

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІММУНОЛОГІЇ

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДЛЯ ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ
З МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІММУНОЛОГІЇ**

Частина II

Київ - 2020 рік

Зміст

Практичне заняття	ТЕМА	Сторінка
№10	Неспецифічні фактори захисту організму від мікроорганізмів	3
№11	Серологічні реакції (1 заняття)	9
№12	Серологічні реакції (2 заняття)	14
№13	Серологічні реакції з мітками	21
№14	Вакцини та імунні сироватки	29
№15	Сучасні методи мікробіологічної діагностики інфекційних захворювань	37
	Рекомендована література	43

Практичне заняття №10

Тема: «Неспецифічні фактори захисту організму від мікроорганізмів»

Актуальність теми:

В організмі людини постійно відбуваються складні процеси і явища, які направлені на підтримку функціональної цілісності організму, сталості (постійності) хімічного і клітинного складу внутрішнього середовища – тобто, гомеостазу. Захист організму від чужорідних агентів відбувається на двох рівнях: неспецифічної резистентності та специфічного імунітету. Перший – філогенетично більш давній рівень складається з неспецифічних факторів захисту (НФЗ), які діють проти будь-якого чужорідного агента.

До НФЗ відносяться захисні функції шкіри, слизових оболонок, лімфатичних вузлів, шлунковий сік, гідролітичні ферменти; продукція інгібіторів, лізоциму, інтерферону та інші; антагоністичні властивості мікрофлори людини; бактерицидні властивості крові: комплемент, бета-лізини, лейкоїни, нормальні антитіла і інші речовини, які мають бактерицидну дію; фагоцитоз.

Механізми неспецифічної резистентності функціонують в організмі постійно і обумовлюють в випадках масивної мікробної чи (або) іншої дестабілізуючої дії запальну реакцію, однакову при різних збудниках.

При порушенні складових неспецифічної резистентності спостерігаються різні захворювання. Тому своєчасне визначення змін кількісного, якісного або функціонального стану різних факторів неспецифічного захисту дає можливість оцінити стан імунної системи людини, допомогти в діагностиці, профілактиці і терапії інфекційних і неінфекційних захворювань. Все це зумовлює актуальність теми заняття та спрямоване на формування позитивної мотивації її вивчення.

Конкретні цілі:

- Оволодіти методикою визначення лізоциму в сироватці крові людини титраційним методом.
- Здійснити облік реакції титрування комплементу в сироватці крові за 100% гемолізом, розглянути постановку і особливості цієї реакції, зробити висновки.
- Ознайомитись з явищем незавершеного фагоцитозу в демонстраційних препаратах.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція).

Назви попередніх дисциплін	Отримані навички
Анатомія людини	Аналізувати інформацію про будову тіла людини, системи, що його складають, органи і тканини.
Гістологія, цитологія, ембріологія	Інтерпретувати мікроскопічну та субмікроскопічну структуру клітин.

Медична і біологічна фізика	Трактувати загальні фізичні та біофізичні закономірності, що лежать в основі біологічних процесів.
Медична біологія	Пояснювати на молекулярно-біологічному та клітинному рівні закономірності біологічних процесів.
Медична хімія	Трактувати загальні фізико-хімічні закономірності, що лежать в основі процесів розвитку клітин.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Імунітет	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. До НФЗ відносяться бар'єрна функція шкіри, слизових оболонок, лімфатичних вузлів, бактерицидні речовини рідин організму (слини, сироватки крові та ін.), видільна функція, температурна реакція, фагоцитоз, антагоністичні властивості нормальної мікрофлори та ін.
Лізоцим	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	Складний комплекс білків крові, який складається з 9 фракцій, кожна з яких має певну властивість. Комплемент синтезується клітинами печінки. Функції: викликає лізис мікробів; бере участь в специфічних імунологічних реакціях, нейтралізації вірусів; посилює фагоцитоз, хемотаксис, запалення.
Пропердин	Високомолекулярний (230 тис. дальтон) білок сироватки крові, який приймає участь в альтернативному шляху активації комплексу, знешкоджує деякі бактерії і віруси, стимулює фагоцитоз.

Фагоцитоз	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: мікрофаги (нейтрофіли, еозинофіли); макрофаги рухливі (моноцити, гістіоцити тощо) і нерухливі (клітини селезінки, лімфатичної тканини, ендотеліоцити печінки, ендотелій кровоносних судин та ін.).
Незавершений фагоцитоз	Фагоцитоз, при якому мікроорганізми поглинаються фагоцитами, але не гинуть і не перетравлюються, а іноді й розмножуються, викликаючи загибель фагоцитів.
Запальна реакція	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	Група індукцибельних низькомолекулярних білків, які здійснюють контрольню-регуляторні функції, направлені на збереження клітинного гомеостазу. Найважливішими з цих функцій є антивірусна, протипухлинна, імуномодельюча, антибактеріальна та радіопротективна. Інтерферон поділяється на три типи: α - (лейкоцитарний), β - (фібробластичний) і γ -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)	Велика група білків, які посилено продукуються в організмі під час виникнення запальних реакцій після інфікування чи ушкодження, вагітності і мають антимікробну дію, сприяють фагоцитозу, активації комплементу, формуванню та ліквідації запального вогнища. Основну масу БГФ складає С-реактивний білок, сироваткові амیلіди А і Р, фактори згортання крові, металозв'язуючі білки, інгібітори протеаз і компоненти комплементу.
Бета-лізини	Термостабільні (руйнуються при температурі 65-70°C) бактерицидні фактори, які виявляють найбільшу активність по відношенню до анаеробів і спороутворюючих аеробів.
Інгібітори вірусної активності	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 віруса з рецепторами клітин хазяїна.
Цитокіни	Цитокіни – це гормоноподібні медіатори міжклітинних взаємодій, які продукуються різними клітинами організму і здатні впливати на функції інших або цих же груп клітин. Регуляторами продукції цитокінів можуть бути інші цитокіни, гормони, простагландини, антигени і багато інших агентів, діючих на клітину.

Теоретичні питання до заняття:

- Види імунітету, які обумовлюють захист організму від живих тіл та речовин, що несуть на собі ознаки генетичної чужорідної інформації.
- Фактори неспецифічного захисту організму та їх особливості у дорослих та дітей.
- Пріоритет вітчизняних вчених у відкритті факторів неспецифічного захисту організму.
- Фагоцитоз. Клітини, що здатні до фагоцитозу. Стадії цього явища.
- Комплемент, його компоненти. Активація комплекменту. Способи його визначення.
- Пропердинова система. Її природа, властивості та значення.
- Лізоцим, його природа. Дія лізоциму на мікроорганізми та способи його визначення.
- Чому нормальна мікрофлора віднесена до неспецифічних факторів захисту?
- Типи інтерферонів. Їх роль в протівірусному, протипухлинному імунітеті, регуляції імунних функцій організму.
- Практичне значення визначення титру комплекменту, лізоциму, фагоцитозу та інших показників неспецифічного захисту організму.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Оволодіти методикою визначення лізоциму в слині людини титраційним методом.
- Здійснити облік реакції титрування комплекменту в сироватці крові за 100% гемолізом, розглянути постановку і особливості цієї реакції.
- Ознайомитись з явищем незавершеного фагоцитозу в демонстраційних препаратах.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти повинні оволодіти методикою визначення титру лізоциму в слині людини; розглянути постановку і особливості реакції титрування комплекменту за 100% гемолізом, здійснити облік цієї реакції, яка дана в демонстрації; вивчити явище незавершеного фагоцитозу на демонстраційних препаратах. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу

Схема титрування лізоциму в слині

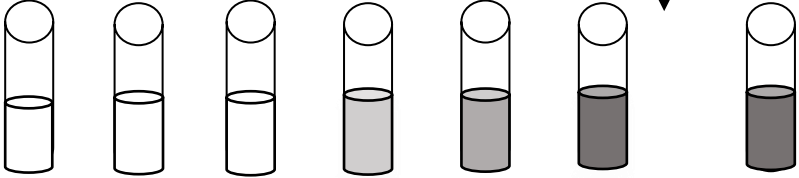
№ пробірки інгредієнти, мл	Дослідна						Контрольна
	1	2	3	4	5	6	7
0,5% розчин NaCl	1,8	1	1	1	1	1	1
Досліджувана слина	0,2	→	→	→	→	→	
Одержане розведення	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	
2-х мільярдна завись <i>M. lysodeikticus</i>	1	1	1	1	1	1	1
Кінцеве розведення	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1
							
<p>В термостат на 1 годину при температурі 37°C (попередній облік). Кінцевий облік через 24 години утримання в термостаті при температурі 37°C. Титр лізоциму – це те найбільше розведення сироватки, яке ще здатне давати повний лізис бактерій (<i>M. lysodeikticus</i>)</p>							

Схема титрування комплементу в сироватці крові людини за 100% гемолізом.

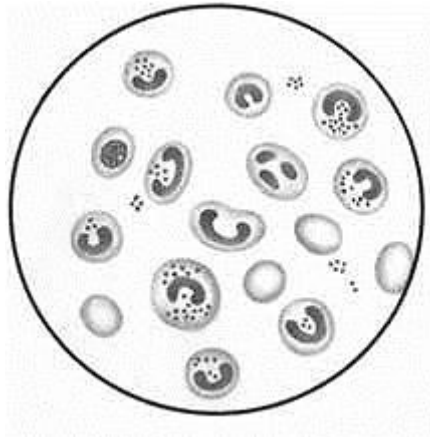
№ пробірки Інгредієнти (мл)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Досліджувана сироватка в розведення 1:10	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,2
Фізіологічний розчин	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,3
Гемолітична система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
В термостат на 40-50 хвилин при температурі 37°C											
Результат*	-Г	-Г	-Г	+Г	+Г	+Г	+Г	+Г	+Г	+Г	+Г

*-Г – нема гемолізу; +Г – є гемоліз.

Гемолітична система – це суміш рівних об’ємів розведеної по трикратному титру гемолітичної сироватки та 3-5% зависі баранячих еритроцитів. Суміш витримують при 37°C в термостаті 30 хвилин для сенсibilізації еритроцитів.

Титр комплекменту – це найменша кількість досліджуваної сироватки, яка сприяє повному гемолізу доданої кількості сенсibilізованих еритроцитів.

Рис.1. Вивчити явище незавершеного фагоцитозу на демонстраційних препаратах.



Питання для самоконтролю.

- Що вивчає імунологія?
- Які є фактори неспецифічного захисту організму? Переваги і недоліки механізмів неспецифічної резистентності.
- Який пріоритет вітчизняних вчених у відкритті факторів неспецифічного захисту організму?
- Фагоцитоз. Клітини, що здатні до фагоцитозу. Види фагоцитозу. Як відбувається фагоцитоз?
- Комплекмент, його компоненти. У чому схожість і різниця двох шляхів активації комплекменту? Які способи його визначення?
- Пропердинова система. Яка природа, властивості та значення?
- Що таке лізоцим; його природа? Як діє лізоцим на мікроорганізми? Які способи його визначення?
- Дайте визначення поняття “цитокині”. Їх імуномодельюча і захисна дія.
- Що являють собою інтерферони? Назвіть основні різновиди, яка їх роль в противірусному, протипухлинному захисті та імуномодельючій функції організму?
- Практичне значення визначення комплекменту, лізоциму, фагоцитозу та інших показників неспецифічного захисту організму.

Практичне заняття №11

Тема: «Серологічні реакції (1 заняття)»

Актуальність теми:

Методика лікування інфекційного захворювання визначається біологічними особливостями збудника. Тобто, лікар має не тільки поставити клінічний діагноз, але і визначити, який мікроорганізм викликав інфекцію. Етіологічна діагностика багатьох інфекційних захворювань заснована на виділенні чистої культури збудника та визначенні її таксономічної належності (ідентифікації). Одним із методів ідентифікації бактерій та вірусів є серологічна ідентифікація, що базується на визначенні специфічних антигенів збудника шляхом проведення серологічних реакцій.

Крім того, діагностика інфекційних захворювань може ґрунтуватись на виявленні специфічних мікробних антигенів безпосередньо в матеріалі від хворого (крові, лікворі, сечі тощо), особливо у випадку неможливості культивування збудників і ідентифікації їх іншими методами.

З іншого боку, імунна відповідь організму проявляється, зокрема, формуванням специфічних антитіл до кожного окремого виду збудника. Це дозволяє поставити етіологічний діагноз шляхом виявлення відповідних антитіл. Для цього здійснюється постановка серологічної реакції з метою серологічної діагностики.

Конкретні цілі:

- Ознайомитись із сферою застосування серологічних реакцій (СР).
- Вивчити препарати, призначені для серологічної ідентифікації мікроорганізмів.
- Ознайомитись із особливостями реакцій аглютинації та преципітації.
- Оволодіти методикою постановки реакції аглютинації на склі та розгорнутої реакції аглютинації (РА).
- Засвоїти методику постановки реакції преципітації (РП).

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №10.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент на занятті:

Термін	Визначення
Серологічна реакція	Реакція специфічної взаємодії антигенів (АТ) та антитіл (АТ).
Реакція аглютинації	Процес склеювання корпускулярних АГ (бактерії, еритроцити) під дією специфічних АТ у присутності електроліту. Реакція аглютинації – це спосіб виявлення та кількісного визначення АГ або АТ, заснований на їх здатності до формування видимих конгломератів (аглютинату).

Реакція преципітації	Осадження дрібно-дисперсного або розчинного АГ під дією специфічних АТ.
Імунна діагностична сироватка (ІДС)	Стандартний препарат, що містить АТ до певної групи мікробів і використовується для постановки серологічної реакції.
Серологічна ідентифікація	Визначення (ідентифікація) антигенної специфічності збудника (його АГ) за допомогою ІДС (відомих АТ) з використанням серологічних реакцій.

Теоретичні питання до заняття:

- Філогенетичні особливості формування імунної системи тварин.
- Центральні та периферичні органи імунної системи, їх функції.
- Імунокомпетентні клітини, їх функції.
- Дати визначення поняттям: антигени, антигенність.
- Антигенна будова бактеріальної клітини на прикладі *E.coli*.
- Будова та функції імуноглобулінів.
- Особливості взаємодії антигенів та антитіл.
- Серологічні реакції, прості та складні серологічні реакції.
- Застосування серологічних реакцій.
- Компоненти серологічної реакції, поставленої з метою серологічної ідентифікації.
- Реакція аглютинації – визначення
- Реакція преципітації - визначення
- Імунні діагностичні сироватки, спосіб отримання, використання.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Здійснити постановку реакції аглютинації на склі із адсорбованими сироватками, провести її облік.
- Здійснити постановку реакції преципітації в рідкій фазі, провести її облік.
- Здійснити постановку розгорнутої реакції аглютинації з метою серологічної ідентифікації культури бактерій.
- Вивчити зразки імунних діагностичних сироваток.

Зміст теми

На практичному занятті студенти мають ознайомитись із поняттям серологічних реакцій, визначити мету постановки та компоненти серологічних реакцій, ознайомитись із особливостями реакцій аглютинації та преципітації. Студенти проводять постановку реакцій аглютинації на склі із адсорбованими сироватками та преципітації в рідкій фазі, здійснюють облік. Розбирають особливості обліку розгорнутої реакції аглютинації, проводять постановку розгорнутої реакції аглютинації з метою серологічної ідентифікації. Виконані завдання студенти заносять в протокол та підписують його у викладача.

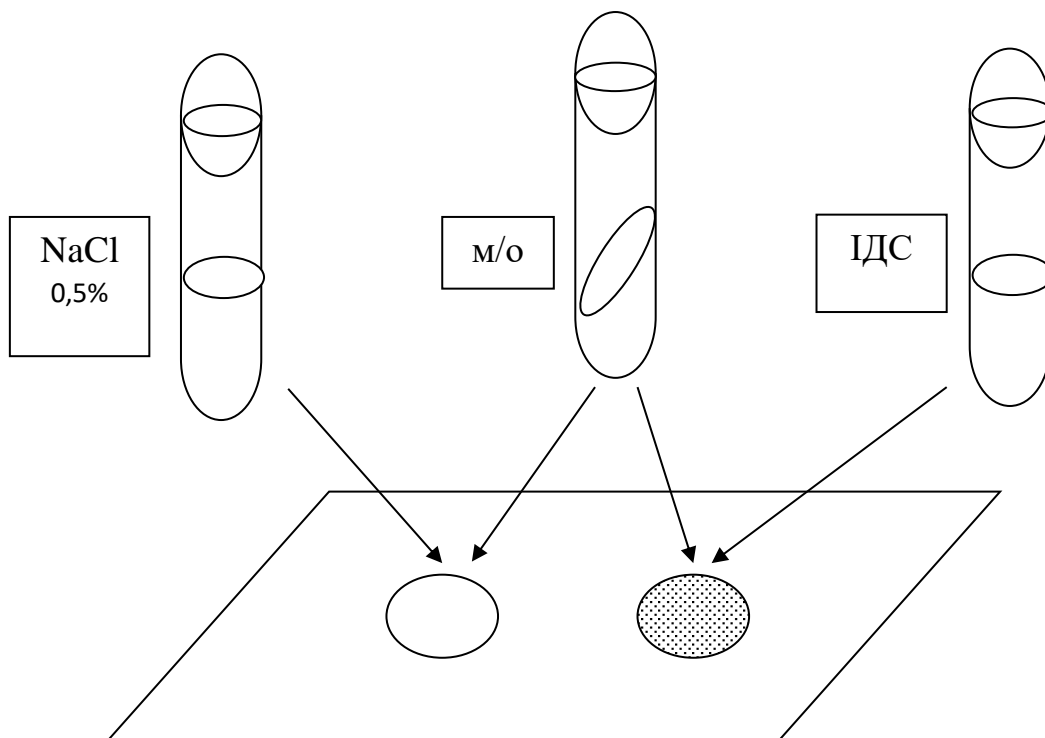
Рекомендації для оформлення протоколу.

Реакція аглютинації на склі з метою серологічної ідентифікації культури бактерій

Матеріали:

- Культура бактерій
- Адсорбована імунна діагностична сироватка (ІДС) для реакції аглютинації на склі
- 0,5% розчин NaCl
- Предметне скло, бактеріологічна петля.

Хід роботи:



Облік результатів:

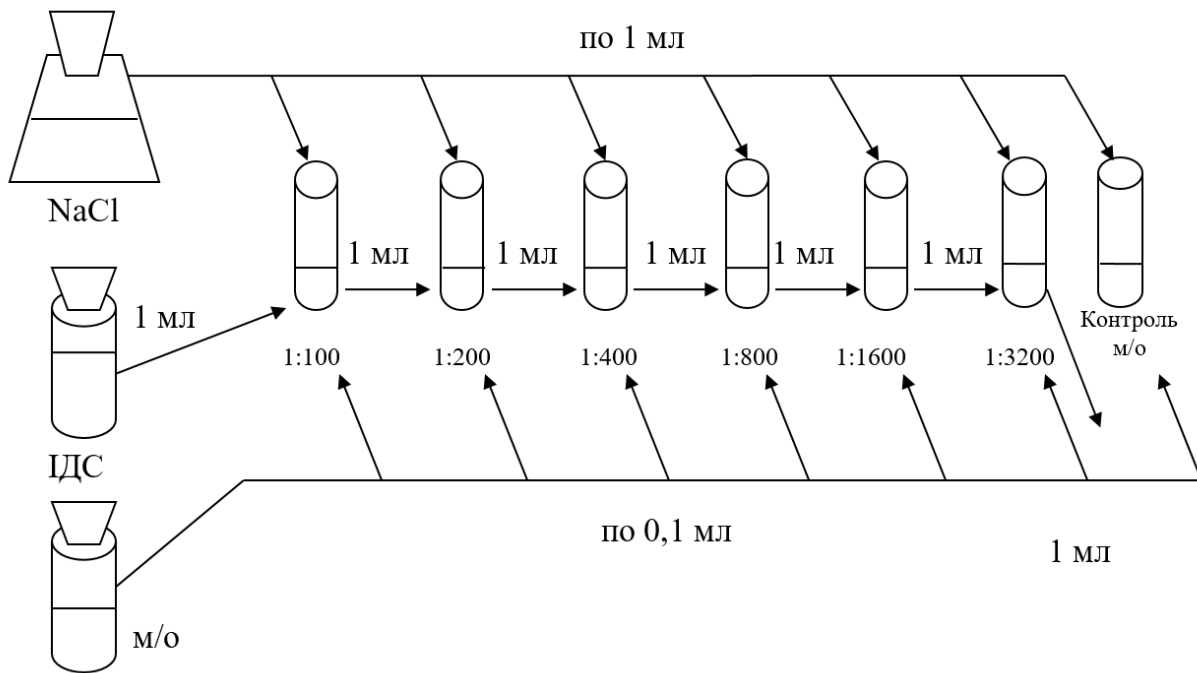
Позитивна реакція – утворення аглютинату.

Розгорнута реакція аглютинації з метою серологічної ідентифікації культури бактерій.

Матеріали:

- Культура бактерій (суспензія)
- Імунна діагностична сироватка в робочому розведенні (1:50), титр - 1:3200
- 0,5% розчин NaCl
- Пробірки, піпетки

Хід роботи:



Облік результатів:

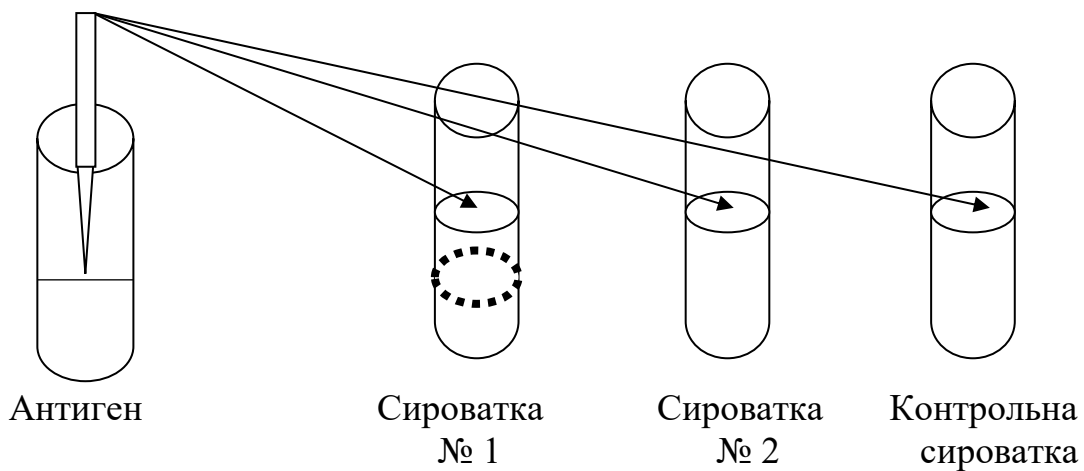
Позитивний результат – утворення аглютинату;
Попередній облік проводиться через 2 години;
остаточний – через 18-24 години.

Реакція преципітації в рідкій фазі.

Матеріали:

- антиген (преципітиноген);
- сироватка (преципітин) - №1, №2, №3 (контрольна);
- піпетки;

Хід роботи:



Облік результатів:

Позитивна реакція – утворення кільця преципітації (помутніння).

Питання для самоконтролю.

- Які органи імунної системи відносяться до центральних та периферичних, їх функції?
- Які клітини відносяться до імунокомпетентних, їх функції?
- Які клітини приймають участь у синтезі антитіл, характер їх кооперації?
- Дати визначення поняттям: антигени, антигенність.
- Які антигени має бактерія (на прикладі E.coli)?
- Будова та функції імуноглобулінів.
- Що таке серологічні реакції, відмінності простих та складних серологічних реакцій.
- З якою метою може бути поставлена серологічна реакція?
- Реакція аглютинації – визначення.
- Реакція преципітації – визначення.
- Які складові простих серологічних реакцій?
- Які етапи включає в себе отримання імунних діагностичних сироваток?

Практичне заняття №12

Тема: «Серологічні реакції (2 заняття)»

Актуальність теми:

У захисті організму від чужорідних агентів вирішальну роль відіграють імунологічні механізми, які здійснюються антитілами (імуноглобулінами) та імунокомпетентними клітинами (лімфоцитами). В основі імунологічних механізмів є специфічна взаємодія антигену, що потрапив в організм, та антитіла, що утворилось у відповідь на потраплення антигену. На використанні принципу взаємодії антигену та антитіла базуються всі імунологічні діагностичні реакції, які названі серологічними, оскільки антитіла знаходяться в сироватці крові. Застосування серологічних реакцій з метою серодіагностики інфекційного захворювання та з метою сероідентифікації збудників, що виділені від хворого, є необхідним для встановлення заключного діагнозу інфекційного захворювання.

На занятті студентам надається можливість оволодіти методикою постановки основних серологічних реакцій: двохкомпонентних та багатокомпонентних (реакція аглютинації, реакція пасивної гемаглютинації, реакція гемолізу, реакція зв'язування комплементу). Вміння обирати потрібні для діагностики інфекційного захворювання серологічні реакції, ставити їх та інтерпретувати отримані результати є важливим для формування у студентів клінічного мислення і розуміння суті патологічного процесу при інфекційних хворобах.

Конкретні цілі:

- Аналізувати механізм взаємодії антитіл з антигенами
- Знати закономірності серологічних реакцій
- Інтерпретувати участь клітин імунної системи в імунній відповіді і фази імунної відповіді
- Вміти проводити облік результатів розгорнутої реакції аглютинації, поставленої з метою серологічної ідентифікації
- Оволодіти методикою постановки реакції аглютинації, поставленої з метою серологічної діагностики (реакція Відаля)
- Оволодіти методикою постановки реакції імунного гемолізу
- Засвоїти методику постановки реакції непрямой гемаглютинації
- Засвоїти принципи, методику та здійснити облік реакції зв'язування комплементу (РЗК) з метою виявлення антитіл в досліджуваній сироватці.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №10.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Діагностикуми	Стандартні антигени, в ролі яких можуть бути суспензії інактивованих, рідше живих, бактерій, вірусів або їх

	антигенів у ізотонічному розчині. Діагностикуми застосовуються при серологічній діагностиці інфекційних захворювань.
Реакції лізису	Реакція розчинення антигену під дією антитіла у присутності комплементу. Свіже виділена з організму людини імунна сироватка здатна до лізису, бо містить антитіла та комплемент. Якщо ж сироватка прогрівалась чи довго зберігалась, то лізис відбувається лише за умови додавання комплементу.
Реакція імунного гемолізу	Реакція, що базується на тому, що при імунізації тварин (частіше кролів еритроцитами барана) в сироватці крові з'являються специфічні захисні антитіла – гемолізینی, які здатні в присутності комплементу порушувати зв'язок гемоглобіну зі строю еритроцитів та викликати гемоліз (вихід гемоглобіну назовні еритроцита). Імунна сироватка, яка містить гемолізینی, має назву гемолітичної сироватки.
Сила гемолітичної сироватки	Максимальне її розведення в об'ємі 0,5 мл, при якому спостерігається повний гемоліз 0,5 мл 3% зависі баранячих еритроцитів у присутності 0,5 мл комплементу, розведеного 1:10 та витримуванні пробірок впродовж години при 37 ⁰ С.
Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА)	Реакція полягає в тому, що еритроцити барана чи іншого виду тварин, маючи здатність адсорбувати на собі антигени, стають “чутливими” (сенсibilізованими) до відповідної імунної сироватки. Під впливом специфічних антитіл сенсibilізовані еритроцити склеюються та випадають в осад, утворюючи на дні пробірки (або лунки) гемаглютинат. Відрізняючись високою специфічністю та чутливістю, РНГА дозволяє виявляти мінімальну кількість антитіл.
Система комплементу	Група сироваткових білків, які в процесі їх активації перетворюються в ефекторні молекули, що призводять до розвитку запалення (С3а, С5а, С4а), фагоцитозу (С3b) та руйнуванню клітин (С6-9). Таким чином, білки комплементу приймають участь у розвитку запальних реакцій, реакцій опсонізації та лізису клітинних мембран.
Реакція зв'язування комплементу	Багатокомпонентна серологічна реакція, що полягає у взаємодії антигену з відповідним специфічним антитілом з утворенням специфічного комплексу антиген-антитіло та зв'язуванням комплементу. Утворений комплекс не викликає ніяких зовнішніх змін того середовища, в якому він утворився. Щоб встановити, чи відбулось зв'язування комплементу чи він лишився вільним (незв'язаним), в реакцію вводять другу систему (гемолітичну), яка в свою

	чергу складається з антигену (3% завис еритроцитів) та специфічної гемолітичної сироватки (взятої в потроєному титрі). За відсутності вільного активного комплекменту гемолізу еритроцитів під дією специфічних гемолізінів не відбувається (реакція позитивна). У випадку невідповідності антитіла та антигену в першій системі, комплекмент лишається вільним та в його присутності настає гемоліз другої системи (реакція негативна).
--	--

Теоретичні питання до заняття:

- Діагностикуми, їх характеристика, принципи отримання і практичне використання.
- Трьохкомпонентні та багатокомпонентні серологічні реакції (імунного лізису, реакція зв'язування комплекменту, опсонофагоцитарна, непрямой аглютинації), їх суть, практичне використання.
- Система комплекменту, шляхи її активації, біологічне значення.
- Реакція імунного гемолізу, механізм, практичне використання.
- Оцінка результатів серологічних реакцій і висновки.
- Реакції бактеріолізу, цитолізу, їх механізм та практичне використання.
- Багатокомпонентні серологічні реакції, їх характеристика, складові компоненти.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Провести облік розгорнутої реакції аглютинації, поставленої з метою серологічної ідентифікації культури бактерій.
- Поставити реакцію Відаля для серологічної діагностики черевного тифу.
- Здійснити облік результатів РНГА, поставленої з метою серодіагностики черевного тифу, зробити висновок
- Провести облік результатів реакції імунного гемолізу, зробити висновок.
- Вивчити зразки діагностикумів.

Провести облік результатів реакції зв'язування комплекменту, що поставлена з метою визначення антитіл в сироватці крові хворого (демонстраційна робота).

Зміст теми:

На практичному занятті студенти знайомляться зі складними серологічними реакціями, розглядають особливості постановки та компоненти реакції аглютинації і методику постановки реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) з метою серологічної діагностики інфекційних захворювань. Студенти проводять облік реакції аглютинації, поставленої з метою ідентифікації культури бактерій; ставлять реакцію Відаля для діагностики черевного тифу; здійснюють облік РНГА, поставленої з метою серодіагностики черевного тифу; ставлять реакцію імунного гемолізу; вивчають зразки діагностикумів. Проводять облік результатів реакції зв'язування комплекменту. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу.

Облік поставленої на попередньому занятті реакції аглютинації з метою серологічної ідентифікації культури бактерій.

Студенти проводять остаточний облік поставленої на попередньому занятті реакції аглютинації з метою ідентифікації культури бактерій. Ступінь позитивної реакції аглютинації позначається плюсами:

- ++++ - повна аглютинація, рідина прозора, а на дні значна кількість білого осаду;
- +++ - рідина не зовсім прозора, осад менший;
- ++ - рідина непрозора, осад ще менший;
- + - рідина мутна, дуже незначний осад;
- - рідина рівномірно мутна, як в контролі антигену; осад відсутній. Результат в цьому випадку вважають негативним.

Відповідність між видом мікроба і діагностичною аглютинуючою сироваткою вважається достовірною при умові чітко вираженої реакції аглютинації в пробірках з розведенням сироватки в межах титру, але не менше 2/3 її титру при відсутності осаду в контролях сироватки і культури.

Постановка реакції аглютинації з метою виявлення антитіл в сироватці хворого з підозрою на черевний тиф та паратифи А та В.

СХЕМА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦІЇ АГЛЮТИНАЦІЇ З МЕТОЮ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ХВОРОГО

№ пробірки Інгредієнти (в мл)	Дослідні					Контрольні	
	1	2	3	4	5	6	7
Фізіологічний розчин	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	---
Сироватка крові хворого в розведенні 1:25 (0,1 мл с-ки + 2,4 мл фіз.розчину)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	В дез. р-н. ---	1,0
Діагностикум	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	---
Отримані розведення сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	КД	КС

Штатив з пробірками поміщають в термостат при 37⁰С. Попередній облік реакції проводять через 2 години, а остаточний – через 18-20 годин.

Для проведення реакції беруть у хворого кров, одержують з неї сироватку і розводять ізотонічним розчином натрію хлориду від 1:50 до 1:800 за схемою. Як антиген в цій реакції використовують діагностикуми – суспензії із відомих убитих мікроорганізмів – черевного тифу та паратифів А та В

Принцип постановки та облік результатів реакції непрямой гемаглютинації (РНГА), поставленої з метою серологічної діагностики.

Суть реакції непрямой гемаглютинації полягає в тому, що еритроцити, на поверхні яких адсорбовані будь-які розчинні антигени, набувають здатності аглютинуватись при взаємодії з антитілами, специфічними до адсорбованого антигену. Еритроцити, що сенсibilізовані антигенами, називаються еритроцитарними діагностикумами. Найчастіше використовують еритроцити барана, яким властива висока адсорбуюча активність. Реакцію ставлять за такою схемою: в пробірках або лунках прогріту впродовж 30 хв. при 58⁰ С досліджувану сироватку розводять послідовно від 1:10 до 1:320 в об'ємі 0,25 мл та додають по 2 краплі еритроцитарного діагностикуму. Реакцію супроводжують контролями: на спонтанну аглютинацію сенсibilізованих еритроцитів, контроль з нормальними еритроцитами, а також контролі діагностикумів з завідомо позитивною та негативною сироватками. Після легкого струшування пробірки або лунки витримують в термостаті 30-45 хв. при 37⁰ С. Облік результатів реакції здійснюють після того, коли випадуть в осад еритроцити у відповідних контрольних пробірках. Достовірними результатами слід вважати відсутність гемаглютинації в контролях з нормальними, сенсibilізованими еритроцитами, з завідомо негативною сироваткою і наявність гемаглютинації і з завідомо позитивною сироваткою. Гемаглютинація в дослідних пробірках при відповідних контролях свідчить про наявність специфічних антитіл в досліджуваній сироватці. Результати оцінюють за зовнішнім виглядом осаду еритроцитів в лунках. В позитивному випадку (+) еритроцити рівномірно у вигляді "парасольки" покривають майже все дно пробірки або лунки. При негативному результаті (-) еритроцити осідають у формі компактного комочка – "гудзика".

Постановка реакції імунного гемолізу.

Імунний лізис – це розчинення клітин (антигенів) під дією специфічних антитіл (лізінів) в присутності комплементу. В залежності від антигенів, що беруть участь в реакції лізису, вона одержала назву бактеріолізу, спірохетолізу, гемолізу тощо. Найчастіше використовується в лабораторній практиці реакція гемолізу як індикаторна система в реакції зв'язування комплементу.

Для постановки реакції потрібні:

- 1) антиген – 3% суспензія еритроцитів;
- 2) антитіло – гемолітична сироватка проти еритроцитів барана;
- 3) комплемент – сироватка морської свинки, розведена 1:10;
- 4) ізотонічний розчин хлориду натрію.

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ОСНОВНОГО ДОСЛІДУ РЕАКЦІЇ ГЕМОЛІЗУ

№ пробірок	Контролі			
	Дослід	1	2	3
Інгредієнти (в мл)	1	2	3	4
Антитіло – гемолітична сироватка	0,5	---	0,5	---

Антиген – 3% завись еритроцитів барана	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент (1:10)	0,5	0,5	---	---
Фізіологічний розчин	---	0,5	0,5	1,0

Всі пробірки ставлять в термостат на 30-45 хвилин при 37⁰ С, після чого проводять облік реакції. В даному випадку в дослідній пробірці повинен наступити гемоліз в результаті специфічної реакції між гемолітичною сироваткою і еритроцитами в присутності комплементу. В контрольних пробірках не повинно бути гемолізу, тому що в одній із них відсутній комплемент (контроль гемолітичної сироватки), в другій відсутня гемолітична сироватка (контроль комплементу), а в третій відсутні комплемент та гемолітична сироватка (контроль еритроцитів).

Постановка реакції зв'язування комплементу (РЗК) з метою виявлення антитіл в досліджуваній сироватці.

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ОСНОВНОГО ДОСЛІДУ РЕКЦІЇ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ (РЗК) З МЕТОЮ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ В ДОСЛІДЖУВАНІЙ СИРОВАТЦІ

№ пробірок Інгредієнти (в мл)	Дослідна		Контрольні			
	1	2	3	4	5	6
Досліджувана сироватка (1:10)	0,5	---	0,5	0,5	---	---
Антиген в робочій дозі	0,5	0,5	---	0,5	0,5	0,5
Комплемент в робочій дозі	0,5	0,5	0,5	---	0,5	0,5
Сироватка завідомо позитивна (1:10)	---	---	---	---	0,5	---
Сироватка завідомо негативна (1:10)	---	---	---	---	---	0,5
Ізотонічний розчин NaCl	---	0,5	0,5	0,5	---	---
В термостат на 2 години при 37 ⁰						
Гемолітична система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
В термостат на 1 годину при 37 ⁰						

Реакція зв'язування комплементу заснована на здатності специфічного комплексу антиген+антитіло адсорбувати (зв'язувати) комплемент. Оскільки процес зв'язування комплементу не проявляється візуально, то як індикатор використовується гемолітична система (еритроцити барана + гемолітична сироватка), яка свідчить про наслідки реакції між антигеном і антитілом. Якщо антиген і антитіло відповідають один одному, то комплемент зв'язується цим комплексом і гемоліз не проходить, а якщо комплекс не утворюється, то настає гемоліз. РЗК відноситься до складних серологічних реакцій і для її здійснення необхідно не менше 5 інгредієнтів: антиген, антитіло і комплемент (перша система), еритроцити барана і відповідна їм гемолітична сироватка.

Питання для самоконтролю

- Що означають поняття “серологічна ідентифікація збудника захворювання” та “серологічна діагностика інфекційного захворювання”?
- Як класифікують серологічні реакції?
- Що являють собою і як отримують стандартні діагностикуми?
- Які серологічні реакції є багатокomпонентними?
- Що таке система комплементу? Які шляхи її активації?
- Що таке реакції лізису?
- Що таке реакція імунного гемолізу? Яка мета її застосування?
- Що таке реакція непрямой гемаглютинації? Яка мета її застосування?
- На якому принципі заснована реакція зв'язування комплементу; в чому її переваги перед іншими серологічними реакціями?

Практичне заняття №13

Тема: «Серологічні реакції з мітками»

Актуальність теми:

У сучасній лабораторній діагностиці інфекційних захворювань одним із найпоширеніших методів є серологічні реакції з міченими антитілами чи антигенами. Застосування діагностичних препаратів, мічених флуоресцентними барвниками, ферментами, радіоактивними мітками дозволяє значно підвищити чутливість реакцій і ідентифікувати біологічні компоненти в низьких концентраціях. За рахунок високої чутливості та специфічності реакцій вони широке застосовуються в експрес-діагностиці. На даному занятті студенти ознайомлюються з видами реакцій з мітками, методикою, перевагами та спектром їх застосування у лабораторній практиці.

Конкретні цілі:

- Ознайомитися з принципами гібридомної технології отримання моноклональних антитіл.
- Провести ідентифікацію мікробної культури в препараті за допомогою імунофлуоресцентного методу (демонстрація)
- Вивчити методику постановки імуноферментного аналізу (ІФА) та радіоімуного аналізу (РІА), ознайомитись із видами та принципом імуноблотингу.
- Провести облік ІФА, поставленого з метою серодіагностики.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №10.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Серологічні реакції з мітками	Серологічні реакції, що базуються на виявленні імуного комплексу антиген-антитіло за міткою одного з компонентів реакцій, що виявляється або візуально, або за допомогою спеціальних високочутливих приладів.
Мітка	Речовини, що використовують з метою мічення відомого компоненту серологічної реакції при ідентифікації утворення комплексу антиген антитіло. В залежності від типу реакції застосовуються різні варіанти міток, при постановці РІФ – флуорохроми; ІФА – ферменти; РІА – ізотопи
Моноклональні антитіла (МКАТ)	Антитіла, що отримують за допомогою гібридомних технологій. Належать до одного класу імуноглобулінів і реагують зі специфічним епітопом антигену, проти якого вони продукуванні.

Реакція імуофлюоресценції	<p>Реакція, що основана на властивості флюоресціюючих антитіл специфічно з'єднуватись з гомологічним антигеном і викликати їх світіння в фіолетовій і ультрафіолетовій частині спектру люмінесцентного мікроскопу. РІФ буває:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Пряма – заснована на використанні імуофлюоресціюючих сироваток проти кожного досліджуваного антигену. 2. Непряма РІФ – заснована на використанні двох різних сироваток, перша – немічена, друга – видова антиглобулінова.
Імуоферментний аналіз	<p>Тип серологічних реакцій, у якому в якості мітки застосовуються ферменти до субстрату. Існує прямий, непрямий та конкурентний варіанти ІФА З точки зору способу виконання всі методи ІФА можна розділити на дві групи:</p> <ul style="list-style-type: none"> • системи, що не потребують розділення компонентів (гомогенні методи) • системи, які потребують розділення (гетерогенні методи): одна фракція зв'язана на твердому носії (твердофазний імуоферментний аналіз, ТІФА (англ. <i>enzyme-linked immuno sorbent assay – ELISA</i>)).
Радіоімуний аналіз	<p>Базується на використанні радіоактивних ізотопів як мітки одного з компонентів серологічної реакції. Метод найбільш чутливий і дозволяє виявляти незначні кількості реагентів. Для проведення РІА і реєстрації результатів необхідна спеціальна радіометрична апаратура.</p>
Імуоблотинг (вестерн-блотинг)	<p>Серологічний метод, що застосовується для визначення специфічних протеїнів, попередньо фракціонованих за допомогою гелевого електрофорезу та перенесені на нітроцелюлозну або PVDF-мембрану. Трансфер протеїнів з гелю на мембрану дозволяє інкубувати їх з певним антитілом та виконати подальшу візуалізацію отриманих бендів.</p>

Теоретичні питання до заняття:

- Серологічні реакції з використанням мітки, вимоги до них.
- Моноклональні антитіла, принципи отримання, їх застосування в серологічних реакціях з мітками.
- Реакція імуофлюоресценції (РІФ), суть, варіанти постановки, практичне використання.

- Імуноферментний аналіз (ІФА)), суть, методи, особливості постановки і обліку результатів.
- Радіоімунний аналіз (РІА), суть, методи, особливості постановки і обліку результатів.
- Імуноблотинг. Постановки, модифікації, особливості обліку результатів.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Провести ідентифікацію культури грибів роду *Candida*, що забарвлені імунною сироваткою, міченою флуорохромом, в препараті за допомогою імунофлуоресцентного методу (демонстраційна робота). Зробити висновок.
- Провести облік ІФА, що була поставлена з метою виявлення *HBsAg* у сироватці крові хворих з підозрою на вірусний гепатит В (демонстраційна робота). Зробити висновки.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти знайомляться з особливостями постановки та застосування серологічних реакцій з міченими антитілами та антигенами (РІФ, ІФА, РІА); проводять ідентифікацію культури грибів роду *Candida*, що забарвлені імунною сироваткою, міченою флуорохромом, в препараті за допомогою РІФ; проводять облік ІФА, що була поставлена з метою виявлення *HBsAg* у сироватці крові хворих з підозрою на вірусний гепатит В; вивчають зразки тест-системи для постановки ІФА з метою виявлення *HBsAg*. Ознайомлюються з особливостями та перевагами імуноблотингу, вивчають методику постановки та візуалізації результатів. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу

Рис. 1. Структура реакції імунофлуоресценції

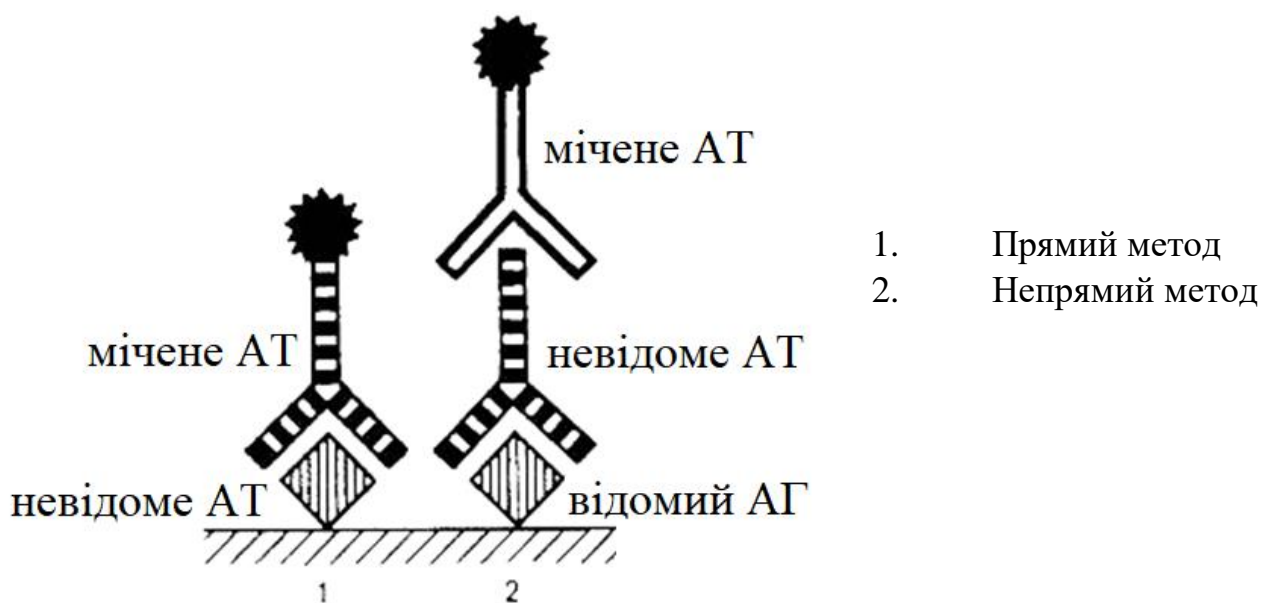
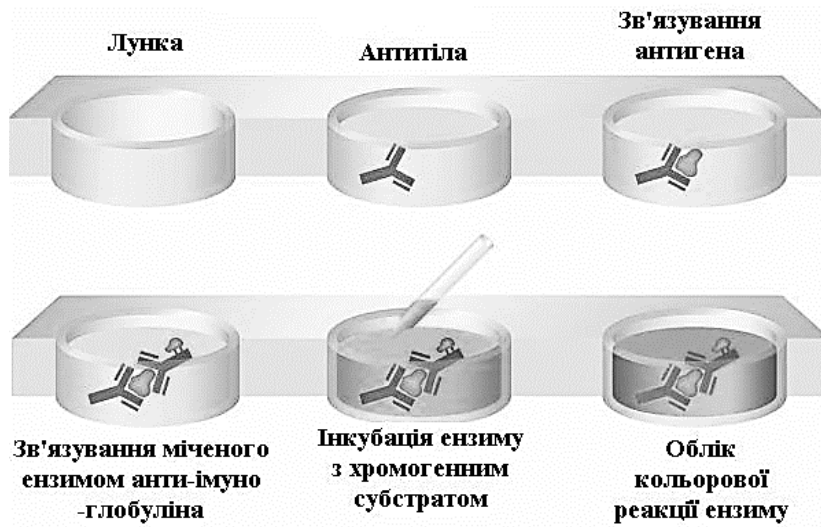


Рис. 2. Види та принцип імуноферментного аналізу

А) гомогенний ІФА

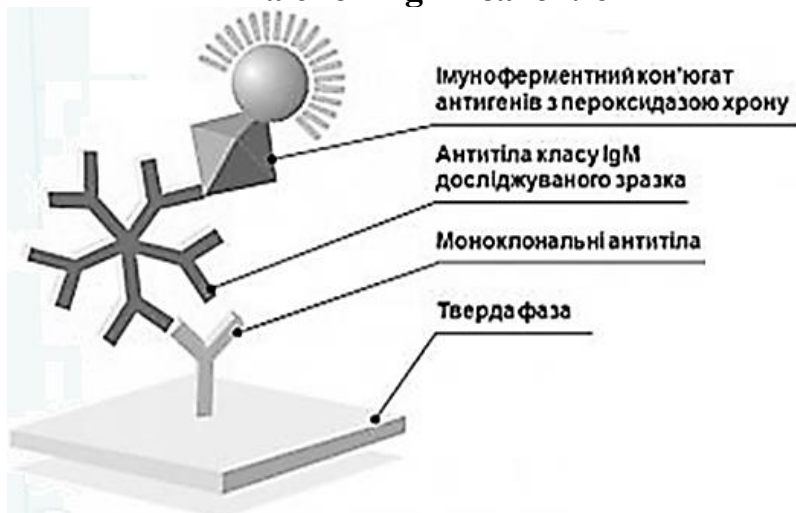


Б) гетерогенний ІФА – твердофазний ІФА (ТІФА (ELISA-test))

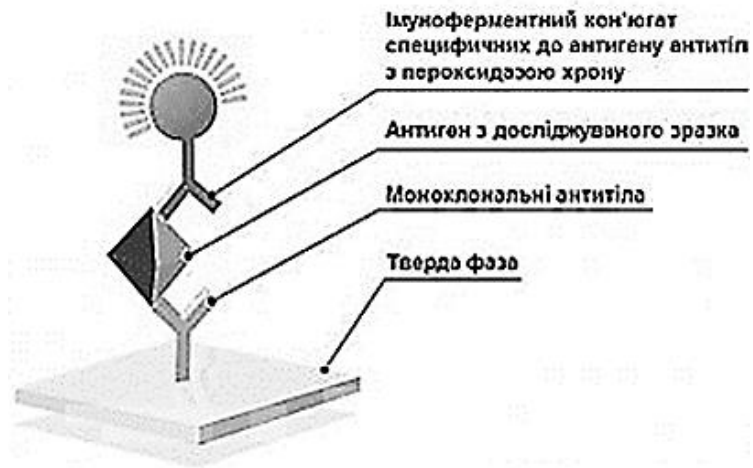
Непрямий ТІФА



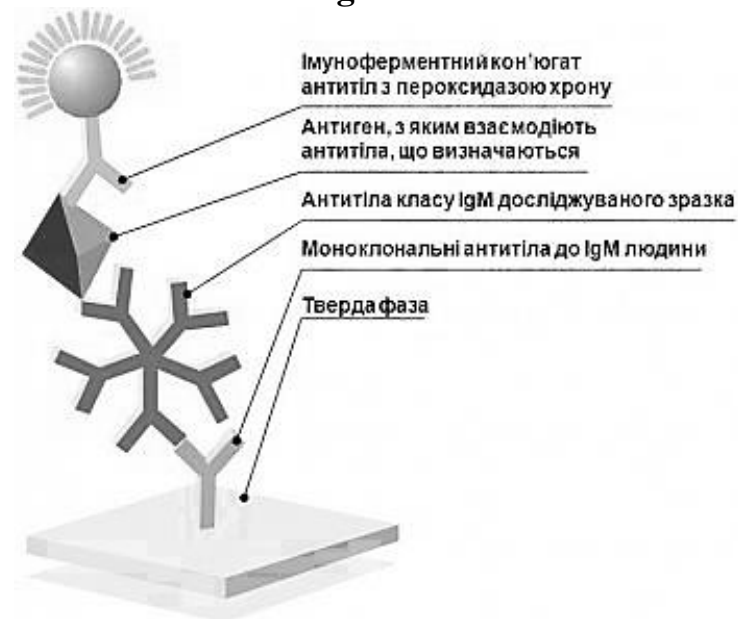
ТІФА на снові Іg М-захоплення



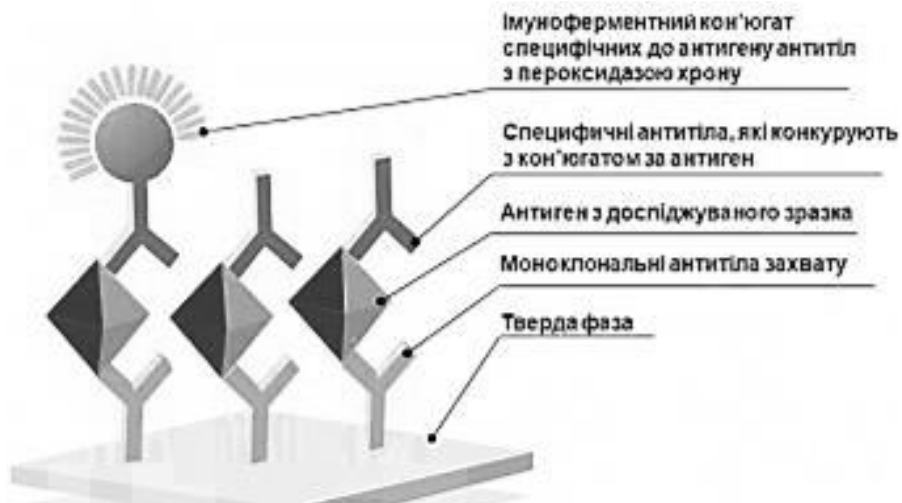
Прямий "Сендвіч"-ТІФА



Комбіноване Іg М-захоплення



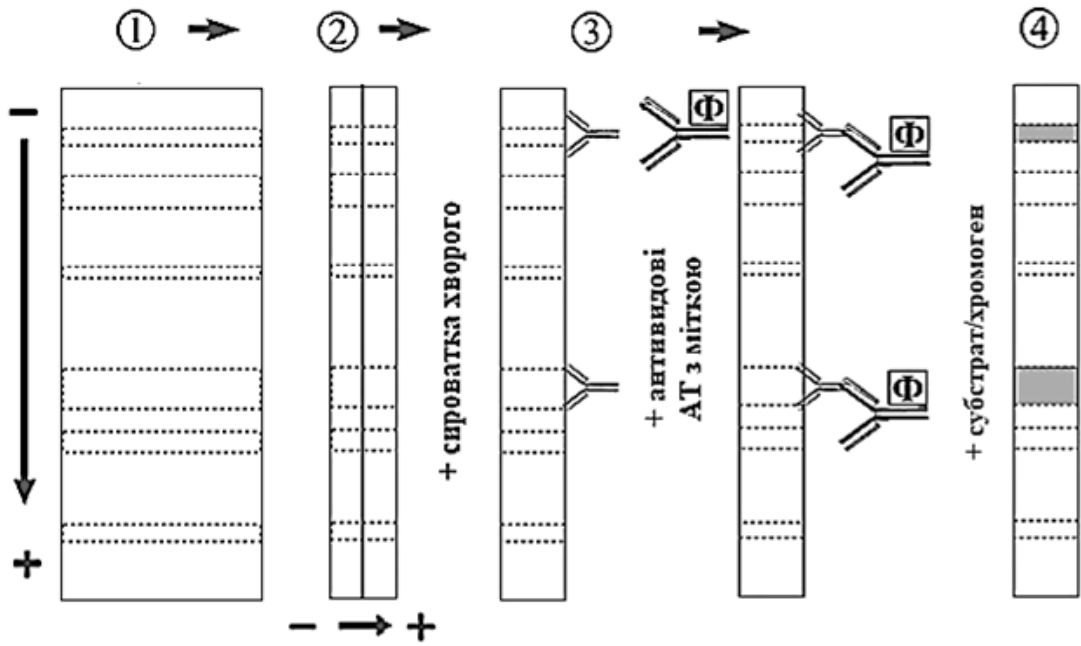
Конкурентний ІФА



Ферменти, що застосовуються в ІФА:

1. Пероксидаза хрому
2. Лужна фосфатаза
3. β -В-галактозидаза

Рис. 3. Схема проведення вестерн-блотингу.

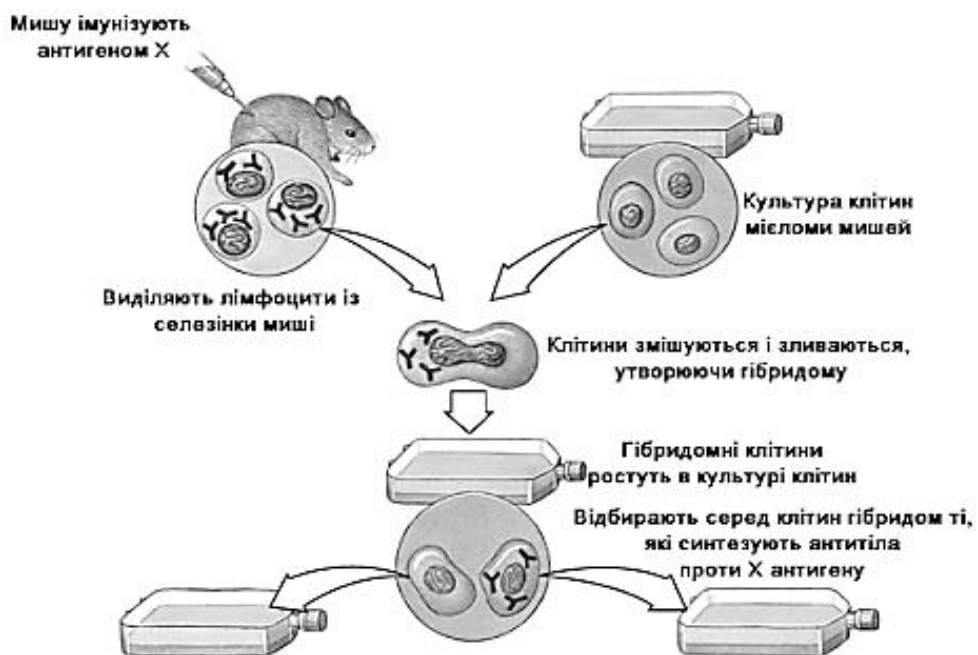


1. Розділення АГ електрофорезом.
2. Переміщення з гелю на PVDF або нітроцелюлозну мембрану.
3. Проведення ІФА чи РІА.
4. Облік результатів.

Існує декілька варіантів блотингу:

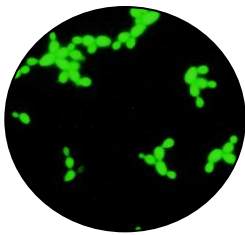
- A. *Western blot* – ідентифікація білків та антигенів.
- B. *Southern blot* – ідентифікація ДНК.
- C. *Nothern blot* – ідентифікація РНК.

Схема отримання моноклональних антитіл



Завдання 1. Провести ідентифікацію культури грибів роду *Candida*, що забарвлені імунною сироваткою, міченою флуорохромом, в препараті за допомогою реакції імуофлуоресценції (РІФ) (демонстраційна робота). Зробити висновок.

Фіксований препарат грибів *Candida* наносять 1-2 краплі флуоресціюючої сироватки і фарбують його у вологій камері 20-30 хв. при 25° С. Після інкубації препарат промивають 2-4 рази буферним ізотонічним розчином, впродовж 10-15 хв. прополіскують дистильованою водою, висушують, наносять краплю нефлуоресціюючої олії і розглядають в люмінесцентному мікроскопі за допомогою імерсійного об'єктиву. При цьому гриби роду *Candida* дають яскраве світіння на темному фоні.



Гриби роду *Candida*, забарвлені імунною сироваткою, міченою флуорохромом

Завдання 2. Провести облік результатів ІФА, що була поставлена з метою виявлення *HBsAg* у сироватці крові хворих з підозрою на вірусний гепатит В (демонстраційна робота).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Контроль реакції:

1A-B – позитивний

1C-D – негативний

1E-F – точка «cut-off»*

***Примітка:**

«cut-off» - точка, над якою результат тесту класифікується як позитивний.

Визначити результати аналізу ІФА відповідно до контрольних лунок 1A-F:

3A – пацієнт №1
 3B – пацієнт №2
 3C – пацієнт №3
 3D – пацієнт №4

3E – пацієнт №5
 3F – пацієнт №6
 3G – пацієнт №7
 3H – пацієнт №8

Висновок:

Питання для самоконтролю.

- Які серологічні реакції можна застосувати з метою експрес-діагностики інфекційних захворювань?

- Які аспекти використання моноклональних антитіл? Чому в серологічних реакціях з мітками віддається перевага саме моноклональним антитілам?
- В чому полягають принципи прямої та непрямой РІФ, ІФА, РІА, які переваги та недоліки цих методів.
- Які особливості та переваги застосування імуноблотингу? Назвіть інші види блотингів, що Вам відомо.

Практичне заняття №14

Тема: «Вакцини та імунні сироватки»

Актуальність теми:

В загальному комплексі протиепідемічних заходів велику роль надають специфічній профілактиці і терапії інфекційних захворювань. Особливе значення в цьому мають вакцини, імунні сироватки і імуноглобуліни, які в різний час врятували життя мільйонам людей. Вакцини і анатоксини сприяють формуванню активного проти інфекційного імунітету, мобілізуючи механізми імунологічної пам'яті. Введення імунних сироваток і імуноглобулінів створює негайний пасивний гуморальний імунітет, здатний захистити організм від інтоксикації або інфекції. Діагностичні імунні сироватки використовують для визначення антигенної структури збудника і його серологічної ідентифікації для встановлення етіології інфекційного захворювання. Студентам надається можливість ознайомитись з лікувально-профілактичними і діагностичними препаратами, які використовуються в медицині, засвоїти принципи їх отримання, методи стандартизації і контролю. Це зумовлює актуальність теми заняття, яка спрямована на формування позитивної мотивації її вивчення.

Конкретні цілі:

- Аналізувати принципи одержання вакцинних препаратів, дати порівняльну характеристику кожному з них, вивчити методи їх стандартизації і контролю, практичне використання.
- Ознайомитись з вакцинами. Що вживаються в медичній практиці, принципи їх класифікації.
- Оволодіти принципами виготовлення імунних сироваток, методами їх стандартизації, контролю, практичне значення.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція)

Назви попередніх дисциплін	Отримані навички
Анатомія людини	Аналізувати інформацію про будову тіла людини, системи, що його складають, органи і тканини
Гістологія, цитологія, ембріологія	Інтерпретувати мікроскопічну та субмікроскопічну структуру клітин
Медична і біологічна фізика	Тракувати загальні фізичні та біофізичні закономірності, що лежать в основі біологічних процесів.
Медична біологія	Пояснювати на молекулярно-біологічному та клітинному рівні закономірності біологічних процесів
Медична хімія	Тракувати загальні фізико-хімічні закономірності, що лежать в основі процесів розвитку клітин

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Імунопрофілактика	Профілактика інфекційних захворювань шляхом створення імунітету до них за допомогою імунологічних методів – активної і пасивної імунізації.
Імуноterapia	Лікування хворих шляхом впливу на систему імунітету.
Вакцини	Біологічні препарати, одержані з мікроорганізмів, продуктів їх життєдіяльності, синтетичної, генно-інженерної аналогії, або антиідіотипові антитіла, які використовують з метою активної імунізації людей для профілактики і терапії інфекційних захворювань.
Атенуація	Стійке незворотне послаблення вірулентності патогенних мікроорганізмів, використовується для отримання вакцинних штамів
Вакцина жива	Вміщує життєздатні штами патогенного мікроорганізму з максимально зниженою вірулентністю, але збереженими антигенними властивостями, яка створює напружений імунітет, схожий з постінфекційним.
Вакцина інактивована	Виготовлена з мікроорганізмів, що мають виражені імуногенні властивості, ін активована (вбита) дією фізичних і хімічних факторів
Вакцина хімічна	Складається з специфічних антигенів, що вилучені з мікроорганізмів і очищені від баластних речовин
Анатоксин	Якісно новий препарат, отриманий з екзотоксину шляхом дії 0,3% розчину формаліну при температурі +37°C протягом 30 днів
Вакцина генно-інженерна	Отримана на основі картування геномів мікроорганізмів: гени, що контролюють потрібні антигенні детермінанти, переносять в геном інших мікроорганізмів і клонують в них, сприяючи експресії цих генів в нових умовах
Антиідіотипові антитіла	Вакцини, отримані на основі антиідіотипових антитіл, що характеризуються близькою структурою між епітопом антигена і активним центром антиідіотипового антитіла
Імунні сироватки	Сироватка крові, отримана від людини або тварини, які були імунізовані якимсь антигеном і містить антитіла до цього антигена, використовується в якості лікувального або діагностичного засобу.
Флокуляція	Різновид реакції преципітації в рідині, при якій комплекси антиген-антитіло (найчастіше токсин-анатоксин) утворюють видимі преципітати (флокулянти), що можна характеризувати кількісно
Сила анатоксину	Найменша кількість анатоксині, яка вступає в реакцію флокуляції в ініціальній пробірці з однією антитоксичною

	одиницею антитоксичної сироватки при температурі +45°C
Ініціальна пробірка	Пробірка, що вміщує еквівалентну кількість анатоксину і антитоксину, в ній вперше з'являється опалесценція або дрібнодисперсний осад

Теоретичні питання до заняття:

- Історія розвитку імунопрофілактики та імунотерапії інфекційних захворювань.
- Принципи отримання, методи стандартизації і характеристика вакцин першого покоління – живих і ін активованих.
- Принципи одержання, методи стандартизації і характеристика вакцин другого покоління – хімічних і анатоксинів.
- Генно-інженерні вакцини, анти ідіотипові антитіла, теоретичні основи для їх створення, властивості, перспективність використання.
- Імунні сироватки і імуноглобуліни, принципи отримання, практичне значення.
- Методи контролю вакцинних препаратів і препаратів із сироваток.

Практичні роботи (завдання), які виконуються на занятті:

- Ознайомитись з вакцинами, що вживаються в медицині, визначити їх властивості, переваги і недоліки, практичне застосування.
- Вивчити принципи одержання лікувально-профілактичних і діагностичних сироваток, використання в медицині.
- Засвоїти методику визначення сили анатоксину в флокуляційних одиницях.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти вивчають принципи класифікації, методи отримання різних імунопрофілактичних, лікувальних, діагностичних препаратів, що вживаються в медицині, їх властивості, переваги і недоліки. Оволодіють методом визначення сили анатоксину за допомогою реакції флокуляції. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу.




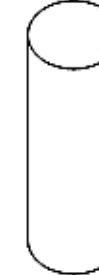

Завдання 1. Визначити силу дифтерійного анатоксину за допомогою реакції флокуляції

Реакція флокуляції базується на здатності токсина або антитоксина при змішуванні в певному співвідношенні з антитоксичною сироваткою утворювати помутніння – *ініціальна флокуляція*.

Механізм реакції флокуляції аналогічний реакції преципітації.

Застосовується для титрування антитоксичних сироваток і визначення типу токсину.

**Реакція нейтралізації токсина in vitro.
Реакція флокуляції**

Компоненти, мл	№ пробірки				
	1	2	3	4	5
Токсин, який містить 20 LF в 1мл	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Досліджувана сироватка	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Інкубація при +45°C протягом 30 хвилин					
Результати ініціальної флокуляції					

Специфічну активність або силу анатоксина визначають реакцією флокуляції в так званих **одиницях флокуляції – LF**.

Силу анитоксичної сироватки – в **міжнародних одиницях (МЕ)**.

Одна антигенна одиниця анатоксина позначається **Limes flocculationis (LF – поріг флокуляції)**, тобто кількість анатоксина, який вступає в реакцію флокуляції з однією одиницею анитоксина.

Умова ініціальної флокуляції – nLF=nME

В даному дослідженні помутніння – ініціальна флокуляція – відбувається в пробірці №3. Кожна пробірка містить $2 \times 20 = 40$ LF токсина. Оскільки умова ініціальної флокуляції $nLF=nME$, то в даній пробірці 40 МЕ сироватки.

Якщо 0,4 мл сироватки містить 40 МЕ, то 1 мл – 100 МЕ.

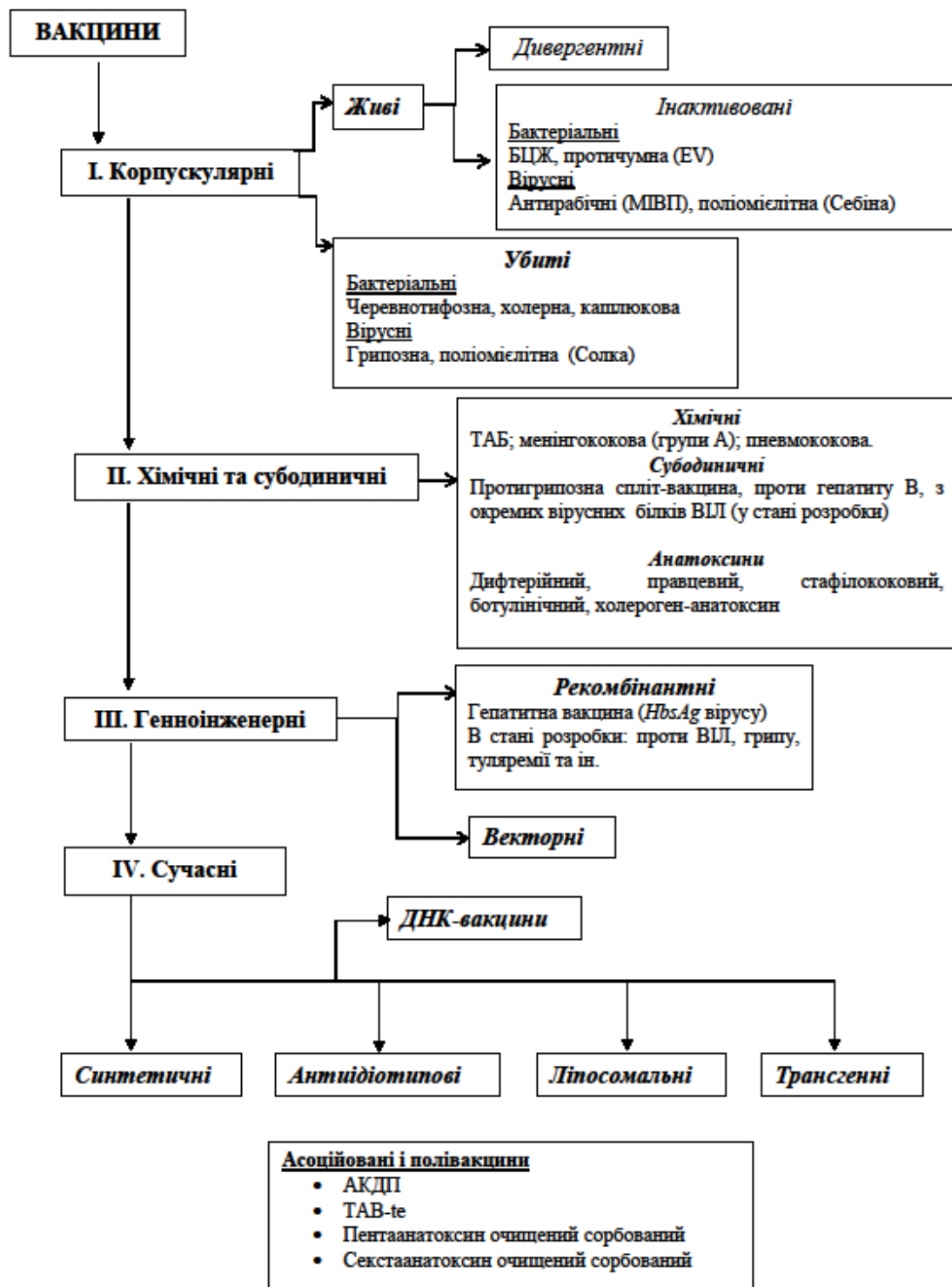
Класифікація вакцин

1-ше покоління – живі (атенуйовані та дивергентні) та інактивовані вакцини

2-ге покоління – хімічні вакцини: субодиничні, субвіріонні та анатоксини

3-тє покоління – генно-інженерні: живі (векторні) та рекомбінантні

4-те покоління – синтетичні кон'юговані: ліпосомальні, мукозальні, антидіотипові, РНК-вакцини, ДНК-вакцини, істівні вакцини



Атенуйовані вакцини створювались, як правило, емпірично, шляхом тривалого підбору середовищ, умов культивування та інших факторів (тривала дія температурних факторів, пасажі збудника в організмі лабораторних тварин, тривала селекція вірусів в культурі клітин).

Дивергентними називаються вакцини, отримані в результаті добору мікроорганізмів з близькими антигенними властивостями.

Для підвищення імуногенності хімічних (субодиничних вакцин) додають речовини, що здатні неспецифічно посилювати імунну відповідь на антиген, такі речовини називаються *ад'юванти*.

Вакцини, що містять вбиті мікроорганізми і їх окремі структурні компоненти, які отримують фізичним або хімічним шляхом відносять до групи *корпускулярних вакцинних препаратів*.

Генно-інженерні рекомбінантні вакцини створюють шляхом введення генів, які кодують основні Аг патогенних вірусів і бактерій в геном непатогенних для людини про- або еукаріот (наприклад, ген *HBsAg* вірусу гепатиту В або ген екзотоксину збудника правця).

Генно-інженерні живі (векторні) вакцини створюються на основі непатогенних вірусів, які є переносниками (векторами), що продукують антигени певних патогенних вірусів, які в свою чергу стимулюють імунну відповідь. В якості векторів найчастіше використовують альфавіруси (вірус Венесуельського енцефаліту, вірус Сіндбіс, вірус лісу Семліки); аденовіруси (аденовірус-асоційовані віруси) і поксвіруси (вірус віспи птахів).

Біосинтетичні вакцини представляють собою синтезовані з амінокислот пептидні фрагменти, які відповідають амінокислотній послідовності тим структурам вірусного (бактеріального) білка, які розпізнаються імунною системою і викликають імунну відповідь.

Антиідіотипові вакцини виробляються на основі антиідіотипових антитіл, які утворюються при імунізації тварин гетерологічними імуноглобулінами (наприклад, імуноглобулінами людини). При цьому паратоми первинних Ig (ідіотипів) є тими антигенними детермінантами, на які виробляються вторинні Ig (антиідіотипи). Таким чином, антиідіотипові антитіла є “дзеркальним відбитком” антигену і можуть використовуватися як вакцинний матеріал. Проте, хоча вже отримано експериментальні вакцини проти багатьох вірусних, бактеріальних і протозойних збудників, зацікавленість антиідіотиповими вакцинами в останній час зменшилась, тому що вони не здатні забезпечити необхідний рівень нейтралізуючих антитіл і формування напруженого імунітету.

ДНК-вакцини представляють собою очищені нуклеотидні послідовності ДНК вірусу. Принцип дії препаратів даного типу заснований на поглинанні клітинами організму генетичного матеріалу вірусу та ендогенному синтезу вірусних білків, які б представляли собою вакцину.

Їстівні вакцини розробляються на основі трансгенних рослин, в геном яких вбудовують відповідний фрагмент геному патогенного мікроорганізму.

Ліпосомальні вакцини отримують за допомогою ліпофільних носіїв, а саме антигени збудників, проти яких необхідно створити імунітет, вводяться у ліпосоми – одно- або багатокамерні жирові пухирці, що легко захоплюються макрофагами і швидко індукують імунну відповідь. Імуноліпосоми викликають проліферацію Т-лімфоцитів, вироблення ними ІЛ-2 і стимулюють синтез антитіл. Мікрокапсули виготовляють з нетоксичних неантигенних біорозчинних полімерів – лактиду чи гліколіду або їх сополімерів. Діаметр таких мікросфер звичайно не перевищує 10 мк, але кожна капсула може містити антигени декількох збудників. Для імунізації

можна використовувати суміш різних мікрокапсул. Самі мікрокапсули мають виражену ад'ювантну дію, що дозволяє знижувати дози вакцинного матеріалу.

Імунні сироватки і імуноглобуліни

ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНІ	ДІАГНОСТИЧНІ
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Антитоксичні та антибактеріальні</u> Протидифтерійна сироватка; Протиправцева сироватка і протиправцевий імуноглобулін; Протигангренозна моно- і полівалентна сироватки <p>Проти стафілококовий імуноглобулін</p> <p>Глобулін проти сибірки</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Антивірусні</u> Протикоровий імуноглобулін Антирабічний гама-глобулін Протигрипозний імуноглобулін Противісповий імуноглобулін Імуноглобулін проти вірусу кліщового енцефаліту 	<ul style="list-style-type: none"> • Для ідентифікації бактеріальних інфекцій Аглютинуючі Преципітуючі Лізуючі • Для ідентифікації вірусів Віруснейтралізуючі Комплементзв'язуючі Антигемаглютинуючі

ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ КОНТРОЛЮ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ ТА ПРЕПАРАТІВ ІЗ СИРОВАТОК

1. *На стерильність* (у випадку живих вакцин – на відсутність контамінації другими мікроорганізмами).
2. *На відсутність шкідливості*. Здійснюється цей етап контролю на чутливих тваринах за даними про смерть або виживання тварин, клінічними проявами інфекції або наявністю інтоксикації, бактеріологічними показниками та зміною ваги тварин.
3. *На реактогенність* (на лабораторних тваринах чи, іноді, на обмежених контингентах людей – добровольців). Оцінку проводять за температурною реакцією організму, розвитком запалення на місці введення та іншими показниками.
4. *Перевірка специфічної активності*.
 - А. **Вакцинні препарати:**
 - За концентрацією мікробів
 - За здатністю антитіло утворення при введенні тваринам
 - За здатністю викликати у імунізованих тварин несприйнятливність до зараження відповідними вірулентними мікроорганізмами.
 - Б. **Препарати із сироваток** – за концентрацією антитіл.
5. *На онкогенність*. Перевірці на експериментальних тваринах підлягають корпускулярні вакцини.

Питання для самоконтролю

- Що таке імунопрофілактика і імунотерапія?
- Які препарати використовують для створення штучного активного антимікробного імунітету?
- Які принципи класифікації вакцин?
- Хто перший отримав живі вакцини; що лежить в основі їх виготовлення?
- Які препарати використовують для створення штучного активного антитоксичного імунітету; як їх отримують?
- Які препарати використовують для створення штучного пасивного антимікробного і антитоксичного імунітету?
- З якою метою використовують імунні діагностичні сироватки, як їх отримують?

Практичне заняття №15

Тема: «Сучасні методи мікробіологічної діагностики інфекційних захворювань»

Актуальність теми.

Лабораторна діагностика інфекційних захворювань являється одним з пріоритетних напрямків розвитку системи охорони здоров'я України. Отримані лабораторні дані необхідні лікарю для постановки остаточного діагнозу захворювання і призначення раціональної антибіотико- і імунотерапії. Лікар – епідеміолог використовує результати мікробіологічних і імунологічних досліджень для проведення епідеміологічного аналізу захворюваності з метою встановлення джерела інфекції, шляхів її передачі, виявлення бактеріоносіїв та інших цілей.

Конкретні цілі

- Визначити основні задачі лабораторної діагностики інфекційних захворювань
- Ознайомитись сучасними методами лабораторної діагностики інфекційних захворювань.
- З'ясувати переваги та недоліки кожного з методів лабораторної діагностики.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №10.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття.

Термін	Визначення
Специфічність методу	Можливість реєструвати мінімальну кількість хибнопозитивних результатів
Чутливість методу	Здатність виявляти максимальну кількість дійснопозитивних зразків
Генетична діагностика	Виявлення в матеріалі від хворого або у виділеній культурі збудників специфічної ділянки нуклеїнової кислоти, характерної лише для цього мікроорганізму
Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	Метод виявлення та ідентифікації вірусів та мікробів в досліджуваних матеріалах. Принцип методу базується на багаточисельному копіюванні (селективній ампліфікації) досліджуваної нуклеїнової кислоти ферментом ДНК – полімеразою.

Теоретичні питання до заняття:

- Історичні етапи мікробіологічної діагностики
- Основні риси та тенденції розвитку сучасної мікробіології.
- Бактеріоскопічний метод дослідження. Етапи.

- Бактеріологічний метод дослідження. Принципи виділення чистих культур бактерій та їх ідентифікації.
- Етапи проведення бактеріологічної діагностики інфекційних захворювань.
- Основні переваги та недоліки імунологічних методів дослідження.
- Лабораторні тварини. Характеристика біологічного методу.
- Генетичні методи лабораторної діагностики інфекційних захворювань, їх характеристика.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Морфологічні методи, їх оцінка. Вивчити різні морфологічні форми бактерій з використанням світлової мікроскопії, а також суть дослідження під електронним мікроскопом (з демонстраційних матеріалах).
- Культуральні методи, їх оцінка. Вивчити різні форми колоній (з демонстраційних матеріалах).
- Імунологічні методи, їх оцінка. Здійснити облік РА і РЗК, поставлених з метою серологічної діагностики.
- Генетичні методи, їх суть і оцінка.
- Біологічний метод, характеристика, переваги та недоліки.

Зміст теми.

На практичному занятті студенти знайомляться з основними сучасними методами лабораторної діагностики інфекційних захворювань.

Використовуючи знання, набуті під час самостійної підготовки до заняття та в процесі розгляду теми на занятті, студенти дають оцінку кожному методу лабораторної діагностики. Студенти знайомляться з такими поняттями як експрес-діагностика, генетична діагностика, акцентують увагу на специфічності та чутливості методу. Розглядають та записують в протокол класифікацію методів лабораторної діагностики інфекційних захворювань, етапи бактеріологічної діагностики інфекційних захворювань та їх особливості, етапи проведення полімеразної ланцюгової реакції та її оцінку.

Студенти підписують протокол у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу

Сучасні методи лабораторної діагностики інфекційних хвороб

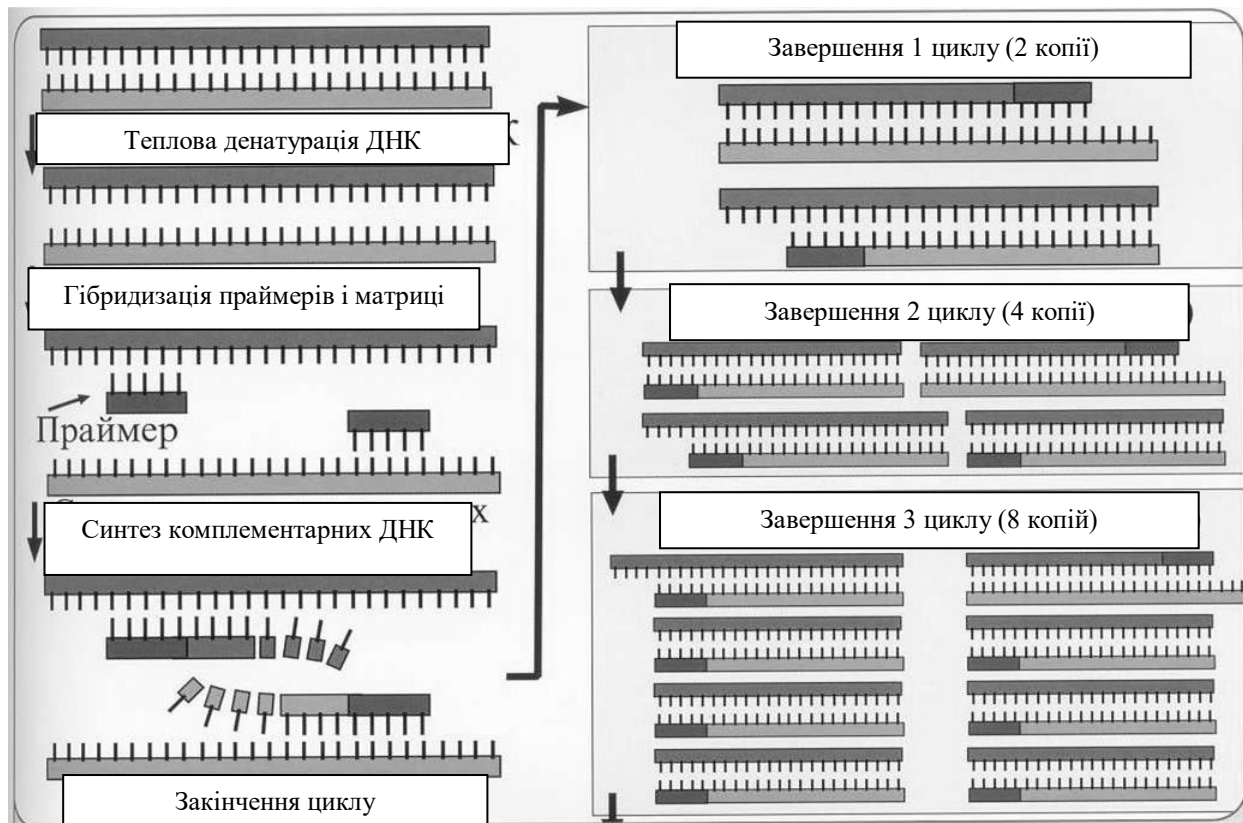
	Переваги	Недоліки
Мікроскопічна діагностика заснована на виявленні безпосередньо в матеріалі від хворого морфологічних і структурних особливостей збудника з метою його ідентифікації.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Швидкий 2. Ранній 3. Доступний 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Орієнтовний 2. Не універсальний 3. Низька чутливість

<p>Мікробіологічна діагностика (культуральні методи: бактеріологічний, вірусологічний, мікологічний) заснована на виділенні чистої культури збудника з матеріалу від хворого з наступною ідентифікацією</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Найбільш точний, в більшості випадків дозволяє поставити остаточний діагноз 2. Ранній 3. Дозволяє підібрати оптимальну антимікробну терапію 4. Передбачає використання різних систем для культивування збудників 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Неможливість культивувати деякі мікроорганізми 2. Особливості інтерпретації відносно опортуністичних інфекцій 3. Тривалість аналізу 4. Небезпечність для персоналу
<p>Серологічна діагностика спрямована на виявлення в сироватці хворого специфічних антитіл до збудника інфекції.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Швидкість аналізу 2. Невисока вартість 3. Можливості стандартизації та автоматизації аналізу 4. Висока можливість відтворення аналізу 5. Відносна простота 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Низька аналітична чутливість для прямих методів 2. Не може бути використана на початкових стадіях захворювання 3. Більше підходить для скринінгу, ніж для верифікації діагнозу
<p>Біологічний метод базується на моделюванні інфекційного захворювання на чутливих лабораторних тваринах</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Для дослідження використовується матеріал від хворого чи виділена чиста культура збудника 2. Вивчення механізмів розвитку захворювання (патогенезу) 3. Оцінка ефективності хіміопрепаратів, вакцин 4. Вивчення токсинів збудників, їх алергенної активності 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Не універсальний метод 2. Висока вартість
<p>Визначення антигенів мікроорганізмів (експрес-діагностика) метод спрямований на виявлення</p>	<p>Використання МКАТ дозволяє:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Визначати окремі епітопи антигенів 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Відносно дорога вартість дослідження

<p>специфічних антигенів збудника безпосередньо в матеріалі від хворого. Найчастіше для діагностики вірусних гепатитів, ВІЛ-інфекції, сказу, грипу та ін. використовуються такі високочутливі реакції з мітками як реакція імунофлюоресценції (РІФ), імуноферментний аналіз (ІФА). Часто для цього використовують моноклональні антитіла (МКАТ).</p>	<ol style="list-style-type: none"> 2. Розпізнавати клітини за їх поверхневими рецепторами 3. Здійснювати внутрішньотипову диференціацію бактерій та вірусів 4. Визначати біологічно активні речовини (цитокінів та ін.) 5. Транспортувати хімотерапевтичні препарати до пухлинних клітин 	<p>2. Необхідність використання коштовного обладнання</p>
<p>Генетична діагностика – виявлення в матеріалі від хворого або у виділеній культурі збудників специфічної ділянки нуклеїнової кислоти, характерної лише для цього мікроорганізму. Приклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Можливість отримання результату незалежно від здатності мікроорганізмів до культивування 2. Висока чутливість та точність аналізу 3. Швидкість аналізу 4. Можливість кількісного аналізу 5. Низька вартість 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Непростий зв'язок важливих в клініці фенотипових ознак (чутливість до антибіотиків) та генетичних маркерів 2. Складність аналізу, що може призводити до поганої відтворюваності результатів 3. Необхідність використання коштовного обладнання
<p>Алергічний метод заснований на виявленні реакції гіперчутливості уповільненого типу у відповідь на введення мікробного антигену (алергену). Приклад: реакція Манту.</p>	<p>Може бути використаний як скринінг-діагностика (дешево; можливість охопити широкий контингент осіб).</p>	<p>Порівняно низька специфічність</p>

Схема постановки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Метод ПЛР заснований на багатократному вибіркового копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ферментів *in vitro*. При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовольняє заданій умові, і лише в тому випадку, якщо вона присутня в досліджуваному зразку.



Для проведення ПЛР необхідні:

- ДНК-матриця, тобто фрагмент ДНК, що містить ту ділянку, яку потрібно ампліфікувати.
- Два праймери, комплементарні кінцям необхідного фрагменту.
- Термостабільна ДНК-полімераза.
- Дезоксинуклеотидтрифосфати (А, G, С, Т).
- Буферний розчин.

Зазвичай при проведенні ПЛР виконується 20—35 циклів, кожен з яких складається з трьох стадій:

1. Дволанцюгову ДНК-матрицю нагрівають до 94—96 °С на 0,5—10 хв., щоб ланцюги ДНК розділилися. Ця стадія називається **денатурацією** — руйнуються водневі зв'язки між двома ланцюгами.
2. Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоби праймери могли зв'язатися з одноланцюговою матрицею; відбувається гібридизація праймерів та матриці. Це стадія оптимальної температури для приєднання праймерів (англ. *annealing*), яка залежить від послідовності праймерів і зазвичай вибирається на 4—5°С нижче за їх температуру плавлення. Тривалість стадії — 0,5—2 хв.
3. ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюжок, використовуючи праймер як затравку. Це так звана **стадія елонгації**. Температура елонгації залежить від полімерази. Полімерази Taq і Pfu, що найчастіше використовуються, найактивніші за 72 °С. Після закінчення всіх циклів зазвичай проводять

додаткову стадію фінальної елонгації, щоб добудувати всі одноланцюжкові фрагменти. Ця стадія триває 5—15 хв.

Питання для самоконтролю:

- Які цілі та задачі лабораторної діагностики інфекційних захворювань?
- В чому полягає принципова різниця прямих та непрямих методів лабораторної діагностики інфекційних захворювань?
- Які захворювання можна діагностувати з використанням лише мікроскопічного методу?
- Які переваги та недоліки бактеріологічного методу лабораторної діагностики інфекційних захворювань?
- Які основні переваги та недоліки біологічного методу.
- З якою метою використовуються моноклональні антитіла?
- Які етапи проведення полімеразної ланцюгової реакції?

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна:

1. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в запитаннях і відповідях: навч. посіб. /Широбоков В.П., Клімнюк С.І., Корнійчук О.П. та ін.] –Тернопіль: ТДМУ, 2019. – 564 с.
2. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Практична мікробіологія: навчальний посібник / [Климнюк С.І., Ситник І.О., Широбоков В.П. та ін.], - Вінниця: Нова книга, 2018.- 576 с.
3. Широбоков В.П. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология:ученик для студ. Высш. Мед. учеб. Заведений: перевод с укр.. издания / [Адрианова Т.В., Бобырь В.В., Виноград Н.А. и др..], - Винница. – Новая Книга, 2015. – 856 с. : ил.
4. Широбоков В.П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. навч. закл. / Видання 2-е. – Вінниця: Нова Книга, 2011, 952 с. : іл.
5. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад. (За редакцією В.П.Широбокова). Вінниця: »Нова Книга», 2010. 447 – 451, 912 с.
6. Янковский Д.С., Широбоков В.П., Дымент Г.С. Интегральная роль симбиотической микрофлоры в физиологии человека. К: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2011. 169 с.
7. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Широбоков В.П. Медицинская и санитарная микробиология. М., 2006.
8. Поздеев О.А. Медицинская микробиология: учебное пособие / под ред. В.И.Покровского. – 4-е изд. испр. – М: ГЭОТАР – Медиа, 2006.
9. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Под ред. А.А.Воробьева, М., 2004, с. 354-356.
10. Климнюк С. І, Ситник І. О., Творко М. С., Широбоков В. П. – Практична мікробіологія.-Тернопіль, „Укрмедкнига”, 2004, с. 190-194.

Додаткова:

1. Medical microbiology / edited by Samuel Baron, MD. – 4th ed. The University of Texas Medical Branch and Galveston, 1996, 1273 p.
2. W.Levinson, E.Jawetz. Medical microbiology and immunology: examination and board review, 6th ed. The McGraw-Hill Companies, 2000, 582 p.