

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД  
«УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»  
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

**Петросова В.І., Сікура А.О., Кривцова М.В.**

## **ІМУНОЛОГІЯ**

**Навчально-методичний посібник**

**Ужгород–2023**

УДК 612.017(075.8)

**Петросова В.І., Сікура А.О. Кривцова М.В. Імунологія. Навчально-методичний посібник. – Ужгород, 2023. – 104 с.**

У навчально-методичному посібнику викладено основні відомості стосовно будови та функціонування імунної системи. Значна увага приділяється механізмам реалізації імунної відповіді, захисту від бактеріальних та вірусних інфекцій, розглядаються зміни під час патологічних процесів. Викладено коротке теоретичне обґрунтування кожного досліджу, а також запитання для самоперевірки з теоретичної та практичної частин.

Рекомендовано для студентів спеціальностей 091 Біологія, 014 Середня освіта (Біологія) та 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини) закладів вищої освіти.

Петросова В. І. – к.б.н., доцент кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології.  
Сікура Антоніна Олексіївна – старший викладач кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології.  
Кривцова Марина Валеріївна – д.б.н., професор кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології.

***Рецензенти:***

к.б.н., доц. Гасинець Я.С.

к.б.н., доц. Демчинська М.І.

**Рекомендовано до друку**

Науково- методичною комісією біологічного факультету  
Протокол № 2 від 3 листопада 2023 року.

## ВСТУП

Надзвичайно велике значення для сучасної біології та медицини має **імунологія** — наука про імунітет, що належить до найсучасніших, найскладніших, фундаментальних дисциплін. Імунологія включає наступні розділи: загальна (фундаментальна) імунологія, імуноцитологія, імуносерологія, імунохімія, імунобіологія, імуногенетика та імунопатологія. Стрімкий розвиток фундаментальної імунології за кілька останніх десятиріч сформував нову важливу дисципліну – клінічну імунологію. Це спосіб захисту організму від речовин і живих тіл з ознаками генетичної чужорідності, тобто цим самим біологічна роль імунітету і його органа — імунної системи — визначається як здійснення імунологічного нагляду над генетичною сталістю клітин організму, підтримка генетичного гомеостазу. Імунітет забезпечує протиінфекційний, протипухлинний захист, контролює диференціювання клітин організму. Імунна система контролює всі процеси життєдіяльності, від запліднення до природної зупинки індивідуального життя.

Імунологія дає медицині препарати і методи діагностики, профілактики і лікування багатьох захворювань. При цьому тільки імунологічні препарати — сироватки та імуноглобуліни — є препаратами для специфічної етіотропної терапії, тобто для лікування точно визначеного певного захворювання. Імунологія також дає сучасним природознавцям та медицині нові можливості у зв'язку з одержанням моноклональних антитіл, які є продуктом одного клону клітин і тому мономолекулярними та високо специфічними. Застосування моноклональних антитіл широко використовується в медицині, наприклад, у визначенні гормонів для діагностики ендокринних захворювань, ранньої діагностики вагітності (в межах двох тижнів після зачаття) тощо.

Багато захворювань розвиваються на фоні недостатньої функції імунітету або є наслідком недостатньої функції імунної системи, при деяких захворюваннях можуть розвиватися побічні ураження імунної системи, тому лікар повинен розуміти імунологічні механізми патогенезу, знати імунологічні методи діагностики і вміти використовувати результати імунологічних досліджень у практичній діяльності.

## Перелік основних термінів

Термін	Визначення
1	2
Імунітет	Імунітет – це сукупність процесів і механізмів, які забезпечують сталість (постійність) антигенного складу організму і його захист від інфекційних та інших чужорідних для нього агентів.
Неспецифічні фактори захисту (НФЗ)	До неспецифічних факторів захисту, які еволюційно виникли першими, ніж специфічний імунітет, належать неспецифічні механізми, фізико-хімічні, клітинні, гуморальні, а також фізіологічні захисні реакції, які забезпечують збереження сталості внутрішнього середовища і відновлення порушених функцій макроорганізму. НФЗ діють постійно, швидко, проти будь-якого чужорідного агента. До НФЗ відносяться бар'єрна функція шкіри, слизових оболонок, лімфатичних вузлів, бактерицидні речовини рідин організму (слини, сироватки крові та ін.), видільна функція, температурна реакція, антагоністичні властивості нормальної мікрофлори та інше.
Лізоцим	Лізоцим – це фермент (ацетилмурамінідаза), який руйнує пептидополісахариди клітинної стінки бактерій, в першу чергу грампозитивних, у яких клітинна стінка до 90% складається з муреїну. Лізоцим синтезується макрофагами і забезпечує бактерицидні властивості крові, слини, сліз.
Комплемент	Комплемент – це складний комплекс білків крові, який складається з 9 фракцій, кожна з яких має певну властивість. Комплемент синтезується клітинами печінки і виконує ряд функцій: 1)викликає лізис мікробів і інших клітин; 2)бере участь в специфічних імунологічних реакціях, нейтралізації вірусів; 3)посилює фагоцитоз, хемотаксис, запалення.
Пропердин	Пропердин – це високомолекулярний (230 тис. даль тон) білок сироватки крові, який приймає участь в альтернативному шляху активації комплекменту, знешкоджує деякі бактерії і віруси, стимулює фагоцитоз.
Фагоцитоз	Фагоцитоз – це найдавніша форма захисту організму, являє собою активне поглинання й перетравлення клітинами живих або вбитих мікроорганізмів чи інших сторонніх частинок, що потрапили до нього. Фагоцитарну функцію виконують два типи клітин: 1)мікрофаги (нейтрофіли, еозинофіли); 2)макрофаги рухливі (моноцити, гістіоцити тощо) і нерухливі (клітини селезінки, лімфатичної тканини, ендотеліоцити печінки, ендотелій кровоносних судин та ін.)

Незавершений фагоцитоз	Незавершений фагоцитоз – це фагоцитоз, при якому мікроорганізми поглинаються фагоцитами, але не гинуть і не перетравлюються, а іноді й розмножуються, викликаючи загибель фагоцитів.
Запальна реакція	Запальна реакція – це реакція, при якій із тканин вивільняються різні речовини (лейкотоксини, лейкопенічний фактор, гістамін, серотонін та ін.), під впливом яких активуються лейкоцити, які не дають розповсюджуватись бактеріям у тканині, крові і органах. Запалення зумовлює підвищення температури тіла, виникнення ацидозу й гіпоксії, що згубно діють на мікроорганізми.
Інтерферони	Інтерферони – це група індукцибельних низькомолекулярних білків, які здійснюють контрольну-регуляторні функції, направлені на збереження клітинного гомеостазу. Найважливішими з цих функцій є антивірусна, протипухлинна, імуномодельююча, антибактеріальна та радіопротективна. Інтерферон синтезується лімфоцитами, лейкоцитами, фібробластами, клітинами лімфатичних вузлів і поділяється на три типи: $\alpha$ - (лейкоцитарний), $\beta$ - (фібробластичний) і $\gamma$ -інтерферон (лімфоцитарний, або імунний). Індукторами синтезу інтерферону можуть бути віруси, бактерії, гриби, екстракти рослин, синтетичні сполуки, різні лікарські засоби, випромінювання та інше.
Білки гострої фази (БГФ)	Білки гострої фази – це велика група білків, які посилено продукуються в організмі під час виникнення запальних реакцій після інфікування чи ушкодження, при онтогенезі, вагітності і мають антимікробну дію, сприяють фагоцитозу, активації комплементу, формуванню та ліквідації запального вогнища. Основну масу БГФ складає С-реактивний білок, сироваткові амілоїди А і Р. Інші БГФ – це фактори згортання крові, металозв'язуючі білки, інгібітори протеаз і деякі компоненти комплементу. БГФ продукуються в печінці під дією цитокінів.
Бета-лізини	Бета-лізини – це термостабільні (руйнуються при температурі 65-70°C) бактерицидні фактори, які виявляють найбільшу активність по відношенню до анаеробів і спороутворюючих аеробів.
Інгібітори вірусної активності	Інгібітори вірусної активності – це перший гуморальний бар'єр, який перешкоджає контакту вірусу з чутливими клітинами. Термостабільні інгібітори здатні інактивувати інфекційні, токсичні, гемаглютинуючі властивості інгібіторочутливих штамів вірусів. Термостабільні – блокують з'єднання вірусу з рецепторами клітин хазяїна. Люди з високим рівнем інгібіторів в крові мають більшу стійкість до вірусних інфекцій.

Цитокіни	<p>Цитокіни – це гормоноподібні медіатори міжклітинних взаємодій, які продукуються різними клітинами організму і здатні впливати на функції інших або цих же груп клітин. Цитокіни – пептиди або глікопротеїди; регуляторами продукції цитокінів можуть бути інші цитокіни, гормони, простагландини, антигени і багато інших агентів, діючих на клітину</p>
Природні клітини–кілери (NK)	<p>(NK) клітини – є клітини з ефекторною протипухлинною, противірусною, протипаразитарною активністю. Вони здатні спонтанно, без попереднього контакту з антигеном, вбивати злоякісні пухлини, а також клітини уражені деякими вірусами або паразитами. Серед лейкоцитів крові людини NK-клітини складають від 2 до 12 %.</p>

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

**Тема: Техніка безпеки праці в імунологічній лабораторії. правила роботи в лабораторії з живими об'єктами та біологічним матеріалом**

**Мета роботи:** Засвоїти техніку безпеки праці в імунологічній лабораторії та ознайомитися з правилами роботи з живими об'єктами та біологічним матеріалом.

### **Завдання:**

1. Охарактеризувати вимоги до роботи в імунологічній лабораторії.
2. Обґрунтувати правила роботи в імунологічній лабораторії.
3. Проаналізувати способи імунізації лабораторних тварин.
4. Проаналізувати способи отримання крові лабораторних тварин.
5. Провести серійні розведення антисироватки та визначити титр антитіл макро- та мікротитруванням.

### **Теоретичні відомості**

#### ***1. Вимоги до роботи в імунологічній лабораторії***

Підготовці до імунологічних досліджень треба приділяти багато уваги. При виконанні імунологічних досліджень потрібна висока точність і стерильність. Лабораторія повинна мати гарну вентиляцію і розташовуватися в такому приміщенні, яке має стіни, підлогу, лабораторні столи, що легко миються. Норма площі для кожного співробітника становить 12–14 м<sup>2</sup>, а робоче місце – 0,9 м<sup>2</sup>.

У лабораторії повинна бути кімната для виділення і посіву бактерій, а також бокси для роботи з культурами клітин і тканин, спеціально обладнані місця для проведення імунохімічних і біохімічних досліджень. В окремих приміщеннях слід зберігати матеріали для роботи в імунологічній лабораторії, реактиви, мити лабораторний посуд, а також утримувати тварин.

В імунологічній лабораторії мають бути такі прилади: водяні бані, сушильні шафи, рН-метри, терези, центрифуги, холодильники, термостати, автоклави, мікроскопи, люмінесцентні мікроскопи, спектрофотометри, фотоколориметри, прилади для імуноелектрофорезу та імуноферментного аналізу, дозатори, гомогенізатори.

Також лабораторії мають бути оснащені таким посудом: пробірками різної місткості, колбами мірними, плоскодонними, лійками, ділільними лійками, хімічними склянками, мірними циліндрами, піпетками пастеровськими і градуйованими, кристалізаторами, ексікаторами, чашками Петрі, флаконами різної місткості.

Лабораторний посуд миють розчином миючого засобу, а потім занурюють у хромову суміш (50 г біхромату калію, 100 г концентрованої  $H_2SO_4$ , 1000 мл води), після чого промивають водою. Сушать посуд за кімнатної температури або у сушильній шафі, потім зберігають у спеціальних лабораторних шафах для посуду.

В імунологічній лабораторії використовують різноманітні матеріали: штативи, шприци різної місткості, ватно-марлеві і гумові пробки, капронову сітку, вату, марлю.

Стерилізацію проводять в автоклаві. Для цього їх кладуть у металічний стерилізатор, в який заливають дистильовану воду і кип'ятять упродовж 20–30 хв.

Для культивування лімфоцитів використовують такі середовища: Ігла, Хенкса, 199, RPMI-1640, обов'язковим компонентом для культивування є ембріональна теляча сироватка. В культуральне середовище обов'язково додають антибіотики для пригнічення росту бактерій.

## ***2. Правила роботи в імунологічній лабораторії***

1. Усі роботи проводять у халатах. При роботі з кров'ю використовують гумові рукавиці.
2. У лабораторії їдять у спеціально відведених місцях.
3. Після роботи миють руки з милом і використовують дезинфікуючі розчини.
4. Посуд та матеріали, які використовували для роботи, обробляють дезинфекційними розчинами або стерилізують у спеціальних апаратах.
5. Дезинфекційними розчинами обробляють робочі місця.

## ***3. Робота з тваринами в імунологічній лабораторії***

Для імунологічних досліджень найчастіше використовують мишей, щурів, морських свинок, кроликів, рідше баранів, віслюків, свиней, курей, качок. Тварин розміщують в клітках у віварії, для якого відводять сухі, добре освітлені і вентилявані приміщення. Підлогу у віварії роблять з нахилом до каналізаційного стоку, стіни обкладають кахлями. Вибір тварин для імунологічних дослідів має особливе значення. Необхідно зважати на загальну й індивідуальну специфіку розвитку імунологічної реакції організму на той чи інший антиген. Головними критеріями при виборі тварин є вид, лінія, розміри, вік, генетичні й анатомічні особливості. Для отримання адекватних результатів за мінімальної кількості тварин бажано використовувати чистолінійних тварин. Чистолінійними тваринами вважають гомозиготних тварин, отриманих у результаті схрещування близьких родичів упродовж 20 і більше поколінь. На сьогодні відомо майже 200 ліній мишей, 20 ліній щурів, 7 ліній морських



свинок і декілька ліній кроликів. У імунологічних дослідженнях частіше використовують мишей ліній СВА, С57BL, С3Н, щурів Вістар, Август. Чистолінійні тварини дуже примхливі та мають понижено життєздатність, тому вони вимагають особливих умов харчування, утримання і догляду. У дослідах треба використовувати лише здорових тварин однакової ваги, статі та віку.

Під час досліду тварин нумерують. При роботі з тваринами треба уникати стресових ситуацій, оскільки вони можуть змінити імунологічну реакцію організму на той чи інший антиген.

#### **4. Способи імунізації лабораторних тварин**

1. Внутрішньошкірне введення. Перед введенням антигену шерсть зі шкіри видаляють ножицями, шкіру обробляють спиртом і майже паралельно до поверхні тіла проколюють шкіру тонкою гострою голкою та вводять в одну точку 100 мкл розчинного антигену, який легко через лімфосудини досягає регіональних лімфатичних вузлів і індукує в них імунологічну відповідь.

2. Підшкірне введення. Місце для ін'єкції готують так само, як і при внутрішньошкірному введенні. Пальцями збирають шкіру в складку, біля її основи вводять голку, яку потім відхиляють убік, вливають розчин антигену і витягують її під гострим кутом, щоб не вилився розчин антигену. Цю ін'єкцію краще робити в бічну поверхню спини та живота. Максимальна доза для мишей – 1 мл, для щурів – 10 мл, морських свинок – 15 мл, кроликів – 30 мл. За таким способом імунізації антиген поширюється повільно, тому що підшкірна клітковина не має розвинених лімфатичних протоків.

3. Внутрішньом'язове введення. Антиген вводять у м'язи стегна, заздалегідь обробивши місце введення антигену спиртом. Для мишей максимальна доза – 0,5 мл, для щурів – 3 мл, морських свинок – 5 мл, кроликів – 8 мл.

4. Внутрішньочеревне введення. Тварин фіксують головою вниз, щоб знизити ймовірність проколу кишечника. Трохи відступивши від середньої лінії живота, у задній треті черевної порожнини проколюють стінку притупленою голкою. Кількість розчину антигену не повинна перевищувати для мишей 2 мл, щурів – 5 мл, морських свинок – 10 мл, кроликів – 30 мл.

5. Внутрішньовенне введення. Мишам і щурам вводять у бокову вену хвоста. Для набухання судин хвіст нагрівають на водяній бані за температури 50–55 °С. Кроликам антиген вводять у крайову вену вуха.

6. Інтраназальне введення антигену. Зафіксовану тварину наркотизують ефіром і за допомогою шприца або піпетки каплями вливають у ніс розчин антигену. Мишам вводять 0,03–0,05 мл антигену, щурам – 0,05–0,1 мл, морським свинкам – 0,2–0,4 мл, а кроликам – до 1 мл.

7. Оральне введення. Як правило, за такого способу імунізації антиген вводять через резиновий чи металевий зонд або через шприц, голка якого має головку у вигляді оливи.

### **5. Способи отримання крові у лабораторних тварин**

1. У мишей та щурів кров можна взяти з хвоста, перед цим нагрівши його на водяній бані за температури 50–55 °С, а потім надрізавши кінчик хвоста. Після забору крові рану обробляють розчином 3 %-го пероксиду водню або 5 %-м розчином йоду.

2. Досить поширеним способом забору крові у мишей та щурів є отримання крові із ретроорбітального венозного сплетіння за допомогою пастерівської піпетки. Пастерівською піпеткою проколюють кон'юнктиву внутрішнього кута ока і вводять її за очне яблуко на глибину 2–4 мм. Після проколу кров надходить у піпетку із венозного сплетіння.

3. Кров із серця можна брати у мишей, щурів, морських свинок, кролів. Перед цим тварину наркотизують, фіксують животом догори. На місці проколу вистригають шерсть, шкіру дезинфікують етанолом. Пальпацією визначають місце серцевого удару і відступивши 2–5 мм ліворуч від грудини, роблять прокол, вводять голку за напрямом середньої лінії на глибину 0,5–1,0 см. Після забору крові із серця тварині підшкірно вводять подвійний об'єм ізотонічного розчину хлориду натрію, підігрітого до температури тіла тварини.

4. Кров у кроликів можна взяти також із вушної крайової вени. Кров збирають стерильним шприцом або у пробірку.

### **Контрольні запитання**

1. Які правила роботи в імунологічній лабораторії?
2. Яких тварин використовують для імунологічних досліджень? Як необхідно з ними працювати, як їх утримувати?
3. Які існують способи імунізації тварин?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

### **Тема: Серологічні реакції. Реакція орієнтовної аглютинації.**

**Мета роботи:** ознайомитися з основними характеристиками та механізмами серологічних реакцій. Оволодіти методикою постановки реакції орієнтовної аглютинації.

**Завдання:** поставити реакцію аглютинації на склі для ідентифікації виділеної культури з монорецепторною аглютинуючою сироваткою.

**Прилади та матеріали:** предметне скельце, пастерівські піпетки, 0,85% розчин хлориду натрію, аглютинуюча сироватка, антиген – культура бактерій чи діагностикум, анти-А або анти-В антисироватка, серологічні піпетки об'ємом 1 мл, автоматичні мікропіпетки, пластикова мікротитрувальна планшета, пробірки розміром 12×75 мм, фізіологічний розчин, гепарин, 4 %-на суспензія еритроцитів II або III групи крові, центрифуга та пробірки до неї.

### **Теоретичні відомості**

Реакція аглютинації - перша серологічна реакція, відкрита у 1896 р. німецькими дослідниками Грубером та Дурхамом. Згодом були розроблені різні варіанти та модифікації РА, багато з яких завдяки високій специфічності та простоті постановки отримали широке застосування у лабораторній практиці:

- в медицині для діагностики багатьох інфекційних захворювань:
  - а) визначення виду вилученого від хворого мікроорганізму-збудника за допомоги діагностичних аглютинуючих сироваток - серологічна ідентифікація мікроорганізмів (застосовується у діагностиці кишкових інфекцій, холери, коклюшу тощо);
  - б) виявлення специфічних АГ та визначення їх титру у сироватці крові, інших рідинах та секретах у нормі та у різних патологічних станах – серологічна діагностика (застосовується при черевному тифі та паратифах - реакція Відаля; при бруцельозі - реакція Райта та Хедлсона; при висипному тифі - реакція Вейль-Фелікса);
- при переливанні крові для визначення групових АГ та Rh - АГ;
- у мікробіологічній практиці для ідентифікації мікроорганізмів, при вивченні їх антигенної структури.

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

Реакція аглютинації протікає у 2 фази:

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

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

Залежно від ознак АГ, який вступає у реакцію, та характеру аглотинату, що утворюється під час реакції, розрізняють дрібнозернисту (О-) та крупнопластівчасту (Н-) аглотинацію. Дрібнозернистий аглотинат утворюється при склеюванні мікробних тіл (наприклад бруцел, туляремійних бактерій) аглотинінами (АГ), специфічними до соматичного О-АГ. Така аглотинація буває компактною, тонкозернистою і протікає повільно, протягом 18-22 годин.

Аглотинація з утворенням великих пластівців проходить у джгутикових бактерій (наприклад, сальмонел, ешеріхій) при склеюванні бактеріальних клітин АГ до джгутикових Н-АГ. Такий аглотинат швидко (протягом 2-4 годин) осідає на дно пробірки.

Умови проведення реакції аглотинації:

- 1) визначення кількісного співвідношення АГ та АТ - феномен оптимуму;
- 2) наявність електроліту - фізіологічного розчину.

Реакції імунітету, тобто реакції між антигенами та антитілами *in vitro*, або серологічні реакції, широко застосовуються в мікробіологічних та серологічних (імунологічних) лабораторіях з метою **серодіагностики** бактеріальних, вірусних, рідше інших інфекційних хвороб, які дають можливість спостерігати динаміку накопичення антитіл під час хвороби, судити про напруженість постінфекційного або поствакцинального імунітету та **сероідентифікації** виділених бактеріальних, вірусних та інших культур різних мікроорганізмів для визначення їх виду чи серовару.

В реакціях імунітету антитілом є сироватка (хворої людини чи імунізованої тварини), тому їх називають серологічними (з лат. serum – сироватка).

Серологічні реакції проявляються при імунологічній відповідності (гомологічності) антигену та антитіл. В таких реакціях завжди використовують один компонент стандартний, а інший (який виявляють) одержують від хворого. Так, для серологічної діагностики застосовують стандартні антигени – **діагностикуми**, які є суспензією інактивованих, рідше живих, бактерій, вірусів або їх антигенів у ізотонічному розчині. Для серологічної ідентифікації застосовують стандартні **іmunні сироватки**. Їх одержують шляхом гіперімунізації тварин відповідними бактерійними чи вірусними антигенами, в результаті якої в крові з'являється значна кількість відповідних антитіл. Іmunну сироватку отримують з крові імунізованої тварини, очистивши її від баластних речовин, після чого визначають її титр – найбільше розведення, в якому ще проявляється реакція з відповідним антигеном. Набори різноманітних діагностикумів та іmunних діагностичних сироваток випускаються комерційними підприємствами і застосовуються в кожній бактеріологічній лабораторії.

Кожна серологічна реакція характеризується **специфічністю** та **чутливістю**. Під специфічністю розуміють здатність антигенів та антитіл реагувати лише з

гомологічними антитілами, що містяться в сироватці крові, або з гомологічними антигенами відповідно. Чим вища специфічність, тим менше псевдопозитивних та псевдонегативних результатів.

Специфічність та чутливість розраховують наступним чином:

$$\text{Специфічність} = \frac{\text{число} \cdot \text{негативних} \cdot \text{реакцій} \cdot \text{в} \cdot \text{контрольній} \cdot \text{групі}}{\text{число} \cdot \text{обстежених} \cdot \text{в} \cdot \text{контрольній} \cdot \text{групі}}$$

$$\text{Чутливість} = \frac{\text{число} \cdot \text{позитивних} \cdot \text{реакцій} \cdot \text{у} \cdot \text{дійсно} \cdot \text{хворих}}{\text{число} \cdot \text{обстежених} \cdot \text{хворих} \cdot \text{з} \cdot \text{підтвердженням} \cdot \text{діагнозом}}$$

В нормі чутливість та специфічність імунологічних методів наближається до 100%.

Процес взаємодії антигену та антитіла протікає у дві фази, що різняться механізмом та швидкістю перебігу. Перша фаза – специфічна, невидима, полягає у зв'язуванні детермінантної групи антигену з активним центром імуноглобуліну. Вона розвивається швидко. Пізніше, більш повільно розвивається неспецифічна, видима, фаза – зовнішній прояв реакції антигену з антитілом. Неспецифічна фаза здійснюється, як правило, в присутності електролітів, коли комплекс антигену з антитілом втрачає розчинність і випадає в осад. Залежно від властивостей антигену реакція проявляється у вигляді пластівців, якщо корпускулярні антигени утворюють агрегати з допомогою антитіл (феномен аглютинації) або помутніння (преципітату) – в результаті взаємодії розчинних (молекулярних) антигенів з антитілами та ін.

Імуноглобуліни за структурою, антигенними та імунобіологічними властивостями поділяються на п'ять класів – IgM, IgG, IgA, IgE, IgD, що відрізняються за амінокислотною послідовністю. В серологічних реакціях приймають участь антитіла, що належать головним чином до імуноглобулінів класів IgG та IgM.

Молекули усіх п'яти класів імуноглобулінів побудовані з поліпептидних ланцюгів: двох однакових важких ланцюгів H (від англ. heavy – важкий) та двох однакових легких ланцюгів L (від англ. light – легкий), що з'єднані між собою дисульфідними мітками (–S–S–).

Відповідно до кожного класу імуноглобулінів існує п'ять типів важких ланцюгів:  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$  і  $\delta$ , що мають молекулярну масу в межах 50-70 кД і різняться за натигеністю. Легкі ланцюги усіх п'яти класів є спільними і бувають двох типів:  $\kappa$  і  $\lambda$  з молекулярною вагою 23 кД. L-ланцюги Ig різних класів можуть сполучатися як з гомологічними, так і гетерологічними H-ланцюгами, однак, в одній і тій же молекулі можуть бути лише ідентичні L-ланцюги ( $\kappa$  чи  $\lambda$ ).

Як в H-, так і L-ланцюгах є варіабельна – V (від англ. various – різний) область, в якій послідовність амінокислот непостійна, і константна – C (від англ. constant –

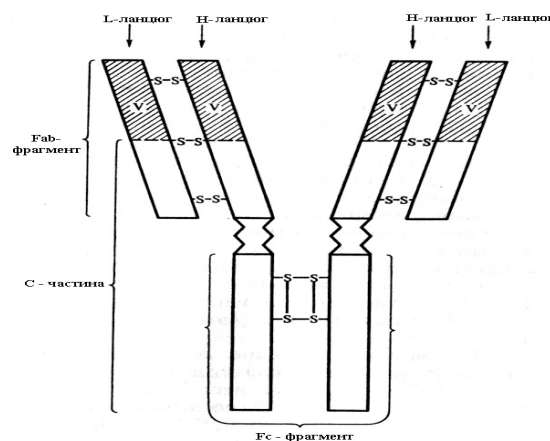
постійний) область з постійним складом амінокислот. В легких і важких ланцюгах розрізняють NH<sub>2</sub>- і COOH-кінцеві групи.

У гіперваріабельній ділянці Н- та L-ланцюгів формується активний центр, що зв'язується з антигенною детермінантою. Він займає близько 2% поверхні молекули. В молекулі IgG є два активних центри, які можуть зв'язати дві молекули антигену, тому молекула IgG є двохвалентною. Типова структура IgG приведена на рис. 1.

Інші класи імуноглобулінів відрізняються від IgG додатковими елементами організації їх молекули (рис.2). Так, IgM представлений пентамером, тобто складається з п'яти субодиниць, подібних за будовою до IgG, з'єднаних

Рис.1. Структура IgG

поліпептидним ланцюгом, який позначається буквою J (від англ. joining chain –



будова молекули). IgA буває звичайним, тобто мономерним, а також ди- і тримерним. Розрізняють IgA сироватковий та секреторний. В останньому молекула з'єднана з секреторним компонентом (SC), що виділяється епітеліальними клітинами і захищає IgA від руйнування ферментами. IgE властива висока цитофільність – здатність приєднуватися до тучних клітин та базофілів, в результаті чого клітини виділяють гістамін та гістаміноподібні речовини, що викликають розвиток алергічних реакцій. IgD схильний до агрегації, має додаткові дисульфідні зв'язки.

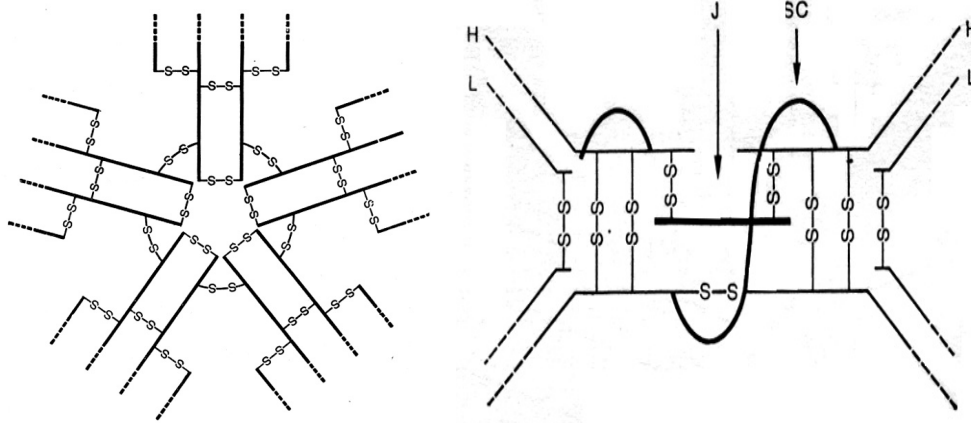


Рис. 2. Структура IgM та IgA

У відповідь на введення будь-якого антигену можуть вироблятися антитіла усіх п'яти класів. Зазвичай, спочатку виробляються IgM, потім IgG, решта дещо пізніше. основну масу сироваткових Ig (70-80%) складає IgG; IgA становить 10-15%, IgM – 5-10%, IgE – 0,002% і IgD – близько 0,2%. Рівень Ig з віком змінюється. При деяких патологічних розладах спостерігається відхилення рівня вмісту Ig в крові. Наприклад, концентрація IgG зростає при інфекційних захворюваннях, аутоімунних розладах, знижується при утворенні деяких пухлин. Вміст IgM зростає при багатьох інфекційних хворобах, знижується при деяких імунодефіцитних станах.

В залежності від стану антигену та умов, в яких взаємодіють антигени і антитіла, розрізняють реакції аглютинації, преципітації, лізису, зв'язування комплекменту та ін.

Реакцію аглютинації на склі ставлять здебільшого для ідентифікації бактерій, виділених в чистій культурі на чашках Петрі (в колоніях) або висіяних на скошений агар. Для постановки реакції аглютинації використовують корпускулярний антиген (суспензії бактерій, еритроцитів). Реакцію проводять на склі, пластмасових пластинках, у пробірках, лунках полістиролових планшет. Аглютинацію на склі або пластинках найчастіше застосовують для ідентифікації бактерій за допомогою відомих сироваток; аглютинацію в пробірках і планшетах – з метою виявлення титру аглютининів у сироватці хворого з допомогою відомих діагностикумів. Діагностикуми представляють собою вбиту суспензію бактерій певної концентрації (2 млрд. або 1 млрд. мікробних клітин в 1 мл). Найбільше розведення сироватки, при якому ще спостерігається аглютинація бактерій, приймається за її титр, який характеризує рівень специфічних аглютининів.

### ***Приготування серійних розведень***

Серійні розведення – це набір розведень, за якого фактор розведення є однаковим на кожному етапі. Серійні розведення використовуються для приготування розчинів з високим

ступенем розведення при застосуванні невеликої кількості пробірок та мінімального об'єму розчинника. Ця процедура часто використовується при визначенні титру антитіл у сироватці крові. Традиційно в цій методиці використовували серологічні піпетки, проте сьогодні широко застосовують автоматичні мікропіпетки. Необхідно приготувати серію подвоєнних розведень антисироватки за допомогою традиційних серологічних піпеток і автоматичних мікропіпеток та порівняти отримані результати.

## **Хід роботи**

### ***Реакція орієнтовної аглютинації по Мінкевичу***

На знежирене предметне скло пастерівською піпеткою наносять краплю сироватки в розведенні 1:20 та на певній відстані краплю фізіологічного розчину для контролю. В кожній краплі розмішують невелику кількість бактеріальної культури. Через декілька хвилин в краплях з сироваткою з'являється помітне злипання антигену (бактеріальної культури) з антитілами сироватки при відповідності антиген – антитіло. Контрольна крапля залишається рівномірно мутною.

### ***Макротитрування***

1. Готують розведення 1:10 анти-А (анти-В) антисироватки шляхом додавання 1 мл анти-А (анти-В) антисироватки до 9 мл фізіологічного розчину.

2. За відсутності комерційного препарату еритроців готують 4 %-ну суспензію еритроцитів, використовуючи кров відповідної групи. Кров збирають у центрифужну пробірку з позначками об'єму, додають гепарин як антикоагулянт та центрифугують упродовж 10 хв при 1500 об/хв. Обережно видаляють сироватку та додають фізіологічний розчин до еритроцитів, що залишилися на дні пробірки. Знову проводять центрифугування упродовж 10 хв та визначають колір верхнього шару фізіологічного розчину. Фізіологічний розчин видаляють та еритроцити ресуспендують в додатковому об'ємі фізіологічного розчину, при цьому всі еритроцити мають бути однорідно ресуспендовані. Процедуру повторюють тричі або доти, поки фізіологічний розчин стане прозорим. Визначають кінцевий об'єм ущільнених центрифугуванням еритроцитів та готують 4 %-ну суспензію еритроцитів, розбавляючи їх фізіологічним розчином.

3. Вісім пробірок розміром 12×75 мм позначають так: 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280.

4. Використовуючи серологічну піпетку, дають 0,2 мл фізіологічного розчину до пробірок з другої до восьмої.



5. За допомогою нової серологічної піпетки додають 0,2 мл анти-А (анти-В) антисироватки до першої та другої пробірок.

6. Новою піпеткою перемішують вміст другої пробірки шляхом вбирання та випускання рідини 5–10 разів.

7. 0,2 мл розчину переносять з другої пробірки до третьої та перемішують піпетуванням.

8. Послідовно повторюють процес внесення аліквот та перемішування вмісту всіх наступних пробірок (рис.3). Після перемішування вмісту восьмої пробірки видаляють 0,2 мл розчину для встановлення однакових об'ємів рідин у всіх пробірках.

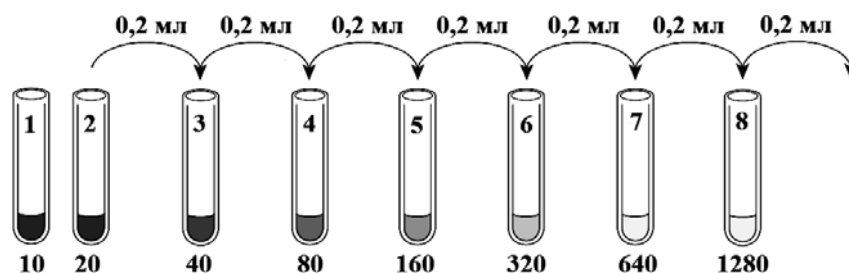


Рис. 3. Схема приготування серійного розведення антисироватки

9. До кожної пробірки додають 0,2 мл 4 %-ї суспензії еритроцитів відповідної групи крові.

10. Пробірки центрифугують упродовж 30–45 с.

11. Аглотинацію визначають, обережно струшуючи ущільнені центрифугуванням еритроцити на дні пробірок. Позитивна реакція визначається, якщо клітини залишаються зчепленими разом при струшуванні. Розмір кластера зчеплених еритроцитів зменшується у пробірках з високим ступенем розведення антисироватки, однак будь-який видимий клітинний кластер вважається позитивним результатом.

### ***Мікротитрування***

1. Маркером позначають один ряд лунок пластикової мікротитрувальної планшети так: 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280.

2. За допомогою автоматичної мікропіпетки додають 20 мкл фізіологічного розчину до лунок планшети з другої до восьмої.

3. Мікропіпеткою з новим наконечником додають 20 мкл анти-А (анти-В) антисироватки до першої та другої лунок.

4. Використовуючи новий наконечник мікропіпетки, перемішують вміст другої лунки шляхом декількаразового вбирання та випускання розчину. Потім відбирають 20 мкл розчину з другої лунки та переносять його до третьої лунки.

5. Процедуру розведення повторюють для всіх лунок, щоразу

використовуючи новий наконечник мікропіпетки.

6. До кожної позначеної лунки додають 20 мкл 4 %-ї суспензії еритроцитів II або III групи крові.

7. Планшету струшують колоподібними рухами на поверхні столу упродовж 1 хв та витримують за кімнатної температури упродовж 30 хв.

8. Визначають лунки, де відбулася аглютинація еритроцитів, тримаючи планшету проти джерела світла. Рівні краї суспензії на дні лунки вказують на відсутність аглютинації, а нерівні, зубчаті, шорсткі краї свідчать про те, що аглютинація відбулася (рис. 4).

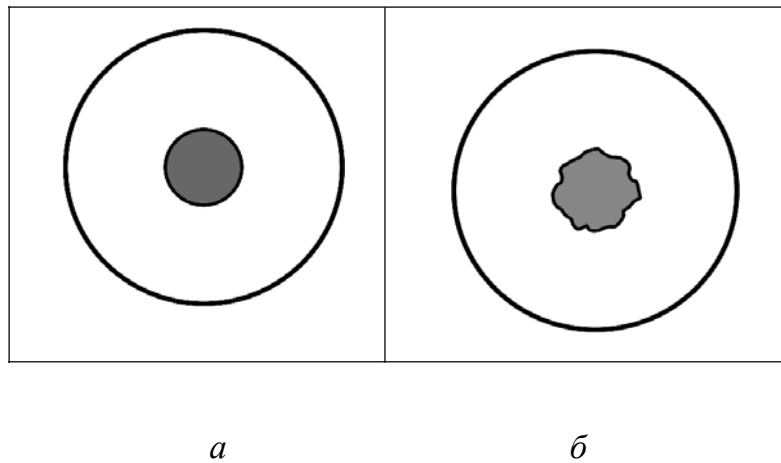


Рис. 4. Результати аглютинації в мікротитрувальній планшеті:  
*a* – негативний результат; *б* – позитивний результат

### **Обробка експериментальних даних**

Титр антитіл визначається за останньою пробіркою з видимою аглютинацією. Титр записується як значення, зворотне до розведення, наприклад, якщо пробірка 1:160 є останньою з позитивним результатом, титр записується як 160.

Титр антитіл при мікротитруванні визначається за останньою лункою, де відбулася аглютинація.

### **Аналіз отриманих результатів**

Результати дослідів з макро- та мікротитрування порівнюють. Визначений двома методами титр антитіл може відрізнитися лише на одне розведення.

### Контрольні запитання

1. Реакції імунітету, їх застосування
2. Основні властивості антигенів. Умови антигенності.
3. Сучасне уявлення про антитіла.
4. Реакція аглютинації, її практичне застосування.
5. Методичні варіанти реакції аглютинації.
6. Роль електроліту в реакції аглютинації.
7. Отримання монорецепторних аглютинуючих сироваток.
8. У чому полягають переваги та недоліки макро- і мікротитрування?

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

#### **Тема. Реакція об'ємної (розгорнутої) аглютинації. Реакція преципітації (РП)**

**Мета:** Оволодіти методикою постановки реакції об'ємної аглютинації та реакцією преципітації, які широко застосовуються в серологічних дослідженнях.

#### **Завдання:**

1. Поставити розгорнуту реакцію аглютинації для визначення титру антитіл.
2. Поставити реакцію кільцепреципітації для визначення природи антитіл у досліджуваному матеріалі.

**Прилади та матеріали:** пробірки, градуйовані піпетки, пастерівські піпетки, преципітаційні пробірки, 0,85% розчин хлориду натрію, аглютинуюча сироватка, антиген – культура бактерій чи діагностикум.

#### **Теоретичні відомості**

Реакція аглютинації – проста за постановкою, при якій проходить склеювання корпускулярних антигенів – аглютиногенів (мікроорганізмів, еритроцитів чи інших клітин) під впливом антитіл (аглютинінів) з утворенням специфічного осаду чи пластівців (аглютинату).

Клітини з приєднаними до них аглютинінами з'єднуються в агрегати, внаслідок чого рівномірна суспензія клітин, спочатку мутна, перетворюється у пластівці, які зависають у прозорій рідині або осідають на дно.

В аглютинації приймають участь виключно поверхневі антигени, які доступні антитілам. Антигени, розміщені у внутрішніх структурах клітини, не приймають участі в цій реакції. Механізм аглютинації полягає в тому, що під впливом іонів електроліту зменшується негативний поверхневий заряд бактеріальних клітин, і вони можуть зблизитись на таку відстань, при якій один активний центр двохвалентного антитіла взаємодіє з детермінантною групою одного антигену, а другий активний

центр - з антигенною детермінантою другого антигену. Ця структура має форму решітки. Надлишок або недостача антитіл перешкоджає прояву аглютинації.

Макроскопічний і мікроскопічний вигляд аглютинації бактерій залежить від виду поверхневих антигенів, які приймають участь у реакції. Аглютиніни, які реагують з O-соматичним антигеном, утворюють дрібнозернисту аглютинацію. Соматична аглютинація в пробірках завершується через 24 години, при цьому виникають компактні зерна, крупинки, які важко розбити при струшуванні. При мікроскопії видно, що бактерії склеюються полюсами, утворюючи сітку.

В аглютинації з поверхневими H-антигенами спостерігається склеювання бактерій між собою всією поверхнею, що дає рівномірний осад. У певній мірі макроскопічне H-аглютинація нагадує соматичну.

Сироватки, які містять антитіла проти H-антигенів (джгутикових) бактерій, аглютинують значно швидше, при цьому утворюється крупнозернистий осад. Вже через 30-40 хв. окремі конгломерати бактерій у вигляді пластівців вільно осідають на дно пробірки.

H-аглютиніни безпосередньо взаємодіють з джгутиками бактерій, що призводить до втрати їх рухливості.

Антигеном може служити культура тільки в S-формі, яка на чашках з агаром утворює гладкі блискучі колонії з рівними краями і дає гомогенну суспензію у фізіологічному розчині. Штами, що проявляють схильність до дисоціації і відщеплюють R-форми, дають спонтанну аглютинацію і не можуть бути використані як антиген. Неспецифічна аглютинація може виникнути також внаслідок впливу на мікробну суспензію кислот, які знімають однойменний розряд на поверхні мікробних клітин і спричиняють їх злипання (кислотна аглютинація).

Реакцію аглютинації застосовують для виявлення антитіл в сироватці хворих при черевному тифі і паратифах (реакція Відаля), бруцельозі (реакція Райта і Хеддлсона), туляремії, висипному тифі (реакція Вейгля) та деяких інших захворюваннях. Антитілом при цьому є сироватка хворого, а антигеном – відомий збудник захворювання.

При ідентифікації мікроорганізмів антигеном є їх завис, а антитілом – відома імунна сироватка. Цю реакцію застосовують для діагностики кишкових інфекцій, коклюшу та ін.

За своєю сутністю реакція преципітації аналогічна реакції аглютинації, проте вона відрізняється за характером антигенів: в реакції аглютинації вони корпускулярні (цілі клітини), а в реакції преципітації - молекулярні, в розчинному стані. Реакцію преципітації використовують у тих випадках, коли користуються розчиненими антигенами: лізатами, екстрактами, гаптенами. При взаємодії такого антигену з антитілом в присутності електролітів (фізіологічний розчин) утворюється преципітат у вигляді каламутного "кільця" або осаду. Реакцію преципітації застосовують для визначення антигену при діагностиці деяких інфекцій (сибірська виразка, менінгіт, пневмонія та ін.); в судовій медицині – для визначення видової належності крові,

сперми і т.д.; в санітарно-гігієнічних дослідженнях – при встановленні фальсифікації продуктів; з її допомогою визначають філогенетичну спорідненість тварин і рослин.

Реакція преципітації значно більш чутлива від реакції аглютинації й дозволяє виявити антиген у дуже малих кількостях. Її можна проводити в рідкому і щільному середовищах. Обов'язковою умовою постановки реакції в рідкому середовищі є прозорість компонентів.

За титр реакції приймають найбільше розведення антигену, яке дає позитивний результат. Як правило, використовують нерозведену сироватку або у розведенні 1:5 – 1:10. Антигеном можуть бути розчинні речовини білкової або ліпоїдно-полісахаридної природи (повні антигени, гаптени, екстракти або лізати мікроорганізмів або інших клітин).

Реакція відбувається при змішуванні розчинів антигену й антитіла або нашаруванні одного компонента на інший. В останньому випадку на межі двох реагентів утворюється преципітат у вигляді кільця. Тому така реакція одержала назву *реакції кільцепреципітації*.

### Хід роботи

#### *Реакція об'ємної (розгорнутої) аглютинації.*

Реакцію називають об'ємною, якщо сироватку розливають градуйованими піпетками у точно відміряних об'ємах. У пробірку наливають 0,1 мл сироватки та 4,9 мл фізіологічного розчину для одержання робочого розведення сироватки 1:50, з якого готують ряд послідовних двократних розведень. Для цього кладуть у штатив потрібну кількість пробірок однакового діаметру, висоти і конфігурації дна і на кожній вказують ступінь розведення сироватки. В усі пробірки, крім першої та останньої наливають по 1 мл фізіологічного розчину. В першу, другу та останню пробірку, яка служить контролем сироватки, додають по 1 мл сироватки в розведенні 1:50. Після перемішування з другої пробірку у третю переносять 1 мл, звідти – у четверту і т.д., з останнього розведення сироватки 1 мл виливають у дезінфікуючий розчин для зрівноваження об'ємів.

Після того, як зроблені розведення сироватки, у всі пробірки, крім контролю сироватки, вносять по 2 краплі антигену (суспензії бактерій, або діагностикум). Рідина в пробірках при цьому рівномірно мутніє, в тому числі в передостанній пробірці, яка служить контролем антигену. Контроль сироватки залишається прозорим.

Пробірки старанно струшують і на 2 години поміщають у термостат (37°C), роблять попередній облік реакції, потім витримують 18-20 годин при кімнатній температурі, після чого проводять кінцевий облік.

Компоненти, мл	Номери пробірок					Контроль	
	1	2	3	4	5	антиген	сироватки
0,85% розчин хлориду натрію	-	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Сироватка в розведенні 1:50	1,0	1,0→	1,0→	1,0→	1,0↓		1,0
Антиген	2 кр.	2 кр.	2 кр	2 кр	2 кр	2 кр	-
Отримані розведення сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	-	1:50
Одержані результати							

Інтенсивність реакції оцінюють таким чином:

- ++++ всі клітини осіли, рідина прозора. Результат реакції різко позитивний.
- +++ осад менший, рідина не повністю прозора. Результат реакції позитивний.
- ++ незначний осад, рідина непрозора. Результат реакції сумнівний.
- + дуже незначний осад, рідина мутна. Результат реакції сумнівний
- осаду немає, рідина рівномірно мутна, як і в контролі антигену. У випадку контролю сироватки рідина повністю прозора. Результат реакції негативний.

**Реакція преципітації.** У вузькі преципітаційні пробірки наливають 0,5 мл преципітуючої сироватки, а потім обережно пастерівською піпеткою нашаровують по стінці пробірки відповідний антиген. Пробірку при цьому тримають злегка нахиленою. У випадку позитивної реакції на межі двох рідин з'являється видиме на темному фоні кільце молочно-білого кольору.

**Проста імунодифузія (реакція Удена).** Агаровий гель, який містить преципітуючу сироватку, поміщають у вузькі пробірки і зверху нашаровують розчин антигена. Дифундуючи в гель, антиген зв'язується з відповідними антитілами, утворюючи мутні лінії преципітації. Розміщення ліній в агарі визначається концентрацією відповідного антигена.

**Подвійна радіальна імунодифузія за Ухтерлоні.** В агарі, який розлитий тонким шаром в чашках Петрі або на предметних скельцях, за допомогою спеціальних штампів роблять круглі лунки на однаковій відстані одна від одної (4-10 мм). У лунки вносять досліджувану сироватку і розчин антигену в різних розведеннях або різні антигени. Із лунок антигени й антитіла дифундують назустріч один одному, і в точці їх оптимального співвідношення утворюється преципітат у вигляді тоненьких білих ліній. Якщо в сироватці є різні антитіла або антигени декількох видів, з'являються декілька ліній преципітації.

Однією із різновидностей реакції преципітації в гелі є **проста радіальна імунодифузія за Манчіні**. За її допомогою визначають концентрацію імуноглобулінів у сироватці крові.

Методика постановки реакції наступна: розтоплений агар при температурі 56 °С змішують з відповідною антисироваткою і виливають у чашку Петрі. Після застигання з допомогою трафарету роблять лунки. У кожен дослідну лунку вносять по 0,5 мл досліджуваного антигену. Чашки поміщають у вологу камеру (ексикатор) на 24-48 год. при 4 °С і оцінюють результати реакції. Вимірюють діаметри кілець преципітації навколо лунок. Враховують, що у певному інтервалі концентрації імуноглобулінів діаметр кільця прямо пропорційний логарифму концентрації імуноглобулінів.

#### **Платівкова реакція аглютинації Хедлсона.**

Методика постановки реакції: чисту знежирену скляну платівку (20x12 см) розділити восковим олівцем на шість квадратів, у п'ять із них (1-5) нанести нерозбавлену досліджувану сироватку у кількості 0,08; 0,04; 0,02; 0,01; 0,002 мл. Додати до перших чотирьох доз сироватки бруцельозний діагностикум - антиген Хедлсона у кількості 0,03 мл, що містить 2x10<sup>10</sup> клітин у 1 мл; до п'ятої додати 0,03 мл фізіологічного розчину (контроль сироватки). У шостий квадрат нанести антиген Хедлсона (бруцельозний діагностикум) та фізіологічний розчин (контроль антигену) по 0,03 мл кожного компоненту. Тримавши скло, коловими рухами перемішати сироватку з антигеном. Для прискорення реакції сироватки з антигеном суміш злегка підігріти (1-2 хв.), високо тримавши над полум'ям пальника.

#### **Схема постановки реакції Хедлсона**

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

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

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

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

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

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

“+” - ледь помітні дрібні зерна - сліди аглютинації, рідина непрозора;“-” - відсутність зерен аглютинації, рідина рівномірно мутна.

Для діагностичної оцінки результатів використовують таку схему:

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

### ***Пробіркова об’ємна розгорнута реакція Райта.***

Методика постановки реакції. Приготувати основне розбавлення (1:50) досліджуваної сироватки: внести у пробірку 0,2 мл нерозведеної сироватки, додати до неї 9,8 мл фізіологічного розчину, перемішати.

У штативі поставити ряд чистих аглютинаційних або звичайних пробірок, на кожній з них восковим олівцем написати ступінь розведення (від 1:100 до 1:3200), на двох останніх - відмітити контроль сироватки (КС) та контроль АГ (КАГ)

### **Схема постановки розгорнутої реакції аглютинації Райта**

Інгредієнти	Розведення сироватки							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	КС	КАГ
Фізіологічний р-н,мл	1	1	1	1	1	1	-	1
Досліджувана сироватка (1:50),мл	1•	1•	1•	1•	1•	1•	1:50	-
Бруцельозний діагностикум,мл	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1
Облік результату	++++	++++	+++	++	+	-	-	-

• • - напрям титрування

В усі пробірки, окрім № 7, розлити по 1 мл фізіологічного розчину. З основного розведення сироватки (1:50) методом перекатки приготувати ряд послідовних (кратних двом) розбавлень від 1:100 до 1:3200 в аглютинаційних пробірках, встановлених у штативі. Для цього у першу пробірку наливають 1 мл основного розбавлення сироватки (1:50), після ретельного струшування вмісту, 1 мл переносять



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

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

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

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

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

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

**Зустрічний імуноелектрофорез.** Імуноелектрофорез є поєднанням двох методів - електрофорезу в гелі і наступної після нього подвійної імунодифузії.

Для проведення реакції імуноелектрофорезу використовують скляні пластинки, предметні скельця, на які наносять тонкий шар агару. Спочатку антигени розміщують у центрі пластинки і розділяють їх в електричному полі. Потім у канавку, зроблену в агарі паралельно до лінії розділу антигенів, вносять специфічну сироватку. Дифундуючи назустріч один одному, антигени і антитіла у місці контакту утворюють дуги преципітації.

### **Контрольні запитання**

1. Механізм реакції преципітації, її практичне застосування.
2. Що таке гаптен і чим він відрізняється від повного антигену.
3. Методи одержання антигенів бактерій та їхнє практичне застосування.
4. Яким антигеном користуються при дослідженні сироватки хворого? При допомозі якої сироватки визначають вид невідомого мікроба?
5. У яких випадках утворюється пластівцеподібний осад?
6. У яких випадках утворюється дрібнозернистий осад?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

**Тема: Реакції непрямой (пасивної) гемаглютинації (РНГА)**

**Завдання:** поставити РНГ з еритроцитарним діагностикомом.

**Прилади та матеріали:** пробірки, градуйовані піпетки, 0,85% розчин хлориду натрію, імунна сироватка, еритроцитарний діагностиком.

### Теоретичні відомості

До серологічних реакцій відносять також реакцію гемаглютинації, в якій еритроцити випадають в осад (аглютинують) при взаємодії з відповідними антитілами (гемаглютинінами). Цю реакцію використовують для визначення груп крові.

Деякі мікроорганізми, окрім специфічних видових антигенів, містять і групові антигени, спільні для споріднених видів бактерій. При парентеральному введенні таких бактерій в організм тварин і людини з'являються антитіла – аглютиніни двох видів: специфічні, що відповідають видовим антигенам, та неспецифічні, які виникають під дією групових антигенів.

Сироватка, що містить групові аглютиніни, аглютинуює споріднені між собою мікробні види, що мають спільний груповий антиген.

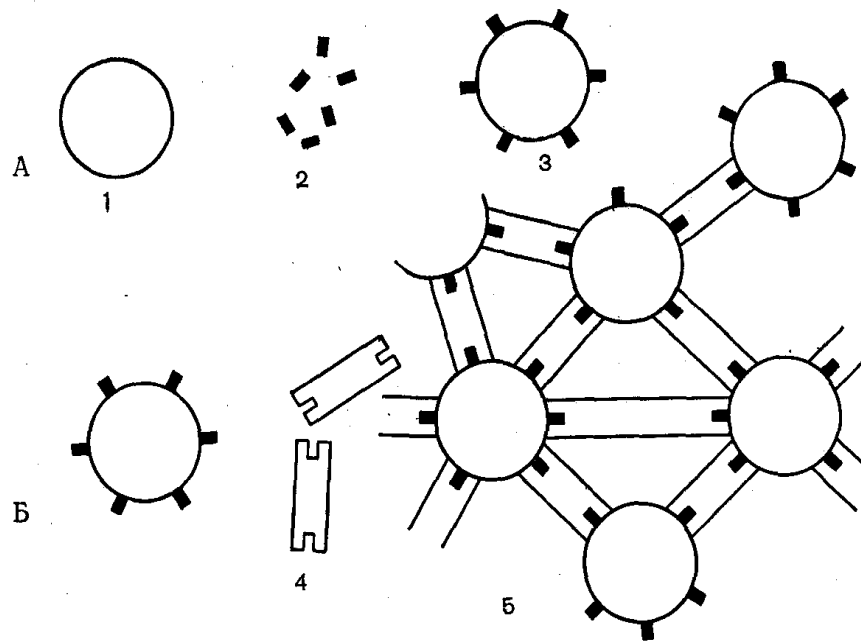
Реакція аглютинації, при якій один і той же мікроб аглютинуюється різними сироватками або одна сироватка аглютинуює різні мікроби, отримала назву групової.

Звичайно, що групова реакція аглютинації ускладнює серологічну діагностику захворювання та визначення виду мікроба. Для її усунення використовують метод адсорбції аглютинінів, запропонований італійським вченим Кастеллані.

Під непрямую (пасивною) аглютинацією розуміють реакцію, в якій антитіла взаємодіють з антигенами, попередньо адсорбованими на клітинах або частинах. В якості сорбентів застосовують частинки целюлози, латексу або еритроцити різних тварин (реакція непрямой гемаглютинації – РНГА).

РНГА є своєрідною модифікацією РА і базується на властивостях еритроцитів адсорбувати на своїй поверхні розчинні антигени. Молекули антигену, адсорбовані на поверхні еритроцитів, утворюють еритроцитарні діагностикоми. Такі "навантажені" антигенами еритроцити здатні до аглютинації імунною сироваткою, специфічною для даного антигену. Еритроцити склеюються і випадають у осад, утворюючи на дні пробірки гемаглютинат – осад з нерівним фестончастим краєм. Ця реакція широко застосовується завдяки високій чутливості, експресивності, вона проста за постановкою і дозволяє виявити мінімальну кількість антигенів або антитіл.

В деяких випадках користуються зворотнім варіантом, тобто адсорбують на еритроцитах антитіла. Такі діагностикоми називають антитільними, а реакції, де вони застосовуються – оберненими. Їх застосовують для індикації патогенних мікробів у зовнішньому середовищі.



**Схема пасивної реакції гемаглютинації (РПГА).**

А — одержання еритроцитарного діагностикуму; Б — РПГА: 1 — еритроцит, 2 — антиген, 3 — еритроцитарний діагностикум, 4 — антитіло до еритроцитарного діагностикуму, 5 — аглютинат.

### **Хід роботи**

Готують ряд послідовних двократних розведень сироватки. Дві останні пробірки є контрольними - контроль сироватки та контроль антигену. Потім в усі пробірки додають по 0,25 мл еритроцитарного діагностикуму і вміщують у термостат на 2-3 години.

При позитивній реакції еритроцити осідають на дно пробірки, утворюючи осад із зазубреними краями, що нагадує перевернуту парасолу; при негативній – осідають, утворюючи круглий компактний осад з рівними краями.

Компоненти, мл	Номери пробірок					Контроль	
	1	2	3	4	5	1-й	2-й
0,85% розчин хлориду натрію	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5
Сироватка в розведенні 1:25	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5 ↓	0,5	
Отримані розведення сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800		
Еритроцитарний діагностикум	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25		0,25
Інкубація при 37 <sup>0</sup> С протягом 2 год. у термостаті							
Результати							

Оцінюють реакцію за 4-х плюсовою системою:

++++, +++ - всі або майже всі еритроцити аглютинувались – реакція позитивна

++ - не всі еритроцити аглютиновані, осад меншого розміру, подібний до мережива – реакція слабопозитивна

+ - осад має вигляд компактного диску з нерівними краями - реакція сумнівна

### Контрольні запитання

1. Визначення поняття “іmunітет”. Види і форми іmunітету.
2. Неспецифічні фактори і механізми іmunітету.
3. Про що свідчить позитивний результат РГА між еритроцитами та досліджуваним на наявність вірусів матеріалом?
4. Чи відбудеться аглютинація еритроцитів, якщо до них додати вірус та відповідну до нього противірусну сироватку?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

**Тема: Реакції нейтралізації токсину протитоксичною сироваткою. Реакція флокуляції.**

**Мета:** Оволодіти методикою постановки реакцій нейтралізації та флокуляції.

**Завдання:**

1. Ознайомитися з варіантами постановки реакцій нейтралізації.
2. Поставити реакцію флокуляції для визначення сили досліджуваної сироватки за відомим токсином. Розрахувати титр сироватки, виходячи з результатів реакції.

**Прилади та матеріали:** пробірки, пастерівські піпетки, 0,85% розчин хлориду натрію, імунна сироватка, еритроцитарний діагностикум.

### Теоретичні відомості

#### *Токсини.*

В основі патогенності переважної більшості мікробів – збудників інфекційних хвороб людського, тваринного і рослинного організмів – лежить їх токсиногенність, тобто здатність утворювати токсини – речовини різного хімічного складу, які можуть зумовлювати специфічні розлади і навіть смерть інфікованого організму. За характером утворення токсини поділяють на екзотоксини й ендотоксини, які відрізняються між собою за хімічною структурою. Екзотоксини – це отруйні речовини, що виділяються в середовище мікробною клітиною як продукт життєдіяльності. Вони є простими білками, що характеризуються різко вираженою токсичністю, тобто у дуже малих дозах токсично діють на сприйнятливі організми. Екзотоксини характеризуються вибірковістю – здатністю уражати окремі тканини й органи організму; наприклад, дифтерійний екзотоксин уражає надниркові залози і серцевий м'яз, а правцевий – рухомі нервові клітини. Вони нестійкі щодо високої температури, світла, кисню, дуже швидко руйнуються при кип'ятінні. До мікробів з найбільшою здатністю виділяти екзотоксини відносять збудників: правця, дифтерії, ботулізму, газової анаеробної інфекції, холери та ін. Збудники черевного тифу, паратифів, гонореї та багато інших патогенних грамнегативних бактерій містять ендотоксини.

Ендотоксини сильніше зв'язані з тілом бактеріальної клітини, менш токсичні, вражають організм у великих дозах, латентний період вираховується годинами, вибіркова дія слабовиражена. Вони термостійкі: деякі ендотоксини витримують кип'ятіння і автоклавування при 120<sup>0</sup>С на протязі 30 хв. Ендотоксини – порівняно слабкі антигени. Антигенні властивості ендотоксину визначаються ліпополісахаридним комплексом бактеріальної клітинної стінки.

Деякі бактерії одночасно утворюють як білкові токсини, так і ендотоксини (кишкова паличка, холерний вібріон). Отже, екзо- та ендотоксини відрізняються за цілим рядом властивостей, а не лише за характером утворення.

## Порівняльна характеристика токсинів

Ендотоксини	Екзотоксини
Складаються із гліцидоліпіднопротеїнових комплексів, гліциноліпідних сполук і полісахаридних специфічних комплексів	Складаються із білкових речовин, володіють властивостями ферментів, деякі одержано в кристалічному стані
Міцно зв'язані з тілом бактеріальної клітини	Легко дифундують із клітини в навколишнє середовище
Менш токсичні, вибіркова дія виражена слабо	Високотоксичні, характеризуються вибірковою шкодою деяких органів і тканин
Термостабільні	Термолабільні (деякі термостабільні)
Під дією формаліну і температури знешкоджуються лише частково	Під дією 0,3-0,4% формаліну і температури 38-50 <sup>0</sup> С переходять в анатоксини

На сьогоднішній день відомо вже більш як 50 білкових екзотоксинів бактерій, які поділяють на три класи:

Клас А – екзотоксини, що виділяються в навколишнє середовище – холероген (*Vibrio cholerae*), гемолізину  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  – (*Staphylococcus aureus*), гістотоксин, дермонекротоксин (*Corynebacterium diphtheriae*) тощо.

Клас В – частково виділяються в навколишнє середовище і частково зв'язані з мікробною клітиною екзотоксини – лабільний токсин (*Bordetella pertussis*), тетаноспазмін (*Clostridium tetani*), нейротоксин (*Clostridium botulinum*).

Клас С – екзотоксини, зв'язані з мікробною клітиною – ентеротоксини (*Shigella dysenteriae*), "мишачий токсин" (*Yersinia pestis*).

### **Визначення сили токсину.**

Силу токсину чи самого збудника (на прикладі стафілококу) визначають величиною летальних доз, тобто найменшими дозами збудника чи токсину, що викликають загибель 95% (D<sub>1m</sub>), 100% (D<sub>cl</sub>) чи 50% (LD<sub>50</sub>) експериментальних тварин. Всі умови визначення вірулентності в лабораторній практиці строго стандартизують: вид. стат. вага тварин, умови утримування, харчування тощо.

Ряд десятикратних розведень токсину (чи культури бактерій) вводять декільком групам тварин. Через певний час відмічають кількість тварин, що загинули в кожній групі і здійснюють розрахунки за формулою Кербера для визначення LD<sub>50</sub>:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - S (\sum L_i - 0,5),$$

де S – логарифм відношення кожної наступної дози до попередньої; L<sub>i</sub> – відношення числа тварин, що загинули від даної дози, до загальної кількості тварин в групі:

$\Sigma L_i$  – сума значень  $L_i$ , знайдених для всіх досліджених доз;  $N$  – загальне число всіх випробуваних доз;  $D_N$  – максимальна із усіх досліджених доз.

### ***Анатоксини***

Анатоксини – препарати, які одержують із бактеріальних білкових токсинів при дії на них формаліну (0,3-0,5%) протягом 3-4 тижнів при температурі 39-40° С. Після такої обробки токсин втрачає отруйні властивості, але зберігає антигенні. Одержані анатоксини очищують, концентрують і адсорбують на гідроокисі алюмінію. При імунізації препаратами з анатоксинами в організмі виникають антитіла (антитоксини), які здатні нейтралізувати дію відповідних токсинів. Активність анатоксинів визначають за їх здатністю вступати в реакцію із специфічною антитоксичною сироваткою. Їх виражають в одиницях зв'язування (ОЗ) і флокуляційних одиницях. Силу анатоксину визначають у реакції флокуляції, яка за механізмом подібна до реакції преципітації. Початков, ініціальна флокуляція відбувається при чіткій відповідності кількості антигена й антитіла. Анатоксини вживаються для активної імунізації людей і тварин з метою створення активного антитоксичного імунітету.

### ***Антитоксини.***

Антитоксини – це антитіла, які здатні взаємодіяти з відповідними токсинами і нейтралізувати їх. Більш ніж 50 видів мікроорганізмів здатні виробляти екзотоксини. Для реакції нейтралізації токсину антитоксином необхідні певні умови: кількісні співвідношення, необхідний час взаємодії, оптимальна температура. В основі нейтралізації токсину антитоксином лежить фізико-хімічна реакція. З'єднання токсину з антитоксином в умовах досліду *in vitro* проявляється у феномені флокуляції – помутніння в пробірці, яка містить суміш токсину і антитоксину. Феномен флокуляції є специфічною реакцією і його використовують у виробництві сироваток для виявлення ступені активності або сили дії антитоксичних сироваток.

За одиницю виміру сили дії антитоксичної сироватки приймають міжнародну одиницю (МО). МО – така доза антитоксичної сироватки, яка здатна нейтралізувати певну кількість  $D_{1m}$  токсину. У відповідності з рекомендацією Комітету експертів ВООЗ по стандартизації біологічних препаратів 1 МО рахується сумішшю певної кількості міліграмів гіперімунної кінської сироватки в ізотонічному розчині хлориду натрію з 66% (по об'єму) гліцерину. Еталони таких сироваток, висушених ліофілізацією, зберігаються в Міжнародній лабораторії біологічних стандартів Державного інституту сироваток у Копенгагені

В процесі знешкодження токсину приймають участь вільні аміногрупи токсинів; їх зв'язування супроводжується втратою токсичності.

Лікувальна дія антитоксичних сироваток залежить не тільки від їх активності, кількості міжнародних одиниць у 1 мл, але й авідності – швидкості, повноти і міцності з'єднання між токсином і антитоксином.

### ***Методи отримання і титрування сироваток.***

Антитоксичні сироватки одержують шляхом гіперімунізації тварин (коней). Після повного курсу імунізації у крові тварин визначають кількість антитоксинів, потім проводять часткове або повне кровопускання, кров збирають у бутлі, де вона згортається. Над згустком відокремлюється прозора жовтувата рідина – сироватка.

Отриману сироватку перевіряють на стерильність, апірогенність, (препарат не повинен викликати підвищення температури у тварин при парентеральному введенні) і встановлюють її титр, тобто визначають кількість міжнародних одиниць у 1 мл.

Титрування антитоксичних сироваток здійснюють при допомозі певних стандартів токсинів на тваринах: морських свинках, білих мишах, кролях, вводячи їм суміш певної кількості стандартного токсину і різних доз досліджуваної сироватки. Титрування, наприклад, антитоксичної протидифтерійної сироватки проводять на тваринах (*in vivo*) і методом флокуляції (*in vitro*).

Антитоксичні сироватки застосовують з лікувальною та профілактичною метою при правці, ботулізмі, анаеробній інфекції, дифтерії, укусах змій.

## **Хід роботи**

### ***Реакція флокуляції.***

В результаті взаємодії токсину (чи анатоксину) і антитоксичної сироватки спостерігається випадання флокулянту. Найбільш інтенсивна і рання "ініціальна" флокуляція відбувається в пробірці, де антиген і антитіло знаходяться в еквівалентних співвідношеннях. Реакція складається із двох етапів:

1. За стандартною сироваткою встановлюють кількість Lf (*Limes flocculationis*) в 1 мл токсину. Lf токсину визначається його кількістю, що дає "ініціальну" флокуляцію з 1 міжнародних одиниць (МО) сироватки. Встановивши силу токсину, визначають силу сироватки.

2. Відомої сили токсин і досліджувану антитоксичну сироватку розливають в пробірки в певному об'ємі (див. нижченаведена таблицю). Пробірки витримують на водяній бані при температурі 45 °С на протязі 30 хвилин до випадання флокулянту в одній із них. Ініціальна флокуляція проявляється в тій пробірці, де кількість Lf токсину відповідає кількості МО сироватки.

В результаті взаємодії токсину і протитоксичної сироватки спостерігається утворення флокулянту. Найбільш інтенсивна "ініціальна" флокуляція відбувається в пробірці, де антиген і антитіло знаходяться в еквівалентних співвідношеннях. Для постановки реакції використовують токсин відомої сили (Lf). *Limes flocculationis* токсину визначається його кількістю, яка дає ініціальну флокуляцію з 1 міжнародною одиницею (МО) сироватки. Токсин і сироватку змішують в різних співвідношеннях.



Компоненти, мл	№ пробірок					
	1	2	3	4	5	6
Токсин (в 1 мл - 20 Lf)	2	2	2	2	2	2
Сироватка	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Результат						

За ініціальною флокуляцією роблять розрахунок. Наприклад, якщо флокуляція відбулась в 4-й пробірці, значить в 0,4 мл сироватки міститься 40 МО. Отже, в 1 мл сироватки міститься  $40:0,4=100$  МО.

### Контрольні запитання

1. Механізм антитоксичного імунітету.
2. Як отримують антитоксичні сироватки?
3. Одиниці виміру антитоксичних сироваток.
4. Як отримують анатоксини, для чого їх застосовують?
5. Які токсини відносять до групи екзотоксинів?
6. Які токсини відносять до групи ендотоксинів?
7. Охарактеризуйте метод визначення гемотоксичної активності бактерій.
8. Як визначають токсичну дію в дослідях *in vivo*? *in vitro*?
9. Які сполуки метаболічної активності бактерій відносять до анатоксинів?
10. Значення анатоксинів в профілактиці інфекційних захворювань.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

### Тема: Реакції лізису

**Мета:** Оволодіти методикою постановки реакції бактеріолізу.

### Завдання:

1. Поставити реакцію бактеріолізу *in vitro*.
2. Ознайомитися з методами постановки реакцій бактеріолізу *in vivo*.

**Прилади та матеріали:** пробірки, піпетки, 0,85% розчин хлориду натрію, сироватка нормальна нативна, сироватка нормальна інактивована, сироватка імунна нативна, сироватка імунна інактивована, антиген, комплемент.

## Теоретичні відомості

Однією із найважливіших захисних властивостей імунної сироватки при інфекції є її властивість розчиняти мікроорганізми або інші клітинні елементи, що надійшли в організм. Для реакції лізису (розчинення) необхідні антиген, антитіло й комплемент. Специфічні антитіла, що забезпечують лізис клітин, називають лізинами. Залежно від того, проти яких клітин спрямована дія лізинів, вони мають свої назви: проти бактерій - бактеріолізину, спірохет - спірохетолізину, еритроцитів - гемолізину, проти інших клітин - цитолізину. Як антитіло (лізин) використовують специфічну сироватку або сироватку хворого. Антигеном можуть бути мікроорганізми, еритроцити або інші клітини.

Лізину здатні проявляти свою лізуючу дію на антиген тільки в присутності додаткового фактору – комплементу (з лат. complementum – доповнення). Комплемент при утворенні комплексу клітина (антиген) - антитіло, зв'язується з ним, активується за класичним шляхом і викликає розчинення клітини. Без комплементу лізис клітини неможливий. Комплемент є складовою частиною будь-якої свіжої сироватки як нормальної так і імунної; при зберіганні або нагріванні сироватки комплемент руйнується. Таким чином, реакція лізису відбувається при участі двох компонентів: одного специфічного, який міститься в імунній сироватці (антитіло), та іншого неспецифічного, притаманного будь-якій сироватці як імунній, так і нормальній (комплемент).

Щойно отримана з організму імунна сироватка здатна до лізису, оскільки вона містить і антитіло, і комплемент. Якщо ж користуються імунною сироваткою, яка втратила комплемент внаслідок зберігання або нагрівання, то лізис буде відбуватися тільки при умові додавання комплементу, тобто свіжої сироватки. Для забезпечення сталості результатів імунну сироватку заздалегідь інактивують нагріванням при 56°C на протязі 30 хвилин (для руйнування комплементу, що в ній міститься) і додають до неї визначену певну кількість комплементу; в якості комплементу, як правило, використовують свіжу сироватку нормальної морської свинки.

Розрізняють декілька реакцій лізису: бактеріоліз, гемоліз, цитоліз.

## Хід роботи

### *Реакція бактеріолізу.*

Реакція бактеріолізу полягає в тому, що при сполученні імунної сироватки з відповідними бактеріями в присутності комплементу відбувається лізис мікроорганізмів.

Для постановки реакції бактеріолізу *in vitro* використовують різні сироватки: нормальні та імунні, нативні та інактивовані.

Постановка реакції бактеріолізу in vitro. В стерильній пробірці готують суміш із культури, імунної сироватки і комплементу. В контрольну пробірку замість імунної сироватки додають такий же об'єм нормальної сироватки. Пробірки вміщують на 2 години в термостат при 37°C, після чого роблять посів 0,1 мл на чашки з поживним середовищем і залишають посіви у термостаті на добу.

<b>Компоненти</b>	<b>№1</b>	<b>№2</b>	<b>№3</b>	<b>№4</b>	<b>№5</b>
Сироватка нормальна нативна, мл	1				
Сироватка нормальна інактивована, мл		1			
Сироватка імунна нативна, мл			1		1
Сироватка імунна інактивована, мл				1	
Антиген, мл	1	1	1	1	1
Комплемент, мл	1	1	1	1	
Фізіологічний розчин, мл	1	1	1	1	1
Результат реакції					

В посіві із контрольної пробірки спостерігається надмірний ріст культури, а в посіві із пробірки, що містила імунну сироватку, кількість колоній значно менша, можлива і повна відсутність росту бактерій.

#### **Контрольні запитання**

1. Які компоненти беруть участь у реакції лізису?
2. Характеристика комплементу, його фракцій.
3. Шляхи активації комплементу.
4. Роль комплементу в літичних реакціях.
5. Механізм реакції лізису.
6. З якою метою проводять тестування гемолітичної сироватки?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

**Тема: Реакція зв'язування комплементу.**

**Мета:** засвоєння методики постановки РЗК, що широко застосовується в клініці та експериментальних дослідженнях.

**Завдання: 1.** Поставити РЗК з досліджуваною сироваткою хворого, врахувати результати.

**Прилади та матеріали:** пробірки, піпетки, сироватка хворого, сироватка здорового, антиген, комплемент, гемолітична сироватка, еритроцити барана, фізіологічний розчин.

### Теоретичні відомості

#### *Реакція зв'язування комплементу.*

Унікальна здатність комплементу специфічно зв'язуватися з різними по своїй природі комплексами антиген + антитіло знайшла широке застосування в реакції зв'язування комплементу (РЗК). Особлива перевага РЗК полягає в тому, що природа антигену, який приймає участь у ній (корпускулярний чи розчинний), не має значення, тому що комплемент зв'язується з Fc-фрагментом будь-якого антитіла, що відноситься до Ig G і Ig M, незалежно від його антитільної специфічності. Крім того, РЗК дуже чутлива: вона знайшла широке застосування в серодіагностиці та ідентифікації антигенів, особливо при діагностиці сифілісу (реакція Вассермана) та інших спірохетозів, при рикетсіозах і вірусних інфекціях. РЗК дозволяє знайти кількість антитіл у 10 разів менше, ніж, наприклад, у реакції преципітації. РЗК була запропонована в 1901 р. Ж. Борде і Жангу. В основі її лежать дві властивості комплементу:

- 1) здатність зв'язуватися з комплексом антиген + антитіло;
- 2) лізис еритроцитів, використаних для одержання гемолітичної сироватки.

РЗК ставлять у два етапи, і в ній відповідно беруть участь дві системи - досвідчена, чи діагностична, і індикаторна. Діагностична система складається з досліджуваної (чи діагностичної) сироватки, що перед постановкою реакції прогрівають при 56°C в плин 30 хв. для інактивації наявного в ній комплементу, і антигену. До цієї системи додають стандартний комплемент. Його джерелом служить свіжа чи висушена сироватка морської свинки. Суміш інкубують при 37°C в плин однієї години. Якщо в досліджуваній сироватці є антитіла, відбудеться їхня взаємодія з доданим антигеном, і комплекси антиген, що утворюються, + антитіло зв'яжуть доданий комплемент. Якщо ж у сироватці антитіла відсутні, утворення комплексу антиген + антитіло не відбудеться, і комплемент залишиться вільним. Ніяких видимих проявів зв'язування комплементу на цій стадії реакції звичайно немає. Тому для з'ясування питання, чи відбулося ні зв'язування комплементу, додають другу, індикаторну систему (інактивована гемолітична сироватка + еритроцити барана), і суміш усіх компонентів

РЗК знову інкубують при 37°C в плин 30-60 хв., після чого оцінюють результати реакції. У випадку, якщо комплемент зв'язався на першій стадії, у діагностичній системі, тобто в сироватці хворого маються антитіла, і відбулося зв'язування комплексу комплексу антитіло + антиген, лізису еритроцитів не буде - РЗК позитивна: рідина безбарвна, на дні пробірки осад еритроцитів. Якщо ж у сироватці специфічні антитіла відсутні і зв'язування комплексу в діагностичній системі не відбудеться, тобто РЗК негативна, то невитрачений у діагностичній системі комплемент зв'язується з комплексом еритроцити + антитіла індикаторної системи і відбудеться гемоліз - у пробірці "лакова кров", осаду еритроцитів немає. Інтенсивність РЗК оцінюють за чотирихресною системою в залежності від ступеня затримки гемолізу і наявності осаду еритроцитів. Реакція супроводжується відповідними контролями: контроль сироватки (без антигену) і контроль антигену (без сироватки), тому що деякі сироватки і деякі антигени мають антикомплемтарну дію. Перед постановкою РЗК усі компоненти, що беруть участь у ній, за винятком досліджуваної чи сироватки антигену, піддаються ретельному титруванню. Особливо важливо ввести в реакцію точну дозу комплексу, тому що його чи недостача надлишок можуть привести до помилкових результатів. Титром комплексу є те його мінімальна кількість, що у присутності робочої дози гемолітичної сироватки забезпечує повне розчинення еритроцитів. Для постановки основного дослідження беруть дозу комплексу, збільшену на 20-25% у порівнянні з установленим титром. Титром гемолітичної сироватки є те її максимальне розведення, що, будучи змішано з рівним обсягом 10% розчину комплексу, цілком гемолізує відповідну дозу еритроцитів протягом 1 год. при 37°C. В основний дослід беруть сироватку, розведену до 1/3 свого титру.

### **Хід роботи**

#### ***Техніка постановки РЗК.***

Специфічна взаємодія антитіла і антигену супроводиться адсорбцією комплексу. Зважаючи на те, що адсорбція комплексу комплексом антиген - антитіло не піддається візуальному спостереженню як індикатор, в цю реакцію вводять другу систему (гемолітичну), що складається з суспензії еритроцитів і відповідної гемолітичної сироватки, з допомогою якої виявляють зв'язування комплексу. Реакція зв'язування комплексу відзначається високою специфічністю і вираженою чутливістю; її застосовують у діагностиці сифілісу (реакція Вассермана), висипного тифу, ряду вірусних захворювань.

РЗК проводиться в два етапи за участю двох систем:

1) перша система - антиген + антитіло + комплемент - обумовлює зв'язування комплексу в тому випадку, коли антитіло відповідає антигену. В випадку невідповідності антитіла антигену комплемент залишається вільним;

2) друга система - специфічна гемолітична сироватка + відповідні еритроцити - є індикатором, що демонструє результат реакції в першій системі: в випадку позитивного результату в першій системі, що завершується зв'язуванням комплементу, друга система залишиться без видимих змін, тобто в ній не відбудеться гемолізу в зв'язку з відсутністю вільного комплементу. У випадку негативного результату в першій системі у другій відбудеться гемоліз (див. таблицю).

Інгредієнти в мл	№ пробірки		
	1	2	3
Сироватка хворого	0,5	-	-
Сироватка здорового	-	0,5	-
Антиген	0,5	0,5	-
Комплемент	0,5	0,5	-
Гемолітична сироватка	-	-	1,5
Еритроцити барана	-	-	1,5
В термостат на 1 годину			
Гемолітична система	1,0	1,0	-
В термостат на 1 годину			
Результат	Відсутній гемоліз	Є гемоліз ("лакова кров")	Відсутній гемоліз

### Контрольні запитання

1. В чому полягає принцип РЗК і які компоненти приймають у ній участь?
2. Які системи приймають участь у РЗК?
3. З чого складається і яку роль в РЗК виконує гемолітична система?
4. Скільки фаз у РЗК?
5. Про що свідчить відсутність гемолізу у РЗК?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

**Тема: Фагоцитоз**

**Мета:** Ознайомитись з основними формами прояву імунної відповіді.

**Завдання:** Визначення фагоцитарних показників і опсонічного індексу в експерименті *in vitro*.

**Прилади та матеріали:** пробірки, піпетки, сироватка, культура бактерій, лейкоцити, предметні скельця, бактеріальна петля, спиртівка, мікроскоп.

### Теоретичні відомості

#### *Види і форми імунітету*

Ще в глибоку давнину було відомо, що людський або тваринний організм, який переніс ту чи іншу хворобу, вдруге на неї майже ніколи не хворіє. З розвитком мікробіології стало відомо також, що не завжди проникнення в організм збудника інфекції веде до захворювання. Це залежить від багатьох причин і, насамперед, від стану організму. В нормальному стані організм набуває активної специфічної стійкості проти того чи іншого виду інфекції. Стан організму, за якого він протистоїть шкідливій дії патогенних мікробів, їхніх токсинів або будь-яких інших сторонніх тіл, назвали імунітетом (від лат. *immunitans* - звільнення). Видатний вітчизняний вчений І.І. Мечников головну роль у природженій і набутій несприйнятливості до інфекції відводив організму і його специфічним клітинам – фагоцитам.

Імунологія вивчає широке коло біологічних явищ: механізми захисту від інфекцій, пухлин, встановлення генетичних зв'язків між тваринами і рослинами, питання імуногенетики, імуногематології, імуногістохімії, імунодіагностики, імунотерапії, імунопрофілактики тощо. Особливо інтенсивного розвитку набула молекулярна імунологія, яка вивчає хімічні, біохімічні і молекулярно - біологічні основи реакцій імунітету. Імунітет – це спосіб захисту організму від живих тіл і речовин, які несуть на собі ознаки генетичної чужорідності. Ознаки роботи чужорідного геному несуть бактерії, віруси, найпростіші, черви, білки, клітини, тканини, змінені аутоантигени (в тому числі ракові). Головним завданням імунітету є знищення клітин, що генетично відрізняються від власних (чи чужа клітина чи клітина свого тіла, яка змінилася в генетичному відношенні).

Види імунітету. Розрізняють такі види імунітету: природжений (видовий або спадковий) і набутий (природний і штучний).

Природжений імунітет - стійкість організму до певних патогенних агентів, яка властива даному виду і передається спадково. Вважають, що цей вид імунітету зв'язаний з особливостями генотипу даного конкретного виду макроорганізму. Прикладом видового імунітету може бути несприйнятливість людини до чуми рогаатої

худоби, курячої холери, а тварин - до скарлатини, кору. Видовий імунітет є наслідком тривалої еволюції взаємовідносин організму і патогену і залежить від тих біологічних особливостей цих організмів, які сформувалися у процесі історичного розвитку в ході природного добору, мінливості й генетичної адаптації до умов зовнішнього середовища. В основі механізмів природженого імунітету до інфекцій лежить відсутність у клітинах макроорганізму рецепторів і субстратів, які необхідні для адсорбції і розмноження збудника інфекції, наявність речовин, що блокують його репродукцію, здатність організму-хазяїна синтезувати різні інгібітори у відповідь на проникнення патогенних мікроорганізмів. Під набутим імунітетом розуміють специфічний захист проти генетично чужорідних субстанцій (антигенів), який здійснюється імунною системою організму у вигляді вироблення антитіл або нагромадження сенсibiliзованих лімфоцитів. Набутий імунітет виробляється в результаті перенесеного захворювання або вакцинації здорового організму. Набутий імунітет поділяють на природний і штучний. Природний у свою чергу - на активний і пасивний. Природний активний імунітет може виникати після перенесення інфекції і тривати місяцями, роками або все життя. Природний пасивний імунітет має новонароджений організм, набуваючи його від матері в період внутрішньоутробного розвитку. Набутий штучний імунітет виробляється в результаті активної або пасивної імунізації організму. Штучний активний імунітет формується під впливом вакцин і може тривати від кількох місяців до кількох років. Імунітет, зумовлений введенням в організм готових захисних речовин (антитіл) у вигляді сироваток, дістав назву набутого штучного пасивного імунітету. Набутий імунітет не успадковується. Він формується по відношенню до конкретного виду патогенного мікроба в результаті контакту з ним, тобто є суворо специфічним. Цей вид імунітету дуже стійкий: наприклад, після віспи він зберігається все життя, а після кору і висипного тифу - довгі роки.

Неспецифічна резистентність (опірність) - це відносний рівень природженої стійкості організму незалежно від виду факторів: механічних, фізичних, хімічних, біологічних, в чому числі до мікробів, їхніх токсинів тощо. Резистентність може бути властивою всьому організмові або його окремим системам, тканинам і органам. Вона пов'язана з анатомо-фізіологічними і генетичними особливостями організму, з його механічними гуморальними і клітинними неспецифічними факторами захисту та ін. Неспецифічна резистентність організму зумовлена такими факторами захисту, як бар'єрна функція шкіри, слизових оболонок, лімфатичних вузлів, бактерицидних речовин слини, крові, видільна система, температурна реакція тощо. Ці фактори не потребують спеціальної перебудови, а знешкоджують чужорідні тіла і речовини в основному за рахунок механічної або фізико-хімічної дії.

Шкіра і слизові оболонки є першим бар'єром на шляху проникнення хвороботворних мікробів в організм. В нормальному непошкодженому стані шкіра не тільки надійно виконує механічну захисну функцію, а й має бактерицидні властивості.



Кисла реакція поту пов'язана з наявністю в ньому оцтової, молочної і жирних кислот, які, виявляють бактерицидну дію на різні мікроби.

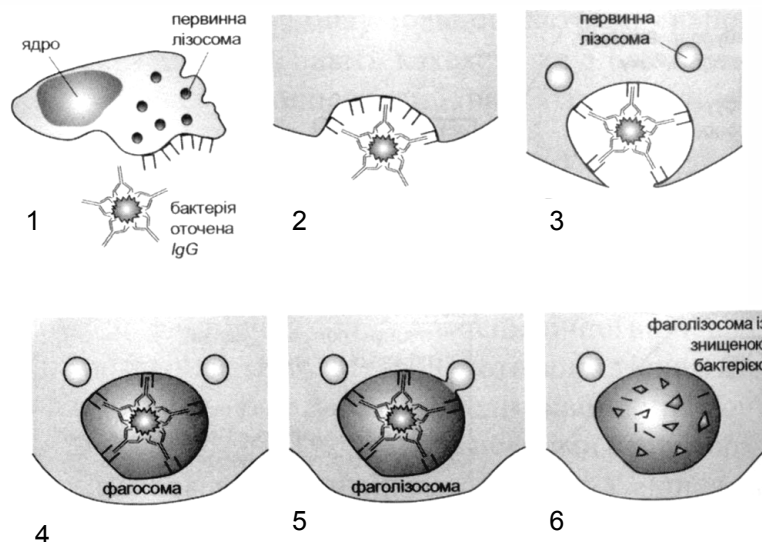
Подібно до шкіри, захисні функції мають слизові оболонки очей, носа, рота, шлунка та інших органів. У слизовиділеннях, слині, крові, тканинах і органах міститься лізоцим (ацетилмурамідаза) а також секреторний імуноглобулін. Патогенні мікроби, які проникають у слизові оболонки, постійно знешкоджуються бактерицидною дією лізоциму. Ряд інгібіторів, що виробляються клітинами органів і тканин, гіалуронова кислота, яка входить до складу основної речовини сполучної тканини, також мають бактерицидні властивості. Такі самі властивості щодо кишкових інфекцій і харчових токсикоінфекцій виявлено у шлунковому соку. Якщо патогенним мікроорганізмам все ж таки вдалося проникнути крізь шкіру і слизові оболонки, то захисну функцію починають виконувати лімфатичні вузли, в яких мікроби затримуються, фагоцитуються, а при розвитку запалення гинуть.

### ***Фагоцитоз.***

Засновником вчення про роль клітин у виробленні організму проти інфекції (фагоцитарна теорія імунітету) є І.І. Мечников, який довів, що несприйнятливність організму до інфекційних хвороб пов'язана з діяльністю спеціальних рухомих клітин (білих кров'яних тілець) - фагоцитів. Клітини, які можуть здійснювати фагоцитоз, І.І. Мечников поділив на дві групи: мікрофаги (нейтрофіли і еозинофіли) і макрофаги. Мікрофаги першими проникають в осередок запалення. Макрофаги в свою чергу поділяють на рухомі (моноцити крові, полібласти, гістоцити тощо) і нерухомі (клітини селезінки, купферівські клітини печінки, клітини лімфатичних вузлів, кісткового мозку та ін.). Саме макрофаги (за І.І. Мечниковим) створюють природну резистентність. ВОЗ в 1973 р. запропонувала всі високофагоцитуючі клітини виділити в систему мононуклеарних фагоцитів (СМФ), яка складається із клітин - попередників і промоноцитів кісткового мозку, моноцитів крові і макрофагів, що походять з них.

***Механізм фагоцитозу.*** І.І. Мечников розрізняв ряд стадій фагоцитарного процесу, яких тепер виділяють п'ять:

- 1) наближення фагоцита до мікроба;
- 2) поглинання мікроба;
- 3) утворення фagosоми і злиття з лізосоною;
- 4) внутрішньоклітинна інактивація мікроба;
- 5) ферментативне перетравлення збудника і видалення його решток.



### Імунофагоцитоз

1 – хемотаксис; 2 – адгезія; 3 – ендоцитоз; 4 – утворення фагосоми;  
5 – утворення фаголізосоми; 6 – внутрішньоклітинне перетравлення

При завершеному фагоцитозі відбувається злиття вакуолі з лізосомами клітини, які містять активні протеолітичні ферменти. При деяких інфекційних захворюваннях (туберкульоз, черевний тиф, мікози) може спостерігатися незавершений фагоцитоз, при якому збудники інфекції поглинаються фагоцитами, але не гинуть і не перетравлюються, а в окремих випадках навіть розмножуються. Описано і виштовхування фагоцитованих мікробів (наприклад, стафілококів). Фагоцитоз більш енергійно відбувається в імунному організмі, ніж в неімунному. Макрофаги, які здійснюють фагоцитоз, беруть участь в імунологічних реакціях. Доведено рефлекторне підвищення фагоцитозу і регуляцію його за допомогою медіаторів, що свідчить про роль нервової системи у фагоцитозі. Однак є чимало даних про те, що в людини і вищих тварин нервова система - це апарат нових механізмів захисту, які не зв'язані з фагоцитозом. Видільна функція дихальної системи, нирок, шлунка, кишків, різних залоз тощо також є проявом неспецифічної опірності і сприяє звільненню організму від різних шкідливих факторів. До неспецифічних факторів відносять захисні адаптаційні механізми, які дістали назву стресу (Г.Сельє). Стресорами можуть бути холод, тепло, радіація, патогени та їхні токсини, інші фактори, здатні викликати подразнення організму. В захисних реакціях організму певну роль відіграє так зване явище інтерференції (взаємне посилення або послаблення) бактерій. Наприклад, доведено, що при зараженні тварин збудниками бруцельозу у них розвивається несприйнятливність до бацил сибірки.

### Хід роботи

Деякі антитіла, зокрема IgG1, IgG3, IgM, здатні стимулювати фагоцитарну активність лейкоцитів, покращуючи поглинання чужерідних антигенів. Такі антитіла отримали назву **опсонинів** (від грец. *opsoniazo* – забезпечувати їжею, харчувати). Вони не тільки здатні своїми паратопами зв'язувати епітопи антигенів, але й можуть за допомогою Fc-фрагментів прикріплюватись до спеціальних рецепторів макрофагів, що сприяє просторовому зближенню фагоцита з антигенами. Приваблення антигенів до фагоцитів забезпечують також компоненти комплементу, активація яких відбувається на поверхні самого антигена. В результаті активації комплементу утворюється C3b-компонент, який зв'язується зі специфічним рецептором на поверхні макрофага. Таким чином, завдяки антитілам і комплементу відбувається **імунне прилипання** антигенів до фагоцитів, або **опсонізація**, що у сотні разів підвищує ефективність поглинання антигенів.

При дослідженні імунного статусу людей, як одну з найважливіших характеристик, визначають фагоцитарну активність, обумовлену опсонінами. Для цього встановлюють такі кількісні характеристики, як **опсонічний індекс**, **опсоно-фагоцитарний індекс** і **титр опсонинів**.

**Опсонічний індекс** є показником функціональної активності фагоцитів під впливом опсонинів і комплементу. Він розраховується як відношення фагоцитарного числа досліджуваної крові до фагоцитарного числа нормальної крові. Для цього два зразки крові змішують зі стандартною кількістю живих або вбитих бактерій та інкубують 30 хв. при 37<sup>0</sup>C. Після інкубації з кожного зразка роблять мазки на предметному склі, фіксують препарати за способом Никифорова і фарбують їх метиленовим синім. За допомогою мікроскопа підраховують кількість бактерій, фагоцитованих 50 фагоцитами, встановлюють фагоцитарне число для обох зразків крові і визначають опсонічний індекс.

**Опсоно-фагоцитарна реакція** – метод оцінки активності опсонинів сироватки по їх здатності стимулювати поглинання бактерій або інших корпускулярних антигенів. Постановка реакції практично не відрізняється від попередньої. При мікроскопії зразків крові аналізують 25 фагоцитів і розбивають їх на групи в залежності від кількості фагоцитованих бактерій, а інтенсивність фагоцитозу оцінюють за трьоххрестною системою. Приклад розрахунку опсоно-фагоцитарного індекса наведений нижче.

### Оцінка опсоно-фагоцитарної реакції

Кількість мікробів, фагоцитованих одним фагоцитом	Оцінка фагоцитозу	Кількість фагоцитів	Розрахунок опсоно-Фагоцитарного індекса
0	0	1	$1 \times 0 = 0$
1 – 20	+	4	$4 \times 1 = 4$
21 – 40	++	5	$5 \times 2 = 10$
більш 40	+++	12	$12 \times 3 = 36$
			Загалом: $0+4+10+36=50$

Як видно з наведеної таблиці, у даному випадку опсоно-фагоцитарний індекс дорівнює 50. Максимально можливий показник становить 75. Слабкій опсоно-фагоцитарній реакції відповідає показник 10-24, позитивній реакції – 25-49, виражено позитивній реакції – 50-75.

**Титр опсонинів** – кількісна характеристика опсонічної активності фагоцитів відносно певного збудника хвороби.

#### ***1. Постановка опсоно — фагоцитарної реакції.***

Принцип методу базується на порівнянні інтенсивності фагоцитозу мікробів лейкоцитами в присутності нормальної і імунної сироваток. В якості тест-мікроба при постановці опсоно - фагоцитарної реакції використовують культуру збудника відповідної інфекції.

В невеликих пробірках виготовляють дві суміші, кожна з яких містить по три інгредієнти: мікроорганізми, лейкоцити і сироватку (досліджувану чи контрольну). Суміші інкубують в термостаті при 37°C 15 - 30 хвилин, потім роблять мазки, фіксують в рідкому фіксаторі і фарбують по Романовському - Гімзе. При мікроскопії мазок переміщують в одному напрямку, підраховуючи число фагоцитованих бактерій не менш ніж у 50 лейкоцитах і визначають середню кількість фагоцитованих бактерій на один лейкоцит - фагоцитарний показник. Після підрахунку фагоцитарних показників для досліджуваної сироватки хворого і для нормальної (контрольної) сироватки здорового визначають їх відношення, яке характеризує величину опсонічного індексу.

## Контрольні запитання

1. Дайте визначення поняття "фагоцитоз"? Які клітини володіють фагоцитарною здатністю? Стадії фагоцитарного процесу. Що таке незавершений фагоцитоз?
2. Як визначаються фагоцитарні показники? Що таке опсоніни? Реакція опсонізації. Визначення опсонічного індексу.
3. На якій властивості антитіл базується ОФР? Чи є ця реакція специфічною?
4. Про що свідчить високий опсоно - фагоцитарний показник?
5. Захисна роль шкіри, слизових оболонок і лімфатичних вузлів.
6. Роль запалення у неспецифічній стійкості організму.
7. Фагоцитоз клітин, що мають фагоцитарну активність.
8. Бактерицидні системи фагоцитозу.
9. Захисні властивості комплементу, пропердину, інтерферону.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

**Тема: Визначення в сироватці крові антитіл різних класів.**

**Мета:** Визначити рівень імуноглобулінів у сироватці крові методом радіальної дифузії в гелі (методом Манчіні).

**Завдання:** 1. Визначити рівень імуноглобулінів у сироватці крові.

2. Побудувати калібрувальну криву залежності діаметра кілець преципітації від стандартних концентрацій імуноглобулінів.

**Прилади та матеріали:** скляні пластини розміром 9×12 см, агар, моноспецифічна сироватка, мікрошприци, латунна П-подібна рамка завтовшки 1 мм, 0,1 М веронал-медіналовий буфер (рН 8,6), лінійка Behringwerke, креслярський вимірник і штангенциркуль, волога камера, холодильник.

## Теоретичні відомості

Антитіла – це білки, що належать до того чи іншого класу імуноглобулінів, синтез яких стимулюється після парентерального введення антигену. Відомо п'ять класів антитіл: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. До одного і того ж антигену можуть утворюватися усі класи антитіл, вони різняться між собою за важкими ланцюгами імуноглобулінів.

IgM має молекулярну масу 900 кД, він міститься в крові в концентрації 0,5–1,8

г/л, період напіврозпаду – 5–6 діб. IgG має молекулярну масу 150 кД, його концентрація у крові становить 6,0–16,0 г/л і період напіврозпаду – 21 доба. IgA має молекулярну масу 170–350 кД, його концентрація в крові – 1–5 г/л, а період напіврозпаду – 6 діб. IgD – молекулярна маса 180 кД, концентрація в крові 0,03–0,04 г/л, період напіврозпаду – 3 доби, IgE – молекулярна маса 190 кД, концентрація у крові 0,00002–0,0002 г/л, період напіврозпаду – 2 доби. IgD існує лише у мембрано-зв'язній формі у вигляді рецепторів В-лімфоцитів. При диференціації В-клітин він з'являється після IgM.

Імуноглобуліни складаються з легких і важких ланцюгів. Активний центр антитіла формується важким і легким ланцюгом. Це стало відомо після досліджень англійського вченого Р. Портера та американського вченого Г. Едельмана у 1959 році. Портер обробив антитіло папаїном і отримав три фрагменти. Два з них із молекулярною масою 45 кД ідентичні один одному, їх назвали Fab<sub>1</sub> та Fab<sub>2</sub>. Фрагменти, які зв'язуються з антигеном (*antigen binding*). Третій фрагмент з молекулярною масою 55 кД специфічної активності не має, але має постійний амінокислотний склад, його було названо Fc-фрагментом (*crystallizable*).

Коли Г. Едельман обробив антитіло меркаптоетанолом у концентрованому розчині сечовини, то молекула імуноглобуліну розпалася на два легкі ланцюги з молекулярною масою 20–25 кД та два важкі ланцюги з молекулярною масою 50 кД кожний. Повноцінної активності антитіла жоден із ланцюгів не мав, тобто було встановлено, що активний центр формується важким та легким ланцюгом. Антитіла мають два активні центри і, відповідно, двовалентність, яка забезпечує можливість приєднуватися до них великій кількості антигенів. Реакція антиген-антитіло максимально відбувається лише в певному діапазоні концентрацій обох реагентів, тобто у зоні еквівалентності, і характеризується такими особливостями:

- а) для її протікання необхідною умовою є наявність електролітів – 0,85 % NaCl та рН близьке до нейтральних значень;
- б) реакція з'єднання антигену з антитілом відбувається дуже швидко;
- в) реакція є зворотною. При зміні рН у лужний або кислотний бік та підвищенні концентрації NaCl до 15 %, а температури до 60 °С можна із комплексу антиген-антитіло виділити антитіло;
- г) при взаємодії антигена з антитілом виділяється невелика кількість тепла.

### **Хід роботи**

В основу цього методу покладено метод Манчіні, який ґрунтується на вимірюванні діаметра кільця преципітації, що утворюється при внесенні досліджуваної сироватки в лунки, вирізані в шарі агару, у якому попередньо дисперговані моно специфічні антисироватки. За стандартних умов досліду діаметр кільця преципітації прямо пропорційний концентрації досліджуваного імуноглобуліну. Вміст імуноглобулінів визначають щодо стандартної сироватки

крові людини з відомою концентрацією імуноглобулінів.

Скляні пластини розміром 9×12 см покривають рівномірним шаром суміші агару з моноспецифічною антисироваткою. Для цього на пластину поміщають латунну П-подібну рамку завтовшки 1 мм, зверху поміщають другу скляну пластину, змочену гідрофобною рідиною; простір між пластинами заливають сумішшю агару і антисироватки об'ємом 9 мл.

Для отримання суміші 3 %-го агару або агарозу (закордонного або вітчизняного виробництва) у 0,1 М веронал-медіналовому буфері з рН 8,6 змішують при 56 °С у співвідношенні 1:1 з антисироваткою, в якій концентрація антитіл вдвічі перевищує робочий титр (титр у реакції імунної дифузії (РІД)), вказаний на ампулі. Розведення антисироватки готують у 0,1 М веронал-медіналовому буфері з рН 8,6.

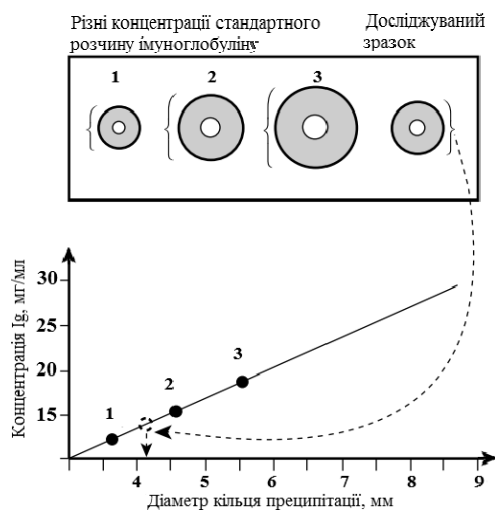
У шарі агару з антисироваткою пробійником роблять лунки діаметром 2 мм на відстані 15 мм одна від одної. На пластині утворюється декілька рядів лунок. В усі лунки 1-го ряду за допомогою мікрошприца вносять 2 мкл стандартної сироватки нерозведеної і в розведеннях 1:2, 1:4, 1:8. Лунки наступних рядів заповнюються дослідними препаратами. Пластини інкубують у вологій камері упродовж 24 год за температури +4 °С, а пластини з анти-IgM сироваткою – 48 год. По закінченні інкубації вимірюють діаметри кілець преципітації.

На вологих нефарбованих пластинах виміри проводять під лупою з дворазовим збільшенням на темному фоні при косому освітленні за допомогою креслярського навскісному і штангенциркуля. На зафарбованих пластинах діаметри вимірника за допомогою лінійки Behringwerke.

Якщо коли діаметр кільця преципітації досліджуваних препаратів перевищує діаметр кільця преципітації нерозведеної контрольної сироватки, досліджувані матеріали необхідно розводити.

### **Обробка експериментальних даних**

Рівень імуноглобулінів визначають за калібрувальною кривою, що виражає



залежність між рівнем імуноглобулінів і діаметром кілець преципітації. Для цього на осі абсцис відкладають діаметри кілець преципітації (в мм) контрольної сироватки у співвідношенні з моноспецифічною сироваткою, а на осі ординат – відому концентрацію імуноглобуліну в МО/мл (міжнародних одиниць/мл) або мг/мл, що містяться в контрольній сироватці кожного розведення. Утворені точки з'єднують однією лінією. Так будують графіки для кожного імуноглобуліну окремо.

Для визначення рівня імуноглобулінів у досліджуваній сироватці необхідно на осі абсцис відкласти діаметр кільця преципітації досліджуваної сироватки. Встановлюють перпендикуляр до перетину з кривою і точку перетину проєктують на вісь ординат. Отримане значення відповідає рівню імуноглобуліну (в МО/мл або мг/мл). Похибка у визначенні концентрації імуноглобулінів становить  $\pm 0,02$  мг/мл, а похибка вимірювання діаметра кільця преципітації –  $\pm 0,1$  мм.

#### ***Аналіз отриманих результатів***

Отримані значення вмісту різних класів імуноглобулінів у досліджуваному зразку сироватки порівнюють із середніми (табл.) та роблять висновки про стан імунної системи.

#### **Розподіл імуноглобулінів у сироватці крові людини**

IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
80 %	13 %	6 %	1 %	0,002 %

#### **Контрольні запитання**

1. Антитіла. Біологічні властивості і функції антитіл. Молекулярна структура імуноглобулінів.
2. Різновиди імуноглобулінів - мікроглобуліни, мієломні білки, неповні антитіла, нормальні антитіла, моноклональні антитіла.
3. Динаміка утворення антитіл.
4. Характеристика імуноглобулінів класу М.
5. Характеристика імуноглобулінів класу G
6. Характеристика імуноглобулінів класу А.
7. Характеристика імуноглобулінів класу .D
8. Характеристика імуноглобулінів класу E.



## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

**Тема:** Оцінка активності гуморальних факторів неспецифічної резистентності організму

**Мета:** Оцінити активність гуморальних факторів неспецифічної резистентності організму на прикладах антимікробної активності лізоциму з різних джерел

**Завдання:**

1. Визначити активність ферментів неспецифічної резистентності організму.
2. Порівняти активність лізоциму з різних джерел.

**Прилади та матеріали:** стерильні чашки Петрі, пробірки, склянки, піпетки, диски фільтрувального паперу, дистильована вода, культури грампозитивних *Micrococcus luteus* та грамнегативних *Escherichia coli* бактерій, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, свіжий яєчний білок, стандартизований препарат лізоциму з активністю 60 000 од/мг, дві пробірки з 20 мл м'ясо-пептонного агару (МПА) в кожній, пробірка з 20 мл середовища Сабуро, пінцет, спиртівка, термостати, лінійка.

### Теоретичні відомості

Клітини організму людини синтезують безліч сполук з антимікробною активністю. Серед них вирізняють два найважливіші білки вродженого імунітету людини – лізоцим та комплемент. Комплемент є важливим компонентом у взаємодії антитіл з мембраною патогенних мікроорганізмів. Лізоцим – протеолітичний фермент, що міститься в слюзах, слині та носових виділеннях. Він також наявний у фагоцитах як біоцидний агент, яєчному білку (3,5 % білка, перерахованого на суху масу) та молоці (13 г/ 100 мл).

Механізм антимікробної дії лізоциму ґрунтується на його здатності руйнувати пептидоглікановий шар клітинної стінки бактерій, тим самим ослаблюючи та руйнуючи патогенні організми. Лізоцим особливо активний проти грампозитивних бактерій, у яких пептидоглікановий шар клітинної стінки розташований зовні.

У промисловості препарати лізоциму використовуються як природні консерванти.

### Хід роботи

1. Маркером розділяють нижню частину трьох стерильних чашок Петрі на чотири сектори: «слина», «сльози», «яєчний білок», «препарат лізоциму». Також на чашках Петрі зазначають назву культури мікроорганізмів, дату та

прізвища виконавців досліду.

2. У стерильних умовах готують суспензії мікроорганізмів та піпеткою вносять 1 мл суспензії у відповідні чашки Петрі. Розтоплене та охолоджене до 50 °С поживне середовище МПА виливають у чашки Петрі з бактеріальними суспензіями, а поживне середовище Сабуро – в чашку Петрі з суспензією дріжджів. Вміст чашок Петрі обережно перемішують круговими рухами на горизонтальній поверхні для рівномірного розподілу клітин мікроорганізмів у шарі поживного середовища. Чашки Петрі залишають на горизонтальній поверхні до повного застигання поживного середовища.

3. Слину та сльози збирають у стерильні хімічні склянки. Білок яйця обережно відділяють від жовтка та вносять в окрему стерильну склянку. Стандартизований препарат лізоциму з активністю 60 000 од/мг розводять у 10 разів. Так отримують лізоцим з чотирьох різних джерел.

4. Стерильним пінцетом беруть диск фільтрувального паперу, змочують його в одному з досліджуваних джерел лізоциму та обережно кладуть на поверхню поживного середовища у відповідному секторі чашки Петрі. Процедуру повторюють для всіх джерел лізоциму з трьома чашками Петрі, попередньо інокульованими мікроорганізмами.

5. Чашки Петрі з *E. coli* та *M. luteus* термостатують упродовж 24 год за температури 37 °С, а чашку Петрі з *S. cerevisiae* – упродовж 48 год за температури 37 °С.

### Обробка експериментальних даних

1. За допомогою лінійки визначають діаметр зони інгібування росту мікроорганізмів навколо дисків фільтрувального паперу, змочених у різних джерелах лізоциму. Результати заносять до табл.1.

Таблиця 1

### Антимікробна активність лізоциму з різних джерел

Мікроорганізм	Діаметр зони інгібування, мм			
	Слина	Сльози	Яечний білок	Препарат лізоциму
<i>E. coli</i>				
<i>M. luteus</i>				
<i>S. cerevisiae</i>				

2. Розраховують активність лізоциму слини, сліз та яєчного білка шляхом порівняння квадратів діаметрів зон інгібування росту мікроорганізмів навколо

дисків фільтрувального парепу, змочених досліджуваними об'єктами з квадратом діаметра зони інгібування росту мікроорганізмів навколо диска, змоченого стандартизованим препаратом лізоциму. Результати заносять до табл. 2.

Таблиця 2

### Одиниці активності лізоциму різних джерел

Мікроорганізм	Активність лізоциму, од./мг		
	Слина	Сльози	Ячний білок
<i>E. coli</i>			
<i>M. luteus</i>			
<i>S. cerevisiae</i>			

### Контрольні запитання

1. Гуморальні фактори неспецифічного імунітету.
2. Медіатори міжклітинної взаємодії цитокіни. Їх характеристика, функції.
3. Група інтерферонів. Основні різновиди, їх роль в протипухлинному імунітеті, механізм дії.
4. Стрес. Адаптаційний синдром. Механізм стресу, його роль для макроорганізму.
5. Білки гострої фази. С-реактивний білок.
6. Білки теплового шоку.
7. Реакції, що протікають з участю комплементу.
8. Реакції бактеріолізу *in vitro* та *in vivo*.
9. Реакції гемолізу. РЗК, її практичне використання.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

**Тема: Отримання антигенів (антигенних діагностикумів)блю**

**Мета: Вивчити методи отримання антигенів**

**Завдання:** приготувати корпускулярний антиген кишкової палички.

### Теоретичні відомості

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

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

### *Отримання корпускулярних антигенів*

В залежності від мети використання корпускулярні антигени необхідно отримати або живими, або інактивованими (не здатними розмножуватися). На першому етапі мікроорганізми культивують таким способом, при якому можна отримати найбільшу кількість антигену. Бактерії культивують на звичайних, спеціальних або елективних поживних середовищах. З щільних поживних середовищ мікроорганізми отримують шляхом змивання стерильним фізіологічним розчином, на рідких поживних середовищах відразу отримують завись мікроорганізмів. Для

отримання стандартного антигену необхідно визначити кількість клітин у суспензії. Для цього використовують різні способи. Еритроцити і лейкоцити підраховують у лічильній камері Горяєва. Кількість бактеріальних клітин у суспензії найчастіше визначають спектрофотометричним методом (по оптичній щільності) мул більш простим методом - за допомогою стандартів мутності з відомою кількістю клітин в одиниці об'єму. Стандарт складається з запаяних пробірок-еталонів, що містять суспензію бактерій в дистильованій воді найдрібніших частинок скла пірекс з різним ступенем мутності. Числові позначення на етикетці кожної пробірки-еталона (5, 9, 10, 11, 20) вказують, якій кількості одиниць каламутності відповідає даний еталон. За одиницю каламутності умовно прийнята мутність суспензії живих тифозних бактерій, що містить  $10^8$  мікробних тіл в 1 см<sup>3</sup>. каламутність стандарту на 10 одиниць відповідає кількості клітин в см<sup>3</sup> суспензії, яке залежить від розмірів бактерій. Наприклад:  $8,5 \times 10^8$  бактерій кишкової групи,  $10^9$  бактерій сальмонел,  $1,5 \times 10^9$  бруцельозного бактерій,  $2 \times 10^9$  холерних вібріонів,  $4,5 \times 10^9$  туляремійних бактерій,  $10^{10}$  кашлюкових бактерій. З метою інактивації бактерій користуються методами, які не викликають зниження їх імуногенних властивостей і не призводять до підвищення токсичності мікроорганізмів. Інактивовані мікроорганізми використовують в якості вакцин або антигенних діагностикумів для постановки серологічних реакцій. Для інактивації клітин використовують кілька способів:

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

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

### ***Принципи отримання розчинних антигенів***

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

Механічне руйнування (дезінтеграція, гомогенізація, руйнування ультразвуком);

- Екстрагування;
- Обробка ферментами;
- Використання детергентів;
- Центрифугування.

Механічне руйнування (дезінтеграцію) бактеріальних клітин проводять у спеціальних приладах (дезінтеграторах або пресах). Мікробну суспензію струшують з дрібними скляними бусами 3-5 хвилин (температура +40 С при 2-4 тисячах коливань в 1 хвилину). Екстрагування - це вилучення розчинних речовин з цілих або дезінтегрованих клітин за допомогою розчинників. Так, з бактеріальних клітин екстрагують білки і ліпополісахариди (ЛПС) їх оболонки. Для екстракції речовин, що знаходяться всередині клітин, необхідно спочатку провести дезінтеграцію бактерій. Екстрагування проводять дистильованою водою, ізотонічним розчином (фізрозчин), буферними розчинами або іншими речовинами. Екстракти (нативні антигени) - складні суміші антигену і баластних (додаткових) речовин. З екстрактів чисті антигени виділяють з допомогою інших методів. За допомогою ферментів руйнують ковалентні зв'язки між молекулами, наприклад: руйнують клітинні стінки бактерій, розщеплюють великі молекули на дрібні фрагменти. Найбільш часто для руйнування бактеріальних клітин використовують папаїн і мурамідазу. Детергенти не руйнують ковалентні зв'язки, а пов'язують білки або утворюють з білками міцел з ліпідами, наприклад, додецилсульфат викликає необоротну денатурацію білків і не змінює антигени іншої хімічної структури.

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

## **Хід роботи**

### ***Методика отримання антигенів кишкової палички:***

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

2. Інактивацію антигену провести за допомогою прогрівання суспензії на водяній бані при +100 С протягом 1 години. Повноту інактивації перевірити шляхом

посіву 1-2 крапель антигену на МПБ з інкубування в термостаті 1 добу при +370 С. Відсутність росту свідчить про інактивації антигену.

### **Контрольні запитання**

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

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12**

**Тема: Визначення алергічної реакції організму за допомогою тесту дегрануляції базофілів**

**Мета:** За допомогою тесту дегрануляції базофілів визначити алергічний стан організму.

**Завдання:**

1. Приготування розчинів алергенів.
2. Виділити базофіли із крові кролика.
3. Отримати сироватку крові досліджуваного об'єкта.
4. Провести тест дегрануляції базофілів.

**Прилади та матеріали:** холодильник, термостат, центрифуга, предметні та покривні скельця, мікроскоп, імерсійне масло, спиртівка, барвник нейтральний червоний, фізіологічний розчин, гепарин, відалівські пробірки, скарифікатор, абсолютний етиловий спирт, тканинний та рослинний алергени, вазелін, фільтрувальний папір.

### **Теоретичні відомості**

Термін «алергія» походить від грецьких слів «*allos*» – інший, «*ergos*» – дію. Це якісно змінена реакція організму на дію речовини антигенної природи, яка призводить до різних порушень в організмі – запалення, спазму бронхів, некрозу, шоку тощо. Отже, алергія – це комплекс порушень, які виникають в організмі під дією гуморальних і клітинних реакцій. У 1902 р. Портє і Ріше вперше описали це явище як реакцію собак на повторне введення екстракту з молюсків. Сам

термін «алергія» запропонував австрійський педіатр К. Пірке у 1906 р. для характеристики випадків патологічно посиленої реактивності, які він спостерігав у дітей при сироватковій та інфекційних хворобах. Алергічні реакції вивчає окрема галузь медицини – алергологія. Результатом імунних реакцій є захист від антигену, а алергічних – пошкодження власних тканин. Алергічні реакції розвиваються у схильних до них осіб. Алергени поділяються на ендогенні та екзогенні. Алергени можуть бути повні і неповні. Неповні алергени викликають утворення антитіл лише до певних компонентів алергенів.

Розрізняють три стадії алергічних реакцій: імунологічну, біохімічну (патохімічну) та патофізіологічну або стадію функціональних і структурних порушень.

## **Хід роботи**

### ***Приготування тканинного антигену (алергену)***

Тканину промивають водою, потім – фізіологічним розчином, промочують, зважують та розтирають зі скляним піском до отримання гомогенної маси, а потім розводять у стерильному фізіологічному розчині в 5 разів, наприкінці ставлять у морозильну камеру на добу. Потім розморожують, центрифугують при 3000 об/хв декілька разів до зникнення осаду і заморожують. Через добу знову розморожують та центрифугують до зникнення осаду. Для приготування робочого розчину тканинного антигену отриманий розчин розводять двома частинами фізіологічного розчину.

Алерген рослинного походження готують за інструкцією виробника.

### ***Приготування барвника (нейтрального червоного)***

Нейтральний червоний – 300 мг/100 мл абсолютного етилового спирту ставлять на добу у термостат за температури 37 °С. Фільтрують через звичайний папір. Предметні скельця трохи підігривають над полум'ям спиртівки і наносять відразу краплю барвника. Вона розтікається і висихає.

### ***Контроль сироватки***

*I етап.* Відбирають кров з крайової вени вуха кролика в кількості 1,5 мл у відалівську пробірку з гепарином. Центри- фугують при 1500 об/хв уродовж 3 хв. Отримують лейкоцитарну плівку, яку використовують як джерело базофілів.

*II етап.* На предметне скельце, зафарбоване нейтральним червоним барвником, наносять частину лейкоцитарної плівки та краплину сироватки досліджуваної тварини і краплину фізіологічного розчину. Бажано, щоб усі нанесені краплини були однакового об'єму. Це контроль сироватки.



Несильно натискаючи, краєм покривного скла змішують краплини; краї цього ж покривного скла (краще брати великого розміру) покривають вазеліном і накривають предметне скельце. Препарат термостатують за температури 37 °С упродовж 15 хв та мікроскопують в імерсійній системі, рахуючи 20 базофілів. Якщо відсоток дегрануляції перевищує 10 % (тобто дві клітини), то сироватку варто розвести в 2 рази і так далі доти, доки дегрануляція буде на рівні 10 % або менше. Оптимальними умовами є відсутність у контролі сироватки зруйнованих клітин.

### ***Контроль алергену***

Частину лейкоцитарної плівки, краплину алергену та краплину фізіологічного розчину накривають покривним склом так само, як і контроль сироватки. Препарат термостатують за температури 37 °С упродовж 15 хв та мікроскопують в імерсійній системі, рахуючи 20 базофілів. Досягають дегрануляції не більше двох клітин. Щодо концентрації хімічної речовини, то необхідно брати таку, що сенсibiliзує тварин, і якщо вона виявиться занадто великою (тобто дегрануляція більше 10 %), потрібно розвести алерген. Необхідно отримати таку дозу хімічних речовин або іншого алергену, яка не спричинятиме дегрануляцію базофілів. Як розчинник потрібно використовувати фізіологічний розчин для створення ізотонічного середовища.

### ***Постановка експерименту***

Частину лейкоцитарної плівки, краплину сироватки та краплину алергену змішують і накривають покривним склом. Препарат термостатують за температури 37 °С упродовж 15 хв та мікроскопують в імерсійній системі, рахуючи 20 базофілів. Якщо кількість змінених клітин перевищує 10 %, тоді ця реакція вважається позитивною (слід рахувати не більше 20 хв, тому що потім відбувається спонтанна дегрануляція базофілів).

### ***Обробка експериментальних даних***

Проводять морфологічний аналіз базофілів. Нормальні базофіли мають яскраво-оранжеву зернистість (нейтрофіли менші за розміром і зернистість у них жовтого кольору). Визначають ступінь руйнації окремих клітин базофілів: «+» – змінена форма,

«++» – утворення виросту, «+++» – вихід гранул. Дані заносять до табл. 1.

**Ступінь руйнації окремих базофілів**

Кількість базофілів з відповідним ступенем руйнації		
+	+	+++
	+	

Визначають ступінь руйнації субпопуляції базофілів: «+» – 20– 30 % зруйнованих клітин, «++» – 31–50 % зруйнованих клітин, «+++» – понад 50 % зруйнованих клітин, «-» – негативна реакція, кількість зруйнованих клітин менше 20 %.

Визначають коефіцієнт дегрануляції базофілів ( $A$ ):

$$A = C/B,$$

де  $C$  – кількість дегранульованих клітин;  $B$  – загальна кількість базофілів.

**Аналіз отриманих результатів**

Ступінь розвитку алергічної реакції залежно від природи та концентрації алергену оцінюють за ступенем руйнації окремих клітин базофілів, ступенем руйнації субпопуляцій базофілів та коефіцієнтом дегрануляції базофілів.

**Контрольні запитання**

1. Що таке алергія?
2. Хто вперше відкрив алергічну реакцію?
3. Що таке сенсibiliзація?
4. Із яких стадій складається алергічна реакція?
5. Які типи алергічних реакцій?
6. Які умови навколишнього середовища та життєдіяльності людини спричинюють виникнення алергічних реакцій, особливо у дітей?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 13

**Тема:** Феномен мітки (реакції імунофлуоресценції, імуноферментний аналіз)

**Мета:** ознайомитись з різновидностями РІФ, ІФА

**Завдання:**

1. Дослідити методику діагностики вірусних інфекцій.
2. Засвоїти методику індикації вірусів.

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

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

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

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

#### **Пряма (одноступінчата) РІФ**

Для індикації різних вірусів застосовують відповідні кожному антигену флуоресціюючі антитіла. На фіксований препарат наносять кон'югат і витримують 20-60 хвилин (+37 градусів) у вологій камері. Потім препарати відмивають фізіологічним

розчином, підсушують на повітрі і досліджують під мікроскопом. Результат враховують по інтенсивності і специфічності флюоресценції в плюсах:

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

### **Непряма (двоступінчаста) РІФ**

Препарат спочатку обробляють гомологічними нефлюоресціюючими антитілами (перший ступінь), а потім антивидовими флюоресціюючими антитілами (другий ступінь). Антивидові сироватка повинна відповідати виду тварини-продуцента гомологічних антитіл. Найбільш часто використовують сироватки проти глобулінів кролика, коні або морської свинки. Розроблені модифікація непрямого методу з використанням комплементу. При цьому на препарат наносять нефлюоресціюючу специфічну сироватку і комплемент морської свинки, а потім

- флюоресціюючу антикомплемтарну сироватку. Такий варіант набагато чутливіший першого і має більшу універсальність, так як потрібно тільки одна флюоресціююча сироватка для виявлення будь-якого вірусу. МФА істотно спрощує і прискорює серологічну діагностику інфекційних захворювань. Особливо велике значення МФА має при вивченні змішаних і хронічних інфекцій.

### **Імуноферментний аналіз (іфа)**

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

Гістохімічний метод ІФА (імунопероксидазна реакція) Для постановки реакції використовують антитіла, мічені ферментом, і облік результатів реакції проводять під світловим мікроскопом. У цьому випадку використовують антитіла, мічені пероксидазою, яка проникає крізь клітинну мембрану і стійкіша при гістологічній обробці. Матеріалом для Дослідження можуть служити мазки-відбитки органів, парафінові зрізи, мазки крові. Препарати висушують, фіксують охолодженням ацетоном, обробляють імунопероксидазним кон'югатом, потім субстратом і після

промивання мікроскопіюють. У позитивних випадках (за наявності збудники в препараті) субстрат під дією ферменту розкладається, утворюючи кольоровий продукт ферментативної реакції, добре видний у світловому мікроскопі (спочатку з'являється блакитний колір, який швидко переходить у коричневий). У препараті видно або дифузне жовто-коричнє забарвлення, або гранули коричнево-чорного кольору. У контрольних препаратах фарбування не виявляють.

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

Методи твердофазного ІФА засновані на застосуванні антитіл (антигенів), фіксованих на нерозчинних носіях. В якості носіїв використовують скляні або нейлонові кульки, полістиролові або керамічні пробірки і мікропанелі. Зараз найбільш часто використовують полістиролові мікропанелі. Метод ІФА використовують як для виявлення антигену, так і специфічних антитіл у сироватці крові тварин. Для твердофазного ІФА використовують пероксидазні та лужно-фосфатазні кон'югати. Реакцію враховують візуально з різниці в забарвленні дослідних і контрольних зразків або колориметрично при довжині хвилі 490 нм (для пероксидази) або 405 нм (для лужної фосфатази). За позитивний результат приймають підвищення оптичної щільності дослідних зразків над контрольними в 5-10 разів. Автоматизація імуноферментного тесту Для прискорення постановки реакції створені прилади, що виконують ряд маніпуляцій, наприклад: для промивання планшетів використовують йорш, а для читання реакції - спектрофотометри або рідери. Автоматичні спектрофотометри вимірюють ферментативну активність в 120-2000 зразках на годину, а комп'ютер перераховує величину ферментативної активності в концентрацію визначається з'єднання і виводить результати на екран монітора. Зчитування 96 результатів в одній мікропанелі займає 1 хвилину. Причому аналіз можна проводити як в лабораторії, так і в польових умовах.

### **Контрольні запитання**

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

## ПЕРЕЛІК КОНТРОЛЬНИХ ПИТАНЬ, ЯКІ ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАСВОЄННЯ НАВЧАЛЬНОЇ ПРОГРАМИ

1. Предмет імунології. Основні завдання сучасної імунологічної науки. Методологія курсу - сучасні методи імунологічних досліджень.
2. Етапи розвитку імунології: емпіричний, науковий та сучасний етапи розвитку імунології.
3. Л. Пастер - основоположник наукової імунології.
4. Наукова діяльність І.І.Мечнікова та її значення для розвитку наукової імунології.
5. Поняття "антиген". Умови, які визначають антигенні властивості речовин.
6. Антигени мікроорганізмів. Джгутикові Н-, соматичні О-, капсульні К-антигени, Vi – антиген, антигени бактеріальних токсинів.
7. Видові, групові та типові антигени. Гаптени.
8. Антигени організму людини. Антигени пухлин, ізоантигени, антигени головного комплексу гістосумісності.
9. Антитіла. Біологічні властивості і функції антитіл. Молекулярна структура імуноглобулінів.
10. Різновиди імуноглобулінів - мікроглобуліни, мієломні білки, неповні антитіла, нормальні антитіла, моноклональні антитіла.
11. Динаміка утворення антитіл.
12. Характеристика імуноглобулінів класу М.
13. Характеристика імуноглобулінів класу G
14. Характеристика імуноглобулінів класу А.
15. Характеристика імуноглобулінів класу D
16. Характеристика імуноглобулінів класу Е.
17. Механізми, які лежать в основі серологічних реакцій.
18. Реакція аглютинації та її варіанти. (РНА, РГГА, РНГА).
19. Реакції преципітації та її різновиди — імунодифузія, кільцепреципітація, імуноелектрофорез, реакція Кумбса.
20. Реакції нейтралізації. Способи постановки реакції нейтралізації (*in vitro* та *in vivo*).
21. Реакція флокуляції. Практичне використання.
22. Реакції нейтралізації вірусів.
23. Реакція гальмування гемаглютинації вірусів.
24. Реакції, які протікають з участю фагоцитів. Опсоно-фагоцитарна реакція.
25. Реакції, які протікають з участю мічених антигенів і антитіл.
26. Клітинні фактори неспецифічної резистентності. Характеристика мікро- і макрофагів.

27. Фагоцитоз. Механізми і стадії фагоцитозу. Завершений і незавершений фагоцитоз.
28. Киснезалежні і кисненезалежні механізми фагоцитозу.
29. Гуморальні фактори неспецифічної резистентності.
30. Лізоцим, його характеристика і механізм бактеріолітичної дії.
31. Комплемент, його роль у неспецифічній резистентності організму.
32. Шляхи активації системи комплементу. Значення системи комплементу в імунному захисті організму.
33. Гуморальні фактори неспецифічного імунітету - білки гострої фази.
34. Медіатори міжклітинної взаємодії - цитокіни. Їх характеристика, функції.
35. Група інтерферонів. Основні різновиди, їх роль у протипухлинному імунітеті, механізм дії.
36. Стрес. Адаптаційний синдром. Механізм стресу, його роль для макроорганізму.
37. Білки гострої фази. С-реактивний білок.
38. Білки теплового шоку.
39. Реакції, що протікають із участю комплементу.
40. Реакції бактеріолізу *in vitro* та *in vivo*.
41. Реакції гемолізу. РЗК, її практичне використання.
42. Імунна система організму, органи і клітини імунної системи.
43. Центральні органи імунної системи. Їх будова, функції.
44. Периферичні органи імунної системи.
45. Імунокомпетентні клітини Т- і В-лімфоцити, їх загальна характеристика, диференціація із стовбурних клітин кісткового мозку.
46. Порівняльна характеристика Т- і В-лімфоцитів.
47. Субпопуляції Т-лімфоцитів. CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцити (Т-хелпери) та їх функції.
48. Цитотоксичні CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцити та їх функції.
49. Характеристика В-системи лімфоцитів. Плазматичні клітини, продукування ними імуноглобулінів.
50. Антигенпредставляючі клітини - макрофаги, дендритні клітини. В-лімфоцити як антигенпредставляючі клітини.
51. Клітини антиген-неспецифічної резистентності, що здійснюють імунний захист організму.
52. Взаємодія (кооперація) клітин при різних формах імунної відповіді.
53. Гіперчутливість. Неадекватна імунна відповідь та її наслідки. Реакції негайного та сповільненого типу.
54. Реакції гіперчутливості I типу, анафілактичні. Механізм розвитку анафілактичних реакцій.
55. Реакції типу II - гуморальні цитотоксичні імунні реакції. Приклади таких реакцій.

56. Реакції типу III - реакції імунних комплексів.
57. Реакції типу IV - клітинні реакції. ГСТ. Механізм реакцій.
58. Особливості противірусного імунітету.
59. Протипухлинний імунітет.
60. Особливості трансплантаційного імунітету. Механізм реакції відторгнення трансплантату.
61. Поняття імунологічної толерантності. Природна та штучна толерантність.
62. Вроджені і набуті імунодефіцитні стани.
63. Недостатність В-лімфоцитів і хвороби, пов'язані з нею.
64. Недостатність Т-лімфоцитів.
65. Імунодефіцити фагоцитів. Дефекти системи комплементу.
66. Вторинні імунодефіцити. СНІД.
67. Особливості репродукції вірусу імунодефіциту в клітині.
68. Оцінка імунного статусу людини. Тести 1 і 2 рівня.
69. Імунобіологічні медичні препарати.
70. Історія створення вакцин. Класифікація вакцин - живі, неживі, асоційовані.
71. Живі вакцини, особливості їх застосування.
72. Неживі (інактивовані) - корпускулярні, субклітинні, молекулярні.
73. Асоційовані вакцини.
74. Еубіотики - імунобіологічні медичні препарати.
75. Фаги, їх використання у фагодіагностиці, фагопрофілактиці і фаготерапії.
76. Сироваткові імунні препарати.
77. Імуномодулятори - гомологічні, гетеролітичні.
78. Імунобіологічні діагностичні препарати.



## ТЕСТИ

1. До корисних імунологічних реакцій відносять:
  - а) аутоімунні процеси
  - б) імунологічну толерантність
  - в) імунологічний параліч
  - г) алергічні реакції
  - д) відсутня правильна відповідь
2. До корисних імунологічних реакцій відносять:
  - а) відторгнення трансплантату
  - б) постійний імунологічний контроль
  - в) гіперсекреція інтерлейкінів
  - г) гіперсекреція Т-лімфоцитів
  - д) гіперсекреція В-лімфоцитів
3. До шкідливих імунологічних реакцій відносять:
  - а) утворення ауто антитіл-Ig
  - б) утворення специфічних Ig
  - в) утворення неспецифічних Ig
  - г) утворення моноклональних Ig
  - д) утворення неповних Ig
4. До шкідливих імунологічних реакцій відносять:
  - а) секреція білків гострої фази
  - б) алергічні реакції
  - в) гематопоез
  - г) імунний фагоцитоз
  - д) відсутня правильна відповідь
5. До сингенних відносять клітини ідентичні:
  - а) за антигеном Форсмана
  - б) за ізоантигенним складом
  - в) за алогенним складом
  - г) перехресно реагуючими антигенами
  - д) відсутня правильна відповідь
6. До ксеногенних відносять клітини:
  - а) генетично чужорідні

- б) одного виду
- в) одної групи в межах виду
- г) різних підгруп в межах одного виду
- д) відсутня правильна відповідь

7. До алогенних відносять клітини:

- а) ідентичні за антигенним складом
- б) одного виду різні за ізоантигенами
- в) одного виду однакові за ізоантигенами
- г) різних видів ідентичні за ізоантигенами
- д) відсутня правильна відповідь

8. До антигенів відносять:

- а) генетично чужорідні агенти
- б) речовини неорганічного походження
- в) речовини низькомолекулярні сполуки органічного походження
- г) речовини високомолекулярні сполуки неорганічного походження
- д) відсутня правильна відповідь

9. До антигенів відносять речовини:

- а) лише рослинного походження
- б) лише тваринного походження
- в) як тваринного так і рослинного походження
- г) лише хімічного походження
- д) відсутня правильна відповідь

10. До антигенів не відносять:

- а) білки
- б) поліцукри
- в) ліпіди
- г) екскременти гельмінтів
- д) відсутня правильна відповідь

11. До антигенів не відносять:

- а) віруси
- б) найпростіші
- в) бактерії
- г) мікроскопічні гриби
- д) відсутня правильна відповідь

12. До антигенів не відносять:

- а) розчинні речовини
- б) речовини у колоїдному стані
- в) модифіковані імуногени
- г) органічні сполуки з МВ більше ніж 10 тис D
- д) відсутня правильна відповідь

13. До антигенів відносять речовини:

- а) прості за хімічною структурою
- б) прості за молекулярною структурою
- в) які не несуть ознаки чужорідності
- г) розчинні високо молекулярні речовини
- д) відсутня правильна відповідь

14. В організмі живих істот антигени не обумовлюють:

- а) синтез антитіл
- б) клітинну реактивність
- в) імунологічну толерантність
- г) імунну пам'ять
- д) відсутня правильна відповідь

15. Хімічні групи на поверхні антигенів називаються:

- а) епітопами
- б) варіабельними ділянками
- в) алатопами
- г) едіотопами
- д) відсутня правильна відповідь

16. Для антигенів не характерна:

- а) видова специфічність
- б) гетеро специфічність
- в) групова специфічність
- г) органна специфічність
- д) відсутня правильна відповідь

17. За будовою антигени поділяються:

- а) повноцінні антигени
- б) напівзрілі антигени
- в) диференційовані антигени
- г) інтегровані антигени
- д) протоантигени

18. За хімічним складом антигени поділяються:
- а) хіміко-біологічні антигени
  - б) нейтральні антигени
  - в) лужні антигени
  - г) неповноцінні антигени
  - д) відсутня правильна відповідь
19. Повноцінні антигени характеризуються:
- а) імуногенністю
  - б) не антигенністю
  - в) відсутністю антигенних детермінант
  - г) неспецифічним подразненням
  - д) відсутня правильна відповідь
20. Повноцінні антигени:
- а) побудовані з двох субодиниць
  - б) не мають шлепера
  - в) не індують утворення Ig M
  - г) не індують утворення Ig E
21. Білковий носій повноцінних антигенів характеризується:
- а) імуногенністю
  - б) антигенністю
  - в) специфічністю дії
  - г) здатністю до з'єднання з Ig різних класів
  - д) відсутня правильна відповідь
22. Повноцінні антигени :
- а) обумовлюють утворення специфічних Ig одного класу
  - б) обумовлюють утворення специфічних Ig різних класів
  - в) здатні з'єднуватися лише з Ig класу D
  - г) обумовлюють утворення нормальних Ig – опсонінів
  - д) відсутня правильна відповідь
23. До неповноцінних антигенів відносять:
- а) едіотопи
  - б) ізоантигени
  - в) гаптени
  - г) епітопи

д) ізотопи

24. Неповноцінні антигени характеризуються:

- а) антигенністю
- б) імуногенністю
- в) не специфічністю дії
- г) індукцією до антитіло утворення
- д) відсутня правильна відповідь

25. До неповноцінних антигенів відносять:

- а) анафілатоксини
- б) антитоксини
- в) гетеро антигени
- г) відсутня правильна відповідь
- д) суперантигени

26. Гаптени обумовлюють:

- а) синтез специфічних Ig
- б) секрецію лізоциму
- в) специфічну взаємодію з антитілами
- г) гематопоез
- д) відсутня правильна відповідь

27. Гаптени це:

- а) речовини органічного походження з низькою МВ
- б) речовини неорганічного походження з низькою МВ
- в) антигени у яких відсутні антигенні детермінанти
- г) ауто антигени
- д) відсутня правильна відповідь

28. Ад'юванти характеризуються:

- а) підсиленням імуногенних властивостей антигенів
- б) не здатністю підсилювати фагоцитоз
- в) опсонізувати антигени
- г) здатністю до опсонізації антигенів
- д) відсутня правильна відповідь

29. До угруповання комбінованих (модифікованих ) антигенів відносять:

- а) анафілатоксини
- б) аглютиніни

- в) фагоцити
- г) нейтрофіли
- д) відсутня правильна відповідь

30. Валентність антигенів визначається:

- а) кількістю епітопів
- б) щільністю епітопів
- в) хімічною структурою епітопів
- г) локалізацією епітопів
- д) відсутня правильна відповідь

31. Виберіть вірне твердження:

- а) під вплив хімічних факторів не змінюється структура антигенних детермінант
- б) коагуляція білку змінює його антигенні епітопи
- в) денатурація білку не змінює його антигенні епітопи
- г) розщеплення протеазами не впливає на антигенні характеристики
- д) відсутня правильна відповідь

32. Специфічність антигенів не залежить від:

- а) здатності індукувати виникнення сенсibiliзованих лімфоцитів
- б) здатності індукувати синтез антитіл
- в) від походження антигенів
- г) від виду живих істот
- д) відсутня правильна відповідь

33. Для антигенів не характерна:

- а) органна специфічність
- б) тканинна специфічність
- в) стадіоспецифічність
- г) гетеро специфічність
- д) відсутня правильна відповідь

34. Виберіть вірне твердження:

- а) Специфічність антигенів – це здатність реагувати лише з певними антигенами
- б) антигени не містять амінокислот
- в) антигени не містять моноцукрів
- г) мінімальна відстань між епітопами антигенів – 1,2- 2,3 нм
- д) відсутня правильна відповідь

35. Утворення аутоантигенів в організмі не пов'язано з:

- а) пошкодженням тканин мікроорганізмами
- б) травмами
- в) опіками
- г) мутаціями окремих клітин
- д) відсутня правильна відповідь

36. Повноцінними називають антигени, які:

- а) здатні викликати імунну відповідь та вступати в реакцію специфічними антитілами
- б) здатні викликати імунну відповідь, однак не вступають в реакцію з специфічними антитілами
- в) не індують продукцію антитіл, однак взаємодіють з специфічними антитілами
- г) не індують продукцію антитіл та не вступають в реакцію з ними
- д) відсутня правильна відповідь

37. Характеристика антигенів:

- а) повноцінні антигени характеризуються імуногенністю та антигенністю
- б) повноцінні антигени - це гаптени
- в) гаптени викликають продукцію антитіл
- г) гаптени - високомолекулярні речовини
- д) відсутня вірна відповідь

38. Характеристика антигенів:

- а) напівгаптени - це неорганічні радикали
- б) комплексні антигени - це перехресно реагуючі антигени
- в) гетероантигени - це різні антигени в організмі живих істот одного виду
- г) диференціальні антигени надають можливість поділу на групи крові
- д) відсутня вірна відповідь

39. До мікробних антигенів не відносять:

- а) соматичний
- б) гамаглютинін
- в) джгутиковий
- г) проективний
- д) капсульний

40. Антигени мікроорганізмів це речовини:

- а) що входять до складу бактеріальної клітини
- б) не виділяються у навколишнє середовище

- в) не залежать від хімічної будови бактеріальної клітини
- г) розташовані лише на поверхні клітинної оболонки
- д) відсутня правильна відповідь

41. Капсульний антиген знаходиться:

- а) у периплазмі
- б) на структурах цитоплазматичної мембрани
- в) на внутрішній стороні клітинної оболонки
- г) на зовнішній стороні клітинної оболонки
- д) відсутня правильна відповідь

42. До основних характеристик капсульного антигену відносять:

- а) в організмі синтез капсульного антигену поновлюється
- б) капсульний антиген щільно з'єднаний з компонентами клітинної оболонки
- в) капсульний антиген за хімічною структурою - нуклеопротеїд
- д) капсульний антиген не розповсюджується по організму

43. Капсульний антиген бактерій характеризується:

- а) не розчинністю у фізіологічних розчинах
- б) термолабільністю
- в) кислотостійкістю
- г) поліцукровою хімічною структурою
- д) відсутня правильна відповідь

44. В організмі живих істот капсульний антиген обумовлює:

- а) гнійно-запальні процеси
- б) виникнення патологічного процесу
- в) алергічні реакції
- г) інвазійність генетично чужорідних агентів
- д) відсутня правильна відповідь

45. Джгутиковий антиген за хімічною структурою представлений:

- а) поліметафосфатами
- б) поліцукрами
- в) поліпептидами
- г) фосфоліпідами
- д) відсутня правильна відповідь

46. Джгутиковий антиген характеризується:

- а) термостабільністю



- б) протективною активністю
- в) нерозчинністю
- г) кислотостійкістю
- д) відсутня правильна відповідь

47. Джгутиковий антиген розташований:

- а) на зовнішньому боці клітинної стінки
- б) у периплазмі
- в) на цитоплазматичній мембрані
- г) на рибосомах
- д) відсутня правильна відповідь

48. Втрата джгутикового антигену обумовлює припинення:

- а) компонентів пептидоглікану
- б) перебігу реакцій циклу Кребса
- в) ферментативних процесів енергетичного метаболізму
- г) процесів елонгації поліпептидних ланцюгів
- д) відсутня правильна відповідь

49. Соматичний антиген бактеріальної клітини:

- а) різний за хімічною структурою у грам позитивних і грам негативних бактерій
- б) не містить компонентів пептидоглікану
- в) не містить полі цукрів
- г) не містить тейхоевих кислот
- д) відсутня правильна відповідь

50. З'ясуйте вірне твердження - соматичні антигени прокариотів є:

- а) ЦПМ мікробної клітини
- б) ліпополісахаридні структури клітинної стінки
- в) екзотоксини
- г) гліюцидо-ліпідо-протеїновий комплекс
- д) відсутня правильна відповідь

51. Суперантигени в організмі обумовлюють:

- а) пригнічення факторів природного імунітету
- б) зв'язування рецепторів Тх лімфоцитів
- в) зв'язування рецепторів Тс лімфоцитів
- г) пригнічення проліферації субпопуляцій Т лімфоцитів
- д) відсутня правильна відповідь

52. Перехресно реагуючі антигени клітини прокаріотів:
- а) спільні з антигенами тканин ссавців
  - б) гальмують секрецію лізоциму
  - в) пригнічують процеси диференціації Т лімфоцитів
  - г) обумовлюють надмірну імунну реакцію організму
  - д) відсутня правильна відповідь
53. Мінливість антигенної структури бактеріальних клітин носить характер:
- а) генетичних рекомбінацій
  - б) адаптивних модифікацій
  - в) трас локацій
  - г) транзицій
  - д) відсутня правильна відповідь
54. Групові антигени крові:
- а) еритроцити людини несуть три різновиди антигенів
  - б) еритроцити людини не мають спадкової антигенної будови
  - в) олігоцукри еритроцитів не визначають групові речовини крові
  - г) олігоцукри не формують антигенну структуру еритроцитів
  - д) відсутня правильна відповідь
55. До гетерофільних антигенів еритроцитів відносять:
- а) антигени які поширені у всіх групах людей
  - б) антигени які поширені у всіх людей та тварин
  - в) антигени які поширені у всіх видах тварин
  - г) антигени які відсутні у тварин
  - д) відсутня правильна відповідь
56. Видові антигени еритроцитів:
- а) поширені у всіх видах тварин
  - б) присутні у еритроцитах лише людини
  - в) відсутні у еритроцитах людини
  - г) присутні в еритроцитах людини і тварини
  - д) відсутня правильна відповідь
57. Групові антигени еритроцитів:
- а) ізоантигени тварини і людини
  - б) ізоантигени еритроцитів тварини
  - в) ізоантигени еритроцитів усіх людей
  - г) ізоантигени еритроцитів лише певних груп людини

д) ізоантигени еритроцитів лише певних груп тварин

58. Виберіть вірне твердження:

- а) кожна людина має особистий набір антигенів еритроцитів
- б) олігопротеїди формують антигенну структуру еритроцитів
- в) імунна система не реагує на антигени еритроцитів екзогенного походження
- г) імунна система реагує на антигени еритроцитів ендogenous походження
- д) відсутнє вірне твердження

59. Поділ на групи крові базується на підставі:

- а) присутності лише А та В антигенів еритроцитів
- б) присутності лише А та В антитіл у сироватці крові
- в) присутності Н антигенів на еритроцитах
- г) присутності антигенів резус-фактору
- д) відсутня правильна відповідь

60. До неспецифічних факторів імунітету не відносять:

- а) аглютиніни
- б) комплемент
- в) пропердинову систему
- г) НК-клітини
- д) інтерферон

61. Імунітет:

- а) має більш давню історію вивчення, ніж бактеріологія
- б) є фізіологічною функцією організму
- в) видовий передається по спадковості
- г) набутий не передається по спадковості
- д) набутий при хворобах перетворюється у видовий

62. Клонально-селекційна теорія утворення антитіл:

- а) припускає генетичну неоднорідність клонів лімфоїдних клітин, як результат мутаційних процесів
- б) рахує - лімфоїдні клітини генетично одноманітні, а мутації неможливі
- в) припускає передування клонів лімфоїдних клітин, які мають рецептори до антигенів
- г) пояснює утворення антитіло утворюючих клітин із лімфоїдних їх високою спорідненістю до антигенів
- д) відсутня правильна відповідь

63. Основні положення клонально-селекційної теорії імунітету:

- а) сформульовані Ф. Бернетом
- б) сформульовані Ерне
- в) в присутності антигену не відбувається селекція імунокомпетентних клітин, які формуються на момент народження
- г) антиген при потраплянні в організм виконує роль матриці для формування молекули імуноглобуліну
- д) відсутня правильна відповідь

64. Підберіть вірне твердження: "Згідно клонально-селекційної теорії утворення антитіл пов'язано":

- а) з селекцією в присутності антигену клону імунокомпетентних клітин, що продукують один вид антитіл
- б) зі здатністю кожного клону лімфоцитів розрізняти велику кількість антигенів
- в) з наявністю різноманітних клонів лімфоцитів, кожен з яких розпізнає лише один вид антигену
- г) з мутаційними процесами епітопів антигенів відповідно амінокислової послідовності пептидних ланцюгів Ig
- д) відсутнє вірне твердження

65. Природна стійкість до патогенних бактерій:

- а) змінюється в процесі онтогенезу
- б) залежить від факторів зовнішнього середовища
- в) більш відбита в дитинстві
- г) генетично-детермінована
- д) відсутня у людини

66. Для постановки реакції аглютинації необхідно:

- а) електроліт
- б) комплемент
- в) не імунна сироватка
- г) не корпускулярний антиген
- д) відсутня правильна відповідь

67. Основні властивості комплементу:

- а) білкова природа
- б) одноманітна будова
- в) дія по типу ферментів
- г) присутність тільки в імунній сироватці

д) не руйнується при нагріванні

68. Властивості та використання інтерферону:

- а) використовують при лікуванні та профілактиці вірусних інфекцій і пухлинних хворобах
- б) не використовується при лікуванні хронічних бактеріальних інфекцій
- в) інтерферон виказує специфічність дії по відношенню до вірусів
- г) інтерферон продукують лейкоцити та лімфоцити
- д) відсутня правильна відповідь

69. Властивості та використання інтерферону:

- а) інтерферон людини діє лише в організмі людини
- б) інтерферон діє безпосередньо на віруси
- в) інтерферон переважно використовують з метою лікування
- г) інтерферон відносять до антибіотичних сполук
- д) інтерферон характеризується позаклітинною дією

70. Вірулентність бактерій є:

- а) видова ознака
- б) індивідуальна характеристика штаму
- в) підвищується при пасажі через імунних тварин
- г) знижується при пасажах через сприйнятливих тварин
- д) генотипова ознака

71. Видовий імунітет:

- а) не спадковий
- б) вроджений
- в) набутий
- г) місцевий
- д) інфекційний

72. До факторів неспецифічного захисту організму не відносять:

- а) фагоцитоз
- б) білки гострої фази інфекційного процесу
- в) лізоцим
- г) імуноглобуліни
- д) комплемент

73. До гормонів та медіаторів, які виробляються імунною системою, не відносять:

- а) інтерферон

- б) серотонін
- в) брадікардин
- г) лімфотоксин
- д) лімфокінін

74. Фагоцитоз це:

- а) ланка специфічного імунітету
- б) ланка неспецифічного імунітету
- в) фагоцити здатні розпізнавати антиген
- г) явище характерне лише для людини
- д) відсутня вірна відповідь

75. До фагоцитів відносять:

- а) В лімфоцити
- б) Т лімфоцити
- в) антитіла
- г) комплемент
- д) відсутня правильна відповідь

76. Характеристика фагоцитозу:

- а) фагоцитоз - це поглинання та перетравлення антигенних речовин
- б) у фагоцитозі не приймають участь клітини мезодермального походження
- в) функції макрофагів обмежені при фагоцитарній реакції
- г) мікрофаги - це клітина тканин
- д) відсутня правильна відповідь

77. Характеристика фагоцитозу:

- а) опсоніни приймають участь в імунному фагоцитозі
- б) незавершений фагоцитоз характерний для гострих інфекцій
- в) неактивність фагоцитозу визначається опсоно-фагоцитарним індексом
- г) аутивність фагоцитозу визначається хіміотерапевтичним індексом
- д) неактивність фагоцитозу визначається фагоцитарним показником

78. Властивості макрофагів:

- а) в процесі імунної відповіді трансформуються в клітини імунологічної пам'яті
- б) секретують компоненти комплементу
- в) мають рецептори до Fc-фрагменту Ig
- г) секретують інтерлейкіни
- д) активують комплемент

79. Функції макрофагів:

- а) концентрація антигена та представлення його В-лімфоцитам
- б) продукування Ig
- в) секреція мітогенного фактора
- г) секреція лімфотоксину
- д) лізис атипових клітин

80. Виберіть твердження, яке характеризує сучасне уявлення про певне поняття:

- а) імунітет - нездатність сприймати інфекційні хвороби
- б) імунітет - нездатність сприймати інфекційні хвороби при повторному зараженні
- в) імунітет - комплекс реакцій організму, який забезпечує сталість внутрішнього середовища
- г) імунітет - це підвищена реакція організму на антигенне подразнення
- д) спосіб захисту організму від нерозчинних речовин, які несуть ознаки генетичної чужорідності

81. Титр аглютинуючої сироватки:

- а) найбільше розведення сироватки
- б) найбільше розведення антигену
- в) найменша кількість антигенів у сироватці
- г) не залежить від кратності імунізації тварини
- д) відсутня правильна відповідь

82. Виникнення інфекційної хвороби залежить від:

- а) патогенності та вірулентності бактерій
- б) не залежить від антифагоцитарних властивостей бактерій
- в) агресивності не грають ролі фактора вірулентності
- г) пенетрація - це проникнення в клітини макрофагів патологічних агентів
- д) відсутня правильна відповідь

83. Імунна система організму представлена:

- а) імунокомпетентними клітинами
- б) клітинами сполучної тканини
- в) лімфоцити не є основними функціональними клітинами імунної системи
- г) основним органом імунітету у людини є сумка Фабріціуса
- д) відсутня правильна відповідь

84. Для розвитку специфічної імунної відповіді В-лімфоцити отримують допомогу від:

- а) Т-лімфоцитів

- б) фолікулярних дендритних клітин
- в) базофілів
- г) гепатоцитів
- д) еритроцитів

85. Що означає термін "опсонізація"?

- а) взаємодія антигену збудника з рецепторами імунних клітин
- б) взаємодія компонентів комплементу зі збудником
- в) взаємодія антитіл з антигенними детермінантами збудника з наступним його поглинанням фагоцитом
- г) немає жодного правильного твердження
- д) взаємодія між білками гострої фази

86. Фагоцитарну функцію виконують :

- а) мієлобласти
- б) клітини імунологічної пам'яті
- в) купферівські клітини
- г) В-лімфоцити
- д) Т-лімфоцити

87. В селезінці проходить:

- а) антитілоутворення
- б) розпізнавання антигену, що потрапляє через слизові оболонки
- в) вироблення цитокінів
- г) функціонування Т-лімфоцитів-хелперів
- д) руйнування еритроцитів

88. Клітинний імунітет-це :

- а) індукція цитотоксичних СД8 Т-лімфоцитів
- б) фагоцитарна реакція
- в) антитілоутворення
- г) відторгнення чужорідного трансплантата
- д) гіперчутливість

89. Утворення лейкоцитів проходить в:

- а) лімфатичних вузлах
- б) пейєрових бляшках
- в) тимусі
- г) селезінці
- д) кістковому мозочку



90. Які елементи беруть участь в представленні антигену Т-лімфоцитам?
- а) дендритні клітини і макрофаги
  - б) плазматичні клітини
  - в) тромбоцити
  - г) еозинофіли
  - д) тучні клітини
91. Т-лімфоцити розпізнають антиген, що представлений в асоціації з молекулами:
- а) HLA класу I і II
  - б) імуноглобулінів
  - в) білків гострої фази
  - г) комплементу
  - д) гістаміну
92. В тимусі проходить:
- а) антитілоутворення
  - б) перегрупування генів Т-клітинного рецептора
  - в) розвиток Т-лімфоцитів хелперів
  - г) розвиток тучних клітин
  - д) секреція білків гострої фази
93. Макрофаги виконують функцію:
- а) продуцентів поліклональних антитіл
  - б) клітин, що представляють антиген
  - в) продуцентів комплементу
  - г) мононуклеарних фагоцитів
  - д) відсутня правильна відповідь
94. Яка з характеристик найкраще характеризує властивості гаптенів?
- а) імуногенні, реагують з антитілом .
  - б) імуногенні, не реагують з антитілом
  - в) не імуногенні, реагують з антитілом
  - г) не імуногенні, не реагують з антитілом
  - д) відсутня правильна відповідь
95. Природні клітини - кілери (NK) виконують функцію:
- а) фагоцитозу
  - б) вироблення антитіл
  - в) розпізнавання клітин пухлин

- г) синтезу інтерферону
- д) інактивування імунних комплексів

96. Кооперація клітин у імунній відповіді забезпечується:

- а) стимулюючою дією комплементу
- б) розрізненням по головному комплексу гістосумісності
- в) участю у імунній відповіді ад'ювантів
- г) синтезом інтерлейкінів
- д) антигенрозрізняючими рецепторами

97. Виберіть вірне твердження:

- а) система комплементу належить до факторів специфічного імунітету
- б) система комплементу сама розпізнає антиген
- в) система комплементу стимулює утворення антитіла
- г) система комплементу обумовлює тісний зв'язок між ланками природного та набутого імунітету
- д) відсутнє вірне твердження

98. Система комплементу:

- а) представлена білками сироватки крові
- б) складаються з фракцій, які не активуються у певній послідовності
- в) відтворює ефект відносно периплазми прокаріотів
- г) не характеризується ланцюговими реакціями
- д) відсутня правильна відповідь

99. Виберіть вірне твердження:

- а) в нормі фракції комплементу нативні
- б) фракції комплементу активуються імунними комплексами
- в) фракція C5 є пусковим моментом альтернативного шляху активування комплементу
- г) фракція C5 є пусковим моментом класичного шляху активування комплементу
- д) фракція комплементу C3 активується у крові

100. В нормі постійно активними фракціями комплементу є:

- а) C1
- б) C5
- в) C3
- г) C4
- д) C2

101. Класичний шлях активування комплементу характеризується:
- а) антитілозалежністю
  - б) участю Ig класу А та Ig класу G
  - в) відсутністю комплексу фракцій комплементу C1+ C2 + C4
  - г) припиненням ферментативного активування комплементу при утворенні комплексу C6 + C7 + C8
  - д) відсутня правильна відповідь
102. Виберіть вірне твердження:
- а) комплекс C3 + C5 не характеризується мембраноатакуючими властивостями
  - б) комплекс C3 + C5 характеризується мембраноатакуючими властивостями
  - в) комплекс C3 + C5 не відносять до анафілатоксинів
  - г) комплекс C3 + C5 не викликає деградацію мастоцитів та базофілів
  - д) відсутнє вірне твердження
103. Анафілатоксини спричиняють:
- а) деградацію мастоцитів та базофілів
  - б) скорочення гладкої м'язової системи
  - в) пригнічення синтезу інтерлейкінів
  - г) пригнічення синтезу фактору некрозу пухлин
  - д) пригнічення активності фагоцитозу
104. Альтернативний шлях активування комплементу обумовлює:
- а) утворення комплексу C1 + C4 + C2
  - б) утворення комплексу – антиген + антитіло
  - в) утворення комплексу – антиген + C3
  - г) зв'язування антигенів ліпополіпротейнів
  - д) відсутня вірна відповідь
105. Варіоляцію запропонував:
- а) Пастер – 1856 рік
  - б) Дженер – 1796 рік
  - в) Мечніков - 1874 рік
  - г) Ерліх – 1915
  - д) Ландштейнер – 1900 рік
106. Творцем теорії тканинного імунітету є:
- а) Пастер
  - б) Дженер

- в) Мечніков
- г) Ерліх
- д) Ландштейнер

107. Творцем теорії гуморального імунітету є:

- а) Пастер
- б) Дженер
- в) Мечніков
- г) Ерліх
- д) Ландштейнер

108. Методи отримання моноклональних антитіл запропонували:

- а) Медавар, Тонегав
- б) Зільбер, Єрмольєва
- в) Келер, Мільстайн
- г) Бернет, Заболотний
- д) Ландштейнер, Мільстайн

109. Серологія займається вивченням:

- а) імунних факторів кров'яної сироватки
- б) хімічної природи імунних факторів
- в) біологічних принципів розпізнання –"своє – чуже"
- г) здатність перещеплювати імунні реакції за допомогою генів
- д) відсутня правильна відповідь

110. Імунохімія займається вивченням:

- а) імунних факторів кров'яної сироватки
- б) хімічної природи імунних факторів
- в) біологічних принципів розпізнання –"своє – чуже"
- г) здатність перещеплювати імунні реакції за допомогою генів
- д) відсутня правильна відповідь

111. Гемолітичні сироватки:

- а) отримують шляхом гіперімунізації чужорідними еритроцитами
- б) використовують з метою лікування
- в) приймають участь в основній системі РСК
- г) викликають лізис еритроцитів в присутності комплекменту
- д) використовують в індикаторній системі при постановці РСК

112. Інфекційна імунологія займається вивченням:

- а) генетичного контролю імунних реакцій
- б) механізмів несприйнятливості до інфекційних хвороб
- в) імунологічних аспекти несумісності тканин
- г) розробкою нових технологій виробництва вакцин
- д) імунологічних реакцій протипухлинного імунітету

113. Фітоімунологія займається вивченням:

- а) стійкість рослин до збудників бактеріозів
- б) хімічної природи імунних факторів
- в) біологічних принципів розпізнання – "своє – чуже"
- г) здатність перещеплювати імунні реакції за допомогою генів
- д) відсутня правильна відповідь

114. Реакція гемолізу:

- а) не супроводжується лізисом еритроцитів
- б) не використовується як індикаторна
- в) має діагностичне значення
- г) відбувається з нормальною сироваткою
- д) вимагає обов'язкової присутності комплементу

115. Антитіла класу Ig G володіють здатністю:

- а) преципітувати антиген
- б) переходити через плаценту від матері до плоду
- в) активувати комплемент
- г) утворювати імунні комплекси
- д) активно переходити в секреторні рідини

116. Антитіла класу Ig E здатні:

- а) фіксувати комплемент
- б) утворювати імунні комплекси
- в) переходити в секреторні рідини
- г) фіксуватись на поверхні тучних клітин

117. До алергічних реакцій негайного типу відносять:

- а) анафілактичний шок
- б) сироваткову хворобу
- в) реакція відторгнення трансплантату
- г) гемолітичну хворобу новонароджених
- д) atopії

118. Непрямий метод імунофлуорисценції:

- а) передбачає наявність антимікробної імунної сироватки
- б) передбачає наявність антиглобулінової сироватки
- в) враховується під мікроскопом
- г) антигени фіксовані на склі
- д) передбачає присутність цитохромів

119. Алергічні реакції сповільненого типу характеризуються:

- а) наявністю сенсibilізованих лімфоцитів
- б) труднощами проведення сенсibilізації
- в) пасивною передачею з сироваткою
- г) ураженням гладкої мускулатури
- д) адаптивним фактором передачі

120. Антитіла класу IgE виробляють:

- а) базофіли
- б) плазматичні клітини
- в) Т-лімфоцити
- г) гранулоцити
- д) тучні клітини

121. Молекула імуноглобуліну має у своєму складі:

- а) активний центр
- б) Fc-фрагмент
- в) дисульфідні зв'язки
- г) полісахаридну детермінанту
- д) домени

122. Антитіла класу Ig A володіють здатністю:

- а) брати участь в клітинному лізисі
- б) одержувати секреторний компонент
- в) переходити в секреторні рідини
- г) фіксуватись на поверхні тучних клітин
- д) приймати участь у противірусному імунітеті

123. Первинні імунодефіцити розвиваються в результаті:

- а) генетичних порушень
- б) дії інфекційних факторів
- в) глікокортикоїдної терапії
- г) впливу радіації

д) нездорового способу життя

124. Визначити вірулентність бактерій можливо за допомогою:

- а) визначення  $D_{1m}$
- б) визначення токсигенності
- в) визначення антигенних властивостей
- г) визначення групових та видових антигенів
- д) відсутня правильна відповідь

125. Екзотоксини:

- а) продукти вторинного метаболізму живих клітин
- б) термостабільні
- в) здатні до вибіркової дії
- г) не є чинниками патологічних процесів
- д) не діють по типу ферментів

126. Ендотоксини:

- а) однакові з повними антигенами грам від'ємних бактерій
- б) володіють вибірковою дією
- в) є термолабільними речовинами
- г) використовують для приготування анатоксину
- д) не виділяються після руйнування бактеріальної клітини

127. Властивості активних центрів антитіл:

- а) утворені Н та  $\alpha$  поліпептидними ланцюгами
- б) утворені важкими ланцюгами
- в) утворені константними доменами
- г) мають різні ідіотипи
- д) утворені варіабельними доменами

128. Анатоксини:

- а) продукти життєдіяльності вірулентних бактерій
- б) використовуються як вакцини
- в) не викликають в організмі продукцію антитоксинів
- г) отримують з ендотоксину
- д) за хімічною структурою - поліцукри

129. Антитоксин:

- а) продукт мікробних ендотоксинів
- б) не утворюється в організмі живої істоти

- в) вступає в реакцію з антитілами
- г) викликає антитоксичний імунітет
- д) не відноситься до групи імуноглобулінів

130. Антитоксичний імунітет виникає при:

- а) введенні ендотоксину
- б) імунізації анатоксином
- в) імунізації будь-яким білком
- г) введенні антитоксичної сироватки
- д) введенні гаптенів

131. Набутий імунітет:

- а) поділяється на клітинний та гуморальний
- б) не має специфічності
- в) формується в процесі філогенезу
- г) передається по спадковості
- д) спрямований проти антигену, що викликав його утворення

132. Набутий імунітет:

- а) розвивається внаслідок зміни генотипу
- б) виникає при штучній імунізації
- в) передається через плаценту
- г) створюється пасивно
- д) є індивідуальним

133. Властивості активних центрів антитіл:

- а) утворені Н та  $\alpha$  поліпептидними ланцюгами
- б) утворені важкими ланцюгами
- в) утворені константними доменами
- г) мають різні ідіотипи
- д) утворені варіабельними доменами

134. Толерантність виникає при введенні антигену:

- а) ембріону
- б) новонародженому
- в) дорослому
- г) через ротову порожнину
- д) парентерально
- е) при великій дозі антигену



135. Подолання імунітету до трансплантату можливо при:
- а) рентгенівському опроміненні
  - б) діями антибіотичних сполук
  - в) використанні великих доз антигену
  - г) використанні імунодепресантів
  - д) введенні антилімфоцитарної сироватки
136. Аглотинація використовується для:
- а) серодіагностики інфекційних хвороб
  - б) санітарно-гігієнічних досліджень
  - в) визначення мікроорганізмів у зовнішньому середовищі
  - г) серологічної ідентифікації бактерій
  - д) визначення фракцій білку
137. Механізм аглотинації пов'язаний з:
- а) проникністю клітинних мембран
  - б) зарядом мікробних клітин
  - в) поверхневим натягом оболонки мікробної клітини
  - г) зміною дисперсійності сироваткових глобулінів
  - д) агрегацією мікробів
  - е) афінними властивостями
138. З метою отримання аглотинуючих сироваток імунізують:
- а) мишей
  - б) морських свинок
  - в) кролів
  - г) баранів
  - д) коней
  - е) велику рогату худобу
139. Титр преципітуючої сироватки:
- а) є найбільшим розведенням сироватки
  - б) є найбільшим розведенням антигену
  - в) визначається з розведеною сироваткою
  - г) визначається в міжнародних одиницях
  - д) визначається в антитоксичних одиницях
140. Реакція преципітації використовується для:
- а) діагностики інфекційних хвороб
  - б) визначення мікробного забруднення ґрунту

- в) виявлення фальсифікації продуктів
- г) визначення групової належності білка
- д) визначення групи крові
- е) визначення резус-фактора

141. Антитіла - лізини:

- а) розчиняють клітини рослинного та тваринного походження
- б) викликають злипання бактерій та спірохет
- в) діють у присутності комплементу
- г) пригнічують активність мікробних ферментів
- д) діють при відсутності комплементу
- е) викликають лізис еритроцитів

142. Імунобіологія займається вивченням:

- а) імунних факторів кров'яної сироватки
- б) хімічної природи імунних факторів
- в) біологічних принципів розпізнання – "своє – чуже"
- г) здатність перещеплювати імунні реакції за допомогою генів
- д) відсутня правильна відповідь

143. Основні властивості живих вакцин:

- а) висока імуногенність
- б) відсутність відбитої реактивності
- в) не здатні до розмноження в організмі
- г) адсорбовані важкорозчинних речовинах

144. Хімічні вакцини:

- а) вміщують цілі мікробні клітини
- б) отримують при обробці мікробів формаліном та при нагріванні
- в) отримують методом хімічної екстракції антигенів
- г) повноцінними антигенними комплексами
- д) викликають утворення антитоксичного імунітету

145. Вбиті вакцини:

- а) отримують з мікробів
- б) отримують з токсинів
- в) виявляють високі імуногенні властивості
- г) приймають для профілактики інфекції
- д) використовують для лікування деяких хвороб

146. Антитілоутворення зменшується:
- а) під впливом антибіотиків
  - б) при опроміненні організму до введення антигену
  - в) при введенні антигену після опромінення організму
  - г) при надмірному введенні антигену
  - д) при стані імунологічної толерантності
  - е) при вторинній імунній відповіді
  - є) виключає роль антигену у формуванні клонів клітин, які утворюють антитіла
147. Взаємодія антитіл з антигенами характеризується:
- а) швидким об'єднанням детермінантних груп
  - б) повільним з'єднанням детермінантних груп
  - в) зворотністю реакції та легкістю елюції
  - г) незворотність реакції та тяжка елюція
  - д) виділенням невеликої кількості тепла
148. Антитоксична одиниця (АО):
- а) визначається в реакції флокуляції
  - б) є еквівалентом антигенної одиниці
  - в) є найменшою кількістю сироватки, що нейтралізує певну кількість R<sub>dm</sub> токсину
  - г) може бути визначена біологічним методом
  - д) є синонімом поняття титру антитоксичної сироватки
149. Неповні антитіла:
- а) володіють дивалентністю
  - б) є моновалентними
  - в) при об'єднанні з антигеном утворюють великі конгломерати
  - г) викликають блокаду антигену без випадку в осад
  - д) блокований антиген легко випадає в осад
  - е) отримали назву гаптенів
150. До алергічних реакцій сповільненого типу відносять:
- а) анафілактичний шок
  - б) феномен Артюса
  - в) бронхіальна астма
  - г) шкіряно-алергічні проби
  - д) сироваткова хвороба
151. До алергічних реакцій негайного типу відносять:

- а) анафілактичний шок
- б) неінфекційну алергію
- в) алергічні реакції при деяких інфекційних хворобах
- г) сироваткову хворобу
- д) шкіряну реакцію на туберкулін
- е) реакцію відторгнення гемотрансплантату
- є) пасивну анафілаксію

152. Алергія це:

- а) підвищена чутливість
- б) понижена чутливість до повторного введення антигену
- в) підвищена загальна чутливість
- г) відсутність чутливості
- д) один із типів імунної відповіді

153. Непрямий метод імуофлюоресценції:

- а) передбачає мітку антимікробної імунної сироватки
- б) передбачає мітку антиглобулінової сироватки
- в) використовується для виявлення збудника в патологічному матеріалі
- г) потребує великої кількості мічених імуноглобулінів

154. Алергічні реакції виникають при:

- а) наявності первинної сенсibiliзації організму
- б) гіперпродукції IgE
- в) введенні дозволеної дози антигену
- г) дрібному введенні антигену
- д) стані імунологічної толерантності
- е) при введенні чужорідного білку

155. Протипухлинний імунітет характеризується:

- а) станом імунодефіциту в організмі людини
- б) наявністю у хворих пухлинами специфічних протівірусних антитіл та Т-лімфоцитів-кілерів
- в) наявністю специфічних антигенів пухлин
- г) основну роль мають у протипухлинному імунітеті Т-лімфоцити та природні кілери НК
- д) протипухлинні антитіла мають стимулююче значення в розвитку процесу (хвороби)

156. Алергічні реакції негайного типу характеризуються:

- а) наявністю циркулюючих в крові антитіл

- б) пасивною передачею
- в) утворення опсонінів
- г) відсутністю ушкодження гладкої мускулатури
- д) виявляється через 30 годин

157. Для мікробіологічної діагностики алергічного стану використовують:

- а) пробу Паустніца-Кюстнера
- б) внутрішньошкірні та підшкірні введення антигену
- в) знаходження неповних антитіл
- г) проба Шику
- д) радіоалерготест
- е) знаходження IgA

158. Для створення стійкого протинфекційного імунітету необхідно:

- а) одноразове введення великої дози антигену
- б) вакцину вводять багаторазово з інтервалами
- в) вакцину вводять в комплексі з імуноглобулінами
- г) одноразове введення імуноглобулінової фракції сироватки

159. Вторинна імунна відповідь забезпечується:

- а) IgM
- б) IgA сироватковий
- в) IgA секреторний
- г) IgE
- д) IgД
- е) IgQ
- є) тімусом
- ж) Т- та В-клітинами імунологічної пам'яті
- з) тривалим збереженням Ig в крові
- и) активністю комплементу

160. Методи визначення стану Т-системи:

- а) бласттрансформація на фітогемаглютинін
- б) тест Е-роzetки з еритроцитами барана
- в) тест АЕ-роzetки
- г) рівень Ig в крові
- д) визначення присутності Т-сенсibiliзованих лімфоцитів

161. Клінічні форми гіперчутливості негайного типу:

- а) анафілаксія

- б) сироваткова хвороба
- в) бронхіальна астма
- г) кропивниця
- д) контактна алергія

162. Гіперчутливість сповільненого типу:

- а) сінна лихоманка
- б) інфекційна алергія
- в) атопії трансплантаційний імунітет

163. Які інгредієнти необхідні для ідентифікації збудника в реакції аглютинації:

- а) імунна діагностична сироватка
- б) комплемент
- в) Т-лімфоцити
- г) кров хворого
- д) діагностикум (антиген)

164. Які інгредієнти необхідні для визначення антитіл в сироватці за допомогою реакції імунного лізису:

- а) діагностикум
- б) комплемент
- в) плазмоцити
- г) інтерлейкін
- д) інтерферон

165. Отримання імунних діагностичних сироваток відбувається шляхом:

- а) імунізації тварин IgA
- б) імунізація тварин антигенами мікробних клітин
- в) введенням інтерлейкинів 1, 2
- г) введенням лімфокинів
- д) введенням анатоксинів
- е) введенням імуноглобулінів

166. Вакцина це:

- а) комплекс антитіл
- б) комплекс гамаглобулінів
- в) лейкоцитарний інтерферон
- г) комплекс антигенів з бактерій та продуктів їх життєдіяльності

167. H $\alpha$ A - антигени гістосумісності:

- а) представлені на лейкоцитах периферичної крові

- б) є ізоантигенами гістосумісності
- в) є імунокомпетентними клітинами
- г) це антигени мікробних клітин
- д) не мають значення при трансплантаційному імунітеті
- е) антигени HLA однакові у тварини та людини
- є) визначають схильність до деяких хвороб
- ж) HLA найбільше вміщуються у лімфоїдній тканині

168. Властивості Ig класу “А”:

- а) поділяються на сироваткові та секреторні
- б) не грають ролі в місцевому імунітеті
- в) не мають форми димера
- г) проникають через плаценту
- д) перші з’являються при вторинній імунній відповіді

169. Властивості Ig класу “Е”:

- а) не здатні адсорбуватися на клітинах
- б) значно збільшується кількість при алергічних реакціях
- в) не виявляють специфічності при взаємодії з алергеном
- г) не характерна цитофільність
- д) є пентамерами

170. Властивості Ig класу “М”:

- а) перші з’являються при первинній відповіді
- б) пентамер
- в) забезпечує місцевий імунітет за рахунок цитофільності
- г) не вступають в реакцію з антигенами

171. Визначить позначення, що відповідає в структурі Ig за цитофільність:

- а) Fa
- б) Fab
- в) Fc
- г) Fd
- д) Fb

172. Функціональна оцінка Т-лімфоцитів включає:

- а) реакцію Е-розеткоутворення з еритроцитами барана
- б) оцінку поверхневих антигенів
- в) реакцію бласттранс формації під впливом фітогемаглютинінів
- г) підрахунок О-клітин

- д) визначення концентрації Ig в сироватці крові
- е) визначення кількості сенсibiliзованих лейкоцитів

173. Антитіла здатні пригнічувати імунну реакцію шляхом:

- а) зв'язування комплекменту
- б) зв'язування антигену та попередженням його допуску до антитілоутворюючих клітин
- в) блокування активного центру антитіл антидіотиповими антитілами

174. Який з нижче перерахованих препаратів можна віднести до вакцин:

- а) імуноглобуліни
- б) протективний антиген
- в) вбиті або атенуйовані мікроорганізми
- г) антитоксини
- д) анатоксини

175. Для визначення В-клітинної лінії імунітету необхідно поставити:

- а) Е-розеткоутворення з еритроцитами барана
- б) реакцію Манчіні
- в) ЕАС-розеткоутворення - е-еритроцити, А-антитіла, С-комплемент
- г) кількість імуноглобулінів у сироватці крові

176. Які з перерахованих тверджень мають рацію:

- а) активний імунітет відтворюється після введення антигенів
- б) активний імунітет утворюється при введенні імуноглобулінів
- в) активний імунітет утворюється після введення анатоксину
- г) активний імунітет утворюється після введення вакцин
- д) активний імунітет утворюється лише при первинній імунній відповіді

177. Анатоксин - це:

- а) імунна сироватка
- б) антитоксин
- в) екзотоксин
- г) знешкоджений токсин
- д) антиген

178. Патогенні бактерії:

- а) здатні викликати захворювання
- б) постійно зберігають високий рівень вірулентності
- в) продукують токсини



г) продукують ферменти патогенності (лацитіназа, плазмокоагулаза, гіалуронідаза, стрептокіназа).

д) не ростуть на штучних поживних середовищах

е) обов'язково продукують токсини (гемолізини).

179. Визначення імунологічного статусу, що характеризує функціональний стан В-лімфоцитів, проводиться:

а) визначенням загальної кількості лімфоцитів

б) реакція Е-розеткоутворення з еритроцитами барана

в) реакція ЕАС-розеткоутворення (Е-еритроцити, А-антиген, С-комплемента)

г) визначення кількості Ig в реакції Манчіні

180. Для постановки реакції Манчіні необхідні наступні інгредієнти:

а) сироватка хворого

б) комплемент

в) еритроцити барана

г) антиглобулінова сироватка проти кожного класу Ig

д) гель

181. Вакцини це:

а) живі послаблені мікроорганізми

б) інактивовані мікроби

в) антитоксини

г) знешкоджені формаліном анатоксини

д) протективні антигени

е) представники бактерій близькородинної популяції, які не є патогенними для людини (дивергентні)

є) рекомбінантні або векторні

182. Алергічні реакції негайного типу характеризуються:

а) розвитком патологічного стану (сенсibiliзація) через 30-120 хвилин

б) присутністю в сироватці антитіл класу "А"

в) накопиченням клону лімфоцитів Т-кіллерів

г) можливо провести десенсибілізацію

д) спазм гладкої мускулатури

е) продукцією вазоактивних амінів

183. Ефективна профілактика інфекційних хвороб залежить від:

а) усунування джерела інфекції

б) підвищення імунітету населення

в) руйнування зв'язку між джерелом та сприйнятливим організмом

г) визначення санітарно-гігієнічного стану оточуючого середовища

184. Антитіла по хімічній природі є:

- а) глікопротеїди
- б) ліпопротеїди
- в) альфа-глобуліни
- г) гама-глобуліни

185. Імуноглобуліни класу "G":

- а) в імунній відповіді з'являються раніше за інші
- б) мають два активних центри
- в) вміщують два  $\alpha$  та два  $H$  поліпептидні ланцюги
- г) не проникають через плаценту
- д) приймають участь у створенні пасивного імунітету

186. Що відноситься до алергічних реакцій сповільненого типу?

- а) анафілактичний шок
- б) сироваткова хвороба
- в) бронхіальна астма
- г) шкірно-алергічні проби

187. Характеристика В-лімфоцитів:

- а) є попередниками плазмоцитів
- б) є ефекторними клітинами
- в) мають на поверхні рецептори до антигенних детермінант
- г) диференціація відбувається в селезінці
- д) характерна специфічність дії
- е) є похідними поліпотентної стовбурової клітини кісткового мозку

188. Характеристика Т-лімфоцитів:

- а) диференціація відбувається в клітинах, що продукують антитіла
- б) продукують комплемент
- в) диференціація на субпопуляції: кілерів, супресорів, хелперів
- г) трансформуються в плазматичні клітини
- д) трансформуються в ампліфайери
- е) трансформуються в О-лімфоцити
- є) трансформуються в НК-клітини

189. З'ясувати, яке твердження вірне:

- а) патогенні мікроорганізми обов'язково викликають хворобу

- б) розвиток хвороби залежить від опору організму
- в) розвиток хвороби залежить від вірулентності макроорганізму
- г) розвиток хвороби залежить від опору організму та вірулентності мікроорганізмів
- д) розвиток хвороби залежить від інфікуючої дози

190. Противірусний імунітет:

- а) носить неспецифічний характер
- б) антитіла не ефективні проти внутрішньоклітинного вірусу
- в) ефективно інактивує вірус на слизових оболонках Ig "А"
- г) відносно вірусів характерне явище незавершеного фагоцитозу
- д) інтерферон викликає продукування ферментів, які інгібують синтез компонентів вірусу

191. Характеристика ГСТ:

- а) реакція ГСТ може викликатися практично всіма антигенами
- б) механізм алергічної реакції полягає в сенсibiliзації Т-лімфоцитами
- в) сенсibiliзовані Т-лімфоцити стимулюють продукцію інтерлейкіна-2
- г) не спостерігається активізація макрофагів
- д) можлива пасивна передача за рахунок адаптивного імунітету
- е) контактна алергія виникає під впливом низькомолекулярних антигенів

192. Характеристика детермінант, антитіл:

- а) ізотипові детермінанти розташовані на Fc
- б) ізотипові детермінанти дають можливість поділу імуноглобулінів на класи та підкласи
- в) ізотипові детермінанти є індивідуальними характеристиками Ig
- г) алотипи імуноглобулінів контролюються доменами варіабельних ділянок Ig
- д) алотипові детермінанти загальні для всіх класів Ig
- е) ідіотипові детермінанти визначаються послідовністю молекул
- є) легкі ланцюги мають два домену
- ж) важкі ланцюги мають 4 домену

193. Характеристика інфекційного процесу:

- а) інфекція - це проникнення мікроорганізму в макроорганізм
- б) інфекційна хвороба - найбільш відбита форма інфекційного процесу
- в) контамінація - це бактеріальне забруднення предметів оточуючого середовища та харчових продуктів
- г) зараження - властивість передачі

д) клінічне одужання - це повне виведення з організму хворої людини збудників інфекційної хвороби

е) період реконвалесценції - розпал хвороби

194. Основні епідеміологічні поняття:

а) епідемічний процес - ланцюг безперервних захворювань, що викликається циркулюючим в навколишньому середовищі збудником

б) спорадичні хвороби - масові спалахи хвороби

в) епідемія - пік захворювань на певній території

г) пандемія - розповсюдження хвороби на декількох континентах

д) ендемія - не характерна інтенсивність епідемічного процесу

е) інтенсивність епідемічного процесу відбивається кількістю летальних наслідків на 10 тис. населення

є) інфекційні хвороби не розрізняються по ступеню розповсюженості

195. Протипухлинний імунітет характеризується:

а) станом імунодефіциту в організмі людини

б) наявністю у хворих пухлинами специфічних противірусних антитіл та Т-лімфоцитів-кілерів

в) наявністю специфічних антигенів пухлин

г) основну роль мають у протипухлинному імунітеті Т-лімфоцити та природні кілери НК

д) протипухлинні антитіла мають стимулююче значення в розвитку процесу (хвороби),

196. Алергічні реакції сповільненого типу характеризуються:

а) наявністю сенсibiliзованих лімфоцитів

б) ушкодженням будь-якої тканини

в) тяжко провести десенсибілізацію

г) пасивною передачею з сироваткою

д) ураженням гладкої мускулатури

е) виділенням вазоактивних амінів

197. Інфекційні хвороби характеризуються:

а) циклічністю перебігу

б) відсутністю контагіозності

в) однаковим інкубаційним періодом

г) наявністю предромального періоду

198. Форми інфекції:

- а) бактеріоносієство
- б) реінфекція
- в) суперінфекція
- г) персистуюча інфекція
- д) інапарантна інфекція
- е) хронічна інфекція

199. Реінфекція:

- а) повторне інфікування бактеріями іншого виду
- б) повторне інфікування бактеріями того ж виду
- в) наявність бактерій у крові
- г) розмноженням бактерій у крові
- д) виникає при хворобах із стійким імунітетом
- е) можлива за рахунок мікробів нормальної мікрофлори
- є) інфікування бактеріями, які продукують ендотоксин

200. Вірулентність бактерій - це:

- а) видова ознака
- б) індивідуальна характеристика штаму
- в) підвищується при пасажі через імунних тварин
- г) знижується при пасажах через сприйнятливих тварин
- д) генотипова ознака
- е) фенотипова ознака

## РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

### Основна

1. Кохан І. Імунологія. - Київ. - Торонто. Кобза, 1994.
2. Інфекційні хвороби (підручник) (за ред. О. А. Голубовської). — Київ: ВСВ «Медицина» (2 видання, доповнене и перероблене). — 2018. — 688 С. + 12 с. кольор. вкл. (О. А. Голубовська, М. А. Андрейчин, А. В. Шкурба та ін.) ISBN 978-617-505-675-2
3. Інфекційні хвороби: енциклопедичний довідник / за ред. Крамарьова С. О., Голубовської О. А. — К.: ТОВ «Гармонія», 2018. — 592 с. ISBN 978-966-2165-52-4 (Крамарьов С. О., Голубовська О. А., Шкурба А. В. та ін.)
4. Інфекційні хвороби: підручник / За ред. О. А. Голубовської — К.: ВСВ «Медицина», 2012. — 728 с. + 12 с. кольор. вкл.; (О. А. Голубовська, М. А. Андрейчин, А. В. Шкурба та ін.) ISBN 978-617-505-214-3
5. Сучасні технології організації протидії розповсюдженню ВІЛ/СНІДу та наркозалежності: роль первинної медичної допомоги на засадах сімейної медицини. Навчальний посібник. Нац. мед. ун-т ім. О. О. Богомольця, Укр. тренінг. центр сімейної медицини. — Київ: КІМ, 2015. — 495 с. : іл. ISBN 978-617-628-037-8 (із співавт.)
6. Інфузійна терапія інфекційних хвороб: Посібник-довідник практикуючого лікаря: для лікарів-інтернів і лікарів-слухачів передатестаційних циклів та циклів тематичного удосконалення закладів (ф-тів) післядипломної освіти / І. П. Шлапак, О. А. Голубовська, О. А. Галушко. — Київ: [б. в.], 2015. — 287 с. : табл. — Бібліогр.: с. 280—287. — ISBN 978-966-2544-11-
7. Інфузійна терапія інфекційних хвороб: Посібник-довідник практикуючого лікаря: для лікарів-інтернів і лікарів-слухачів передатестаційних циклів та циклів тематичного удосконалення закладів (ф-тів) післядипломної освіти / І. П. Шлапак, О. А. Голубовська, О. А. Галушко. — Київ: [б. в.], 2015. — 287 с. : табл. — Бібліогр.: с. 280—287. — ISBN 978-966-2544-11-4
8. Інфекційні хвороби (підручник) (за ред. О. А. Голубовської). — Київ: ВСВ «Медицина» (3 видання, перероблене і доповнене). — 2020. — 688 С. + 12 с. кольор. вкл. (О. А. Голубовська, М. А. Андрейчин, А. В. Шкурба та ін.) ISBN 978-617-505-814-5
9. Інфекційні хвороби (підручник) (за ред. О. А. Голубовської). — Київ: ВСВ «Медицина» (4 видання, перероблене і доповнене). — 2022. — 464 С.; кольор. вид. (О. А. Голубовська, М. А. Андрейчин, А. В. Шкурба та ін.) ISBN 978-617-505-909-8

10. Коронавірусна хвороба 2019. / О. А. Голубовська, А. В. Шкурба, О. В. Безродна та ін.; за ред. О. А. Голубовської. — Київ. «Професійні видання. Україна», 2023. — 300 с. ISBN 978-617-7911-13-4
11. Experience of Using Metformin in Patients Infected with HCV Genotype 3 with Concomitant Metabolic Disorders. / *Endocrinol Metab Synd* 2015; № 4:163. (англ.)
12. Original inhibition method of excessive synthesis of pro-inflammatory cytokine of tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Central European Journal of Immunology* 3/2015 with DOI number: 10.5114/cej.2015.54597 pp. 345—349. (із співавт.) (англ.)
13. Infectious Diseases: textbook / О.А. Holubovska, М.А. Andreichyn, А. V. Shkurba et al.; edited by О.А. Holubovska. — Kyiv: AUS Medicine Publishing, 2018. — 664 p. + 12 p. colour insert. ISBN 978-617-505-727-8 (англ.)
15. Case Report of Combined Echinococcosis — Diagnostic and Treatment Peculiarities // *Клиническая инфектология и паразитология (международный научно-практический журнал)*. — 2019. — № 2(13). — С. 6–14. (із співавт.) (англ.)
16. Some aspects of management of HIV-infected patients with pathology of digestive system in context of family medicine practice // *EUMG*. — Vol 8 No 1 (2020). — p. 72-81 (англ.)

#### **Додаткова**

1. Вершигора А.Е. Основы иммунологии. - К.; Вища школа, 1980.
2. Звір Г.І., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Тести з імунології: Навчальний посібник. – Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. – 176 с.
3. Імунологія: Підручник / Вершигора А.Ю., Пастер Є.У., Колибо Д.В. та ін. – К.:Вища школа, 2005. – 599 с.
4. Імунологія. Під ред Є.У. Пастера. – К.; Вища школа, 2005.
5. Основы иммунологии : лабораторний практикум / уклад. : К. Г. Гаркава, А. В. Дразнікова. – К. : НАУ, 2015. – 60 с.
6. Пастер Є.У., Овод В.В., Позур В.К., Вихоть Н.Е. Імунологія. Практикум. - К.: Вища школа. 1989..
7. Пухлик Б.М. Елементарна алергологія. – Вінниця: Велес, 2002. – 148 с.
8. Пухлик Б.М. Алергологія.- Нова книга.- Вінниця.- 2004.- 228с.
9. Ситник І.О., Климнюк С.І., Творко М.С. Мікробіологія, вірусологія, імунологія. - Укрмедкнига. 1998.
10. Скок М. В. Основы иммунологии : курс лекцій / М. В. Скок. – Київ : Фітосоціоцентр, 2002. – 151 с. – 966-7938-81-6.
11. Холодна Л. С. Імунологія : підручник / Л. С. Холодна. – Київ : Вища школа, 2007. – 270 с. – 978-966-642-377-4.
12. Якобисяк М. Імунологія / М. Якобисяк ; пер. с пол. ; за ред. проф. В. В. Чоп'як. – Вінниця : Нова книга, 2004. – 660 с. – 966-7890-38-4.

## Інформаційні ресурси в Інтернеті

1. <https://biomed.knu.ua/institute-activity/educational/kafedry/kafedra-microbiology-and-immunology/biblioteka/2300-imunologiya-vibrani-rozdili-avtori-vershigora-a-yu-paster-e-u-kolibo-d-v-ta-in.html>
2. <https://biomed.knu.ua/institute-activity/educational/kafedry/kafedra-microbiology-and-immunology/biblioteka/2300-imunologiya-vibrani-rozdili-avtori-vershigora-a-yu-paster-e-u-kolibo-d-v-ta-in.html>
3. <https://www.nuozu.edu.ua/s/np/k/medytsyny-nevidkladnykh-staniv/navchalna-robota/1835-perelik-rekomendovanoi-literatury>
4. [https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/45929/1/Imunolohiia\\_ta\\_alerholohiia.pdf](https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/45929/1/Imunolohiia_ta_alerholohiia.pdf)
5. [http://medterms.com.ua/publ/medichni\\_termini\\_na\\_literu\\_i/imunologija/10-1-0-1844](http://medterms.com.ua/publ/medichni_termini_na_literu_i/imunologija/10-1-0-1844)