Львів: СПОЛОМ, 2012. 764 с.
28. Лаповець Л.Є., Акімова В.М., Лебедь Г.Б. *Лабораторна імунологія: навчальний посібник*. Львів: Магнолія-2006, 2021. 400 с.
29. Люта В.А., Кононов О.В. *Практикум з мікробіології: навчальний посібник (4-е видання)*. Київ: ВСВ «Медицина», 2023. 184 с.
30. *Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини: Атлас / В. М. Запорожан та ін.* Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. 118 с.
31. Насібулліна Б.А., Гушчі С.Г., Олешко О.Я. *Робота з лабораторними тваринами: догляд та відтворення моделей патологічних станів (посібник)*. Одеса: «Поліграф», 2023. 96 с.
32. *Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Кожем'якін Ю. М. та ін.* Київ: Авіцена, 2002. 156 с.

33. Новосад Н.В. Лабораторні тварини і техніка біологічного експерименту: Навчально-методичний посібник для студентів біологічного факультету денного та заочного відділень (напрямок підготовки: «Біологія»; галузь знань: «Природничі науки»). Запоріжжя: ЗНУ, 2011. 85 с.
34. О.П. Мельниченко, І.Л. Якименко, Р.Л. Шевченко. Статистична обробка експериментальних даних: навч. посібник. Біла Церква, 2006. 34 с.
35. Основи патології за Роббінсом і Кумаром: пер. 11-го англ. вид. / Віней Кумар та ін.; наук. ред. пер. проф.: І. Сорокіна, С. Гичка, І. Давиденко. Київ: ВСВ «Медицина», 2024. 895 с.
36. Практикум з патофізіології тварин: навчальний посібник (2-е вид.) / Мазуркевич А.Й. та ін. Київ: ВЦ НУБіП України, 2025. 164 с.
37. Руководство за упражнения по иммунология / М. Андонова и др. Стара Загора: КОТАпринт, 2010. 82 с.
38. Серологічні методи діагностики бактеріальних та вірусних інфекцій: метод. вказівки до проведення лаб. занять з курсу «Імунологія» / Т. В. Гудзенко та ін. Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2018. 42 с.
39. Томчук В.А, Грищенко В.А., Цвіліховський В.І. Ветеринарна біохімія: навч. посібник. Київ: ЦП «Компринт», 2017. 568 с.
40. Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р. Великий практикум з імунології «Методологія імунної системи ссавців»: Навчально-методичний посібник. Запоріжжя: Сору Art, 2012. 152 с.

**Навчальне видання**

**МАЗУРКЕВИЧ** Анатолій Йосипович  
**ХАРКЕВИЧ** Юрій Олександрович  
**МАЛЮК** Микола Олексійович  
**КОВПАК** Віталій Васильович  
**САВЧУК** Тарас Любомирович

**Практикум з ветеринарної імунології**

**Навчальний посібник**

*Друге видання*

За редакцією доктора ветеринарних наук, професора Мазуркевича А.Й.

Підписано до друку 25.04.25. Формат 60x84\16  
Ум. друк. арк. 10,4 Наклад 100 прим. Зам. № 250389

Віддруковано у Національному університеті біоресурсів  
і природокористування України,  
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041.  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи  
ДК № 4097 від 17.06.2011