

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА

Кафедра біології

ІМУНОЛОГІЯ

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт студентами першого рівня вищої освіти (бакалавр) спеціальності 091 «Біологія та біохімія»

УМАНЬ – 2024

Методичні вказівки підготував

Р. М. Притуляк – кандидат с.-г. наук, доцент кафедри біології Уманського національного університету садівництва

Розглянуто і затверджено на засіданні кафедри біології (протокол від 6 серпня 2024 року № 1).

Схвалено науково-методичною комісією факультету плодовоовочівництва, екології та захисту рослин

Протокол від 9 серпня 2024 року № 1

Рецензент

В. П. Патика – доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Притуляк Р. М.

Імунологія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт студентами першого рівня вищої освіти (бакалавр) спеціальності 091 «Біологія та біохімія». Умань, 2024. 32 с.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	4
Лабораторна робота №1.	
Організація лабораторії імунології. Правила техніки безпеки при роботі в лабораторії.	
Приготування двократних та десятикратних серійних розведень.	5
Лабораторна робота №2.	
Структурно-функціональна організація імунної системи.	7
Лабораторна робота №3.	
Клітини імунної системи. Визначення загальної чисельності лейкоцитів у крові.	11
Лабораторна робота №4.	
Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів: фагоцитарний показник; фагоцитарне число.	16
Лабораторна робота №5.	
Визначення лейкоцитарної формули.	
Визначення життєздатності лімфоцитів.	18
Лабораторна робота №6.	
Вивчення антагонізму у мікробів.	
Антибіотики. Методи вивчення чутливості бактерій до антибіотиків.	23
Лабораторна робота №7.	
Отримання лейкоконцентрату методом спонтанного осадження еритроцитів розчином желатину (мікрометод).	
Отримання лімфоконцентрату в градієнті щільності фікол-верографіну.	29
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	32

ПЕРЕДМОВА

Сучасна імунологія є самостійною науковою галуззю, яка займає одне з центральних місць серед біологічних дисциплін.

В останні десятиліття інтерес до проблем імунології виріс, що визначається рядом факторів. Однією з особливостей здоров'я населення зараз є суттєвий ріст патології, асоційованої з порушеннями діяльності імунної системи (імунодефіцитні стани, алергічні захворювання, аутоімунні, пухлинні процеси, інфекції імунної системи та ін.). Разом з тим саме з успіхами імунології пов'язують розв'язання таких проблем, як одержання нових високоефективних діагностичних і лікарських препаратів методом імунобіотехнології, здолаття інфекційних захворювань на принципово нових підходах (генноінженерні вакцини), розшифрування механізмів найбільш важких захворювань людини. Успіхи імунології широко використовуються в біології, медичній практиці, тому майбутньому біологу необхідні глибокі знання в області імунології.

Методичні вказівки підготовлено згідно з програмою нормативного курсу "Імунологія" для здобувачів вищої освіти спеціальності 091 – Біологія та біохімія. Головна мета – сформувати у студентів уявлення про організацію імунної системи як однієї з інтегративних систем організму, а також оволодіти навичками роботи в імунологічній лабораторії.

Використання методичних вказівок під час підготовки до лабораторних та семінарських занять сприятиме глибшому розумінню студентами теоретичних і практичних проблем сучасної імунології, полегшить опанування програми нормативного курсу "Імунологія".

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

Організація лабораторії імунології. Правила техніки безпеки при роботі в лабораторії.

Приготування двократних та десятикратних серійних розведень.

Матеріали і обладнання: пробірки, що містять 9 мл стерильної води; колби, що містять 99 мл стерильної води; стерильні запаковані піпетки на 1 мл; штативи паперові етикетки; клей ПВА.

Вказівки до виконання роботи.

На лабораторних заняттях з курсу “Імунологія” проводяться дослідження біоматеріалу, що належить до групи потенційно інфікованого. Це потребує дотримання основних вимог техніки безпеки та санітарно-протиепідемічного режиму. До основних заходів, спрямованих на підтримку санітарного режиму, належить проведення дезінфекції, дотримання вимог асептики та стерилізації.

Для кожної лабораторної роботи повинно бути організоване робоче місце з усім необхідним для виконання завдання:

- розчини реактивів;
- штатив із пробірками, піпетки;
- предметне та покривне скло, камера Горяєва, мікроскоп, інше обладнання, яке використовується при виконанні завдання;
- інструкція проведення даного дослідження.

Правила роботи в лабораторії:

- роботу з досліджуваними матеріалами проводять у халатах, шапочках, рукавичках;
- на робочому місці не повинні знаходитись сторонні речі;
- на робочому столі повинна знаходитись ємність з дезінфікуючим розчином (0,5 % розчин хлорного вапна, 1% розчин хлораміну);
- робоче місце після роботи дезінфікують;
- при потраплянні біоматеріалу на спецодяг чи робочу поверхню місце дезінфікують, одяг замочують у дезінфікуючому розчині;
- використані пробірки, інструменти, що контактували з біоматеріалом, дезінфікують у відповідних маркованих ємностях з дезінфікуючим розчином;
- після виконання завдання проводять обробку використаного обладнання: центрифугу та іонометр протирають дезінфікуючим розчином; об'єкти мікроскопа протирають сухою матерією, окуляри – 700 спиртом;
- в кінці заняття робоче місце прибирають, рукавички занурюють у відповідну марковану ємність з дезінфікуючим розчином, миють руки.

Обробка лабораторного посуду:

- лабораторний посуд промивають у ємності з водою. Промивні води знезаражують шляхом кип'ятіння протягом 30 хв або сухим хлорним вапном (200 г/л), перемішують і залишають на 60 хв;
- скляні пробірки після вивільнення біоматеріалу складають у марковану ємність, заливають дезінфікуючим розчином, і після години інкубації пробірки

проходять етап передстерилізаційної обробки і стерилізації; ємність для проведення дезінфекції має бути чітко маркована, мати кришку;

- пластиковий одноразовий посуд після обробки в дезінфікуючому розчині складають у спеціальний пакет для лабораторних відходів;

- пластиковий посуд багаторазового використання після обробки дезрозчином (6 % розчином гідрогену пероксиду) ретельно промивають проточною, потім дистильованою водою, висушують і готують до роботи;

- капіляри, предметне скло, аглютинаційні пробірки стерилізують у сухожаровій шафі за температури 180⁰С протягом 1 год. Стерильність зберігається протягом 3 діб.

Утилізація біоматеріалу:

- згустки крові збирають у спеціальну марковану ємність і засипають сухим хлорним вапном у відношенні 1 частина сухого хлорного вапна і 5 частин згустків крові;

- залишки слини обробляють таким самим чином;

- залишки сироватки зливають у марковану ємність і заливають дезінфікуючим розчином у відношенні 1:5.

Двократні серійні розведення досліджуваного матеріалу. Для цього в штативі розмістити ряд з 8 або більше пробірок. У всі пробірки внести по 1 мл розчинника (наприклад ізотонічного розчину натрій хлориду). Далі до розчинника в першій пробірці додати 1 мл матеріалу, який необхідно розвести (наприклад антиген або цільна сироватка). Вміст пробірки ретельно перемішати. Далі стандартний об'єм (1 мл) суміші перенести в наступну (другу) пробірку, ретельно змішати з розчинником і перенести в третю, з третьої – в четверту, і так далі до останньої пробірки ряду. Потім з останньої пробірки ряду стандартний об'єм суміші вилити, щоб у всіх пробірках об'єм рідини був однаковий. В результаті одержують серію розведень, в якій вміст вихідного матеріалу убуває в геометричній прогресії 1:2, 1:4, 1:8 і т.д. до 1:64 і більше. *Увага! Після внесення 1 мл рідини в чергову пробірку піпетку заміняють на нову!*

Десятикратні серійні розведення досліджуваного матеріалу. Для цього розчинник (наприклад ізотонічний розчин натрій хлориду) розлити по 9 мл в пробірки, розставлені в штативі по 10 в ряду. В першу пробірку внести 1 мл розчину, який необхідно розбавити. Одержують розведення 1:10. Далі вміст пробірки ретельно перемішати і перенести мірною піпеткою 1 мл з цієї пробірки в другу (одержують розведення 1:100). Знову перемішати вміст вже другої пробірки і перенести таку ж кількість суміші з другої в третю (одержують розведення 1:1000); перемішати і перенести таку ж кількість суміші з третьої в четверту (одержують розведення 1:10000) і т.д. до десятої пробірки (розведення 1:10000000000), з якої 1 мл відібрати, щоб у всіх пробірках об'єм рідини був однаковий. *Увага! Після внесення 1 мл рідини в чергову пробірку піпетку заміняють на нову!*

Питання для самоконтролю.

1. Які правила роботи в лабораторії імунології?

2. Назвіть основні складові біологічного мікроскопа.
3. Що таке метод розведень?
4. Як виконати двократні серійні розведення?
5. Як виконати десятикратні серійні розведення?
6. Як виконати розведення 1:100000?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Структурно-функціональна організація імунної системи.

Вказівки до виконання роботи.

Дайте порівняльну характеристику вродженому та набутому імунітету.
Заповніть таблицю:

Вид імунітету	Вроджений імунітет	Набутий імунітет
Функція		
Активність системи		
Механізм прояву		
Імунологічна пам'ять		
Клітини, що задіяні у прояві імунітету		
Гуморальні фактори, що забезпечують прояв імунних реакцій		

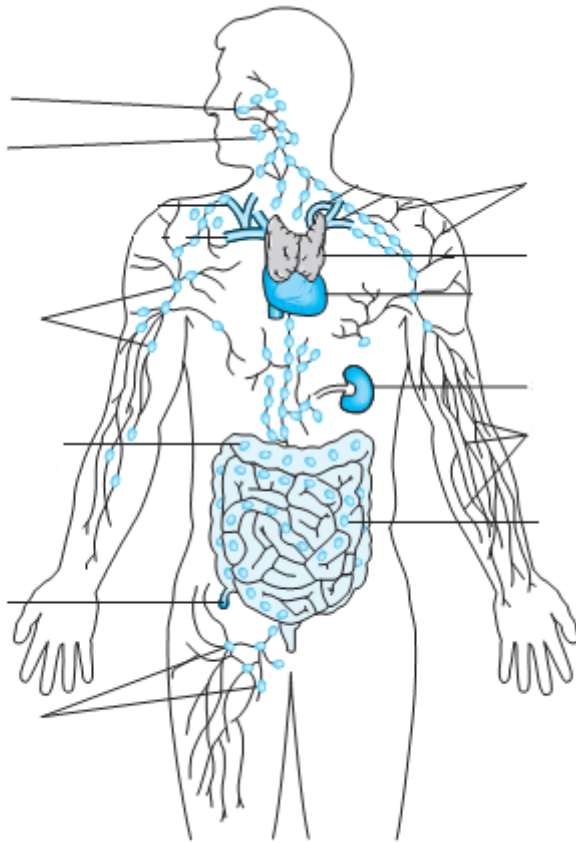
Заповніть таблицю:

Фактори неспецифічної резистентності	Приклади
Зовнішні	
Внутрішні (гуморальні)	
Внутрішні (клітинні)	

Заповніть таблицю:

Причини виникнення запалення	
Клітини гострої фази запалення	
Назвіть клітини хронічної фази запалення	
Назвіть етапи проходження лейкоцитів через судинну стінку	

Укажіть на рисунку основні органи лімфоїдної системи людини:



Базові поняття, якими має оволодіти студент.

Альтернативний шлях активації комплементу – процес активації системи комплементу за участі компонента С3 і факторів В, Д, Р, Н, І з утворенням С3-конвертази альтернативного шляху.

Білки гострої фази – група сироваткових білків, що продукуються печінкою. Їх концентрація різко зростає під час запалення, володіють літичними властивостями щодо бактерій.

Вилочкова залоза (тимус) – центральний орган імунної системи хребетних, в якому відбувається дозрівання Т-лімфоцитів. Складається з двох частин, розділених на менші частки, побудовані з кіркової (де Т-лімфоцити диференціюються на імунокомпетентні тимоцити) та мозкової речовини, куди мігрують уже зрілі Т-лімфоцити, щоб потім потрапити з кров'ю та лімфою до периферійних лімфоїдних органів.

Вторинні органи імунної системи (периферійні) – лімфатичні вузли, селезінка, лімфоїдна тканина, асоційована зі слизовими оболонками. Органи, в яких відбувається затримка та концентрація чужорідних речовин, а також проліферація та диференціація Т- і В-лімфоцитів завдяки контактуванню з антигенами.

Дефензини – група низькомолекулярних білків, що продукуються нейтрофілами і мають антибактеріальну активність.

Ефекторні клітини – лімфоцити й фагоцити, які після завершення диференціювання можуть здійснювати свої кінцеві функції. Це функціональне поняття, що об'єднує клітини, які беруть участь в імунній відповіді

безпосередньо (шляхом контакту) або опосередковано – через розчинні речовини (лімфокіни).

Запалення – сукупність процесів, що зумовлюють міграцію клітин і надходження ефекторів імунної системи до місця інфекції або ушкодження.

Імунітет – сукупність захисно-адаптаційних реакцій і пристосувань, спрямованих на збереження сталості антигенного складу внутрішнього середовища організму, здатність організму захищати власну цілісність і біологічну індивідуальність; включає як неспецифічні (вроджені), так і специфічні (набуті) механізми.

Імунітет гуморальний – імунітет, основним ефектором якого є антитіла.

Імунітет клітинний – імунітет, основним ефектором якого є клітини та сенсibiliзовані лімфоцити й продуковані ними лімфокіни.

Імунітет місцевий – частина загального імунітету, що забезпечує захист певних ділянок тіла людей і тварин (шкіри, слизових оболонок, тканин, органів) від паразитів і речовин антигенної природи.

Імунітет набутий – форма імунітету, набута в процесі індивідуального розвитку організму після контакту з паразитами і речовинами антигенної природи.

Імунітет пасивний – специфічна імунологічна реактивність, набута після штучного введення лікувальної сироватки або природного перенесення материнських імуноглобулінів крізь плаценту плоду.

Імунітет природний – уроджена, неспецифічна форма імунітету, зумовлена бар'єрними й антимікробними властивостями шкіри і слизових оболонок, конкурентною активністю нормальної мікрофлори тіла, ареактивністю тканин до дії пошкоджуючих факторів, фагоцитарною реакцією макрофагів і нейтрофілів, природними кілерами, комплементом, лізоцимом, інтерфероном тощо.

Імунна система – сукупність усіх лімфоїдних органів та скупчень лімфоїдних клітин.

Інтерлейкіни – високоактивні біологічні речовини, що продукуються макрофагами і Т-лімфоцитами, визначають поділ і диференціацію багатьох типів клітин; група молекул, які беруть участь у передачі сигналів між клітинами імунної системи.

Інтерферон – захисний білок із молекулярною масою 25-110 кДа, що утворюється в клітинах ссавців і птахів при вірусних інфекціях; неспецифічний фактор противірусного імунітету, що підсилює функціональну активність клітин, розвиток і функцію природних кілерів і Т-цитотоксичних клітин, активує макрофаги, регулює силу імунної відповіді.

Лімфатичні вузли – периферійні органи імунної системи, розміщені по ходу лімфатичних судин, в яких за допомогою захоплених із лімфи антигенів відбувається стимуляція Т- і В-лімфоцитів. В-лімфоцити знаходяться у кірковій речовині, а Т-лімфоцити – в паракортєксі. Медула містить як В-, так і Т-лімфоцити, а також плазматичні клітини і макрофаги. Контакт з антигеном, що надходить у лімфатичні вузли через аферентні лімфатичні судини, зумовлює утворення зародкових центрів у корковій (гуморальна імунна реакція) або

початок клональної проліферації в навколорковій речовині (клітинозалежні імунні реакції). Важливу роль при цьому відіграють клітини ретикулуму (дендритні макрофаги), здатні до фагоцитозу і (або) накопичення антигену.

Лімфатичні скупчення – лімфатичні вузли вздовж кишок і верхніх дихальних шляхів, які є дрібними скупченнями лімфоїдних елементів і фагоцитуючих клітин, що відрізняються від лімфовузлів відсутністю капсул.

Медіатори запалення – біологічно активні речовини, що вивільняються із клітин або утворюються внаслідок запальної реакції.

Мигдалики – навколоротове скупчення лімфоїдної тканини у наземних хребетних, що відіграє роль у захисті організму від патогенних мікроорганізмів.

Молекули адгезії – речовини, що експресуються активованими кубічними ендотеліальними клітинами і сприяють надходженню лімфоцитів до місця локалізації антигену й утриманню їх там.

Опсонізація – процес, що полегшує фагоцитоз. Зумовлений зв'язуванням опсонінів (антитіл, компонентів комплементу) з поверхневими антигенами бактерій, ушкодженням або вкриванням поверхні патогенного фактору комплементом, С-реактивним білком або іншими імунними факторами; необхідний для фагоцитозу макрофагами або нейтрофілами.

Опсоніни – білкові фактори сироватки крові, які, взаємодіючи з поверхнею чужорідних частинок, полегшують їх захоплення фагоцитами.

Пейєрові бляшки – скупчення лімфоїдної тканини, розміщені в підслизовій основі тонкої кишки, вторинні лімфоїдні органи. Містять В- і Т-лімфоцити та клітини епітелію, через які здійснюється транспорт антигенів до лімфоцитів у просвіт кишки, а секреторного IgA – в протилежному напрямку.

Первинні (центральні) лімфоїдні тканини – тканини лімфоїдних органів, в яких лімфоцити проходять початкові стадії дозрівання (червоний кістковий мозок, тимус, фабрицієва сумка у птахів).

Природні кілери (натуральні кілери, НК-клітини) – великі лімфоцитоподібні клітини з гранулами в цитоплазмі, здатні без попередньої імунізації здійснювати цитотоксичний вплив на пухлинні та інфіковані вірусами клітини.

Селезінка – основний вторинний лімфоїдний орган, розміщений у черевній порожнині, непарний паренхіматозний орган. Заселяється імунокомпетентними клітинами в період ембріогенезу або відразу після народження. Т-лімфоцити заселяються навколо аретріол (тимусзалежна зона), а В-лімфоцити утворюють фолікули селезінки (тимуснезалежна зона). Після контакту з антигеном фолікули перетворюються на зародкові центри, в яких утворюються лімфоцити, що продукують антитіла. Клітини ретикулуму здійснюють фагоцитоз і специфічне накопичення антигену. Лімфоїдна тканина селезінки забезпечує реакції гуморального типу, накопичує велику кількість плазматичних клітин, що продукують антитіла; при внутрішньовенному введенні антигену антитіла переважно утворюються у селезінці.

Фагоцитоз – процес активного захоплення та поглинання мікроскопічних чужорідних живих об'єктів спеціалізованими захисними клітинами тварин і

людини (нейтрофілами, мононуклеарними фагоцитами), які здатні до захоплення та перетравлення чужорідних частинок.

Хемокіни – низькомолекулярні секреторні пептиди, які регулюють переміщення лейкоцитів у вогнище запалення.

Цитокіни – група молекул, що секретуються лейкоцитами та іншими клітинами, які опосередковують міжклітинні взаємодії під час імунної відповіді.

G-катепсини – фермент, що належить до серинових протеаз, бере участь у знешкодженні захоплених патогенів, а також у відновленні сполучної тканини в ділянці запалення.

Питання для самоконтролю.

1. Назвіть складові системи природного імунітету.
2. Охарактеризуйте гуморальні та клітинні фактори природної резистентності.
3. Запалення як прояв місцевої реакції неспецифічного імунітету.
4. Охарактеризуйте функції первинних і вторинних лімфоїдних органів.
5. Проаналізуйте механізми імунного захисту слизових оболонок.
6. Дайте порівняльну характеристику вродженому та набутому імунітету.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

Клітини імунної системи. Визначення загальної чисельності лейкоцитів у крові.

Матеріали і обладнання: мікроскоп; камера Горяєва; покривне скло; піпетки; штатив з пробірками; 3% розчин оцтової кислоти; 96% спирт етиловий; вата.

Вказівки до виконання роботи.

Клітини плазматичні – кінцевий результат диференціації В-лімфоцитів. Мають базофільну цитоплазму, багату на ЕПР і мітохондрії, ексцентрично розташоване ядро характерного виду (“колесо зі спицями”), добре виражений комплекс Гольджі. Плазматичні клітини є продуцентами антитіл. Вони не діляться. Тривалість їх життя у людини складає близько 4 діб.

Навчання Т-клітин – процеси позитивної та негативної селекції клітин, що розвиваються з тимоцитів. Позитивний добір проходять незрілі Т-клітини, здатні відповідати на антигенні пептиди, що асоційовані з власними молекулами МНС. Негативного добору із наступною загибеллю зазнають Т-клітини, що відповідають на власні антигени МНС.

В-лімфоцити, В-клітини, бурсоцити – лімфоїдні клітини, що походять із кісткового мозку. Диференціюються у фабрицієвій сумці (у птахів) і у кістковому мозку (ссавців). В-лімфоцити утворюються з про-В-лімфоцитів; заселяють тимуснезалежні зони вторинних лімфоїдних органів; виявляються у крово- та лімфотоках як їх складова частина. Контакт з специфічним антигеном

зумовлює диференціацію В-лімфоцитів на плазматичні клітини, що є продуцентами антитіл.

Т-лімфоцити, Т-клітини, тимусзалежні лімфоцити – гетерогенна популяція клітин, які дозрівають під впливом інтактного тимуса. Т-лімфоцити покидають тимус як посттимусні клітини-попередники, які на периферії перетворюються на імунокомпетентні Т-лімфоцити. Т-лімфоцити мігрують у тимусзалежні зони вторинних лімфоїдних органів. Т-лімфоцити відповідальні за клітинозалежні імунні реакції; здійснюють регулюючий вплив на гуморальну імунну відповідь.

Лейкоцити – це форменні елементи крові, основною функцією яких є захист організму від чужорідних агентів. Кількість лейкоцитів у циркулюючій крові – важливий діагностичний показник, який залежить від швидкості надходження клітин з кісткового мозку і швидкості виходу їх у тканини. Число лейкоцитів протягом дня може змінюватися за дії різних факторів, не виходячи, проте, за межі допустимих значень. Забір крові для аналізу краще здійснювати вранці. Підвищена кількість лейкоцитів (*фізіологічний лейкоцитоз*) виникає після прийому їжі, після фізичних навантажень та в другій половині дня. Рівень лейкоцитів також підвищується при стресах, дії холоду чи тепла. У жінок підвищена кількість лейкоцитів відзначається в передменструальний період, у другій половині вагітності і при пологах. Підвищена кількість лейкоцитів – *лейкоцитоз* – свідчить про протікання в організмі гострих інфекцій, особливо якщо збудниками є коки (стафілокок, стрептокок, пневмокок, гонокок). Лейкоцитоз спостерігається при запальних процесах, травмах, опіках, при ревматичній атаці, інтоксикації, в тому числі діабетичному ацидозі, екламписі, уремії, подагрі. Рівень лейкоцитів також підвищується при злоякісних новоутвореннях, гострих кровотечах, особливо внутрішніх – у черевну порожнину, плевральний простір, суглоб або в безпосередній близькості від твердої мозкової оболонки, при оперативних втручаннях, при інфаркті внутрішніх органів (міокарда, легенів, нирок, селезінки) тощо.

Зниження рівня лейкоцитів – *лейкопенія* – виникає при деяких вірусних та бактеріальних інфекціях. Це, наприклад, грип, черевний тиф, туляремія, кір, малярія, краснуха, епідемічний паротит, інфекційний мононуклеоз, міліарний туберкульоз, СНІД. Сюди ж відносяться сепсис, гіпо-і аплазія кісткового мозку, ушкодження кісткового мозку хімічними засобами, ліками, вплив іонізуючого випромінювання, гострі лейкози, мієлофіброз, мієлодиспластичні синдроми, плазмоцитома, метастази новоутворень в кістковий мозок, хвороба Аддісона-Бірмера, анафілактичний шок, системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, колагенози, прийом сульфаніламідів, левоміцетину, анальгетиків, нестероїдних протизапальних засобів, тиреостатиків, цитостатиків.

Ознайомлення з будовою камери Горяєва.

Визначення загальної кількості лейкоцитів у крові в імунологічних лабораторіях проводять у лічильній камері Горяєва.

Будова лічильної камери Горяєва.

Лічильна камера Горяєва складається з товстого прямокутного (предметного) скла, в центральній частині якого нанесено дві або чотири сітки Горяєва (*рис. 1*), розмежовані одна від одної повздовжніми і поперечними жолобами. Збоку від сіток розташовані скляні прямокутні пластинки, до яких притирається шліфоване покривне скельце.



Рис. 1. Різновиди камери Горяєва

Сітка Горяєва складається з 225 великих квадратів (по 15 в кожному з рядів), 25 з них розділені на 16 маленьких квадратів (для підрахунку еритроцитів) і 100 великих порожніх квадратів зібрано в групи по 4 квадрати кожна (для підрахунку лейкоцитів) (*рис. 2*). Сторони малого квадрата рівні 0,05 мм (площа його рівна 0,0025 мм², глибина рахункової камери рівна 0,1 мм, об'єм малого квадрата рівний 0,00025 мм³). Великий квадрат сітки Горяєва складається з 16 малих квадратів, отже, має $S = 0,04$ мм², а $V = 0,004$ мм³.

Лейкоцити підраховують у 100 великих порожніх квадратах (20×5), площа яких рівна 4 мм² (площа одного великого квадрата дорівнює 0,04 мм²). Кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих порожніх квадратах, ділять на 4 і перемножують на 200, одержують кількість лейкоцитів в 1мм³ крові. Ділять на 4 з розрахунку загальної площі 100 великих порожніх квадратів, рівної 4 мм². Перемножують з розрахунку, що ступінь розведення крові дорівнює 20 (0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти і 0,02 мл крові), а глибина камери 0,1 мм.

Замість вище наведених розрахунків можна кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих квадратах, помножити на 50 (якщо врахувати попередні розрахунки: 200:4=50).

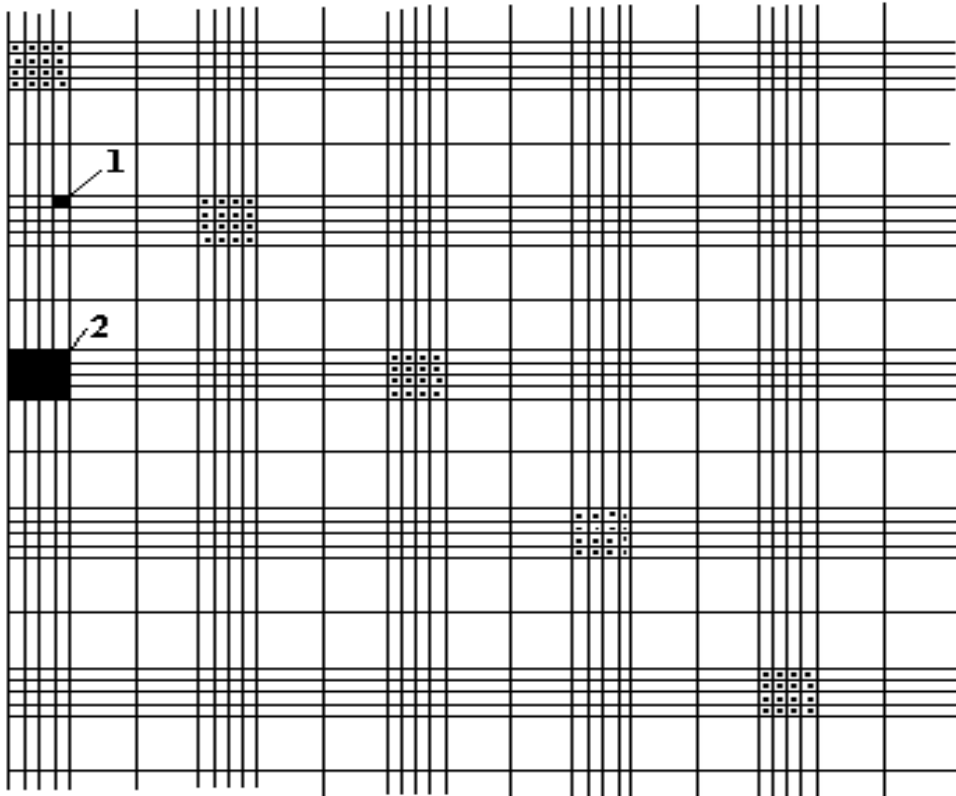


Рис. 2. Сітка Горяєва
(1 – малий квадрат, 2 – великий квадрат)

Для того, щоб повторно не підрахувати один і той же лейкоцит, потрібно суворо дотримуватися певного порядку (рис. 3):

- рахувати ряди великих порожніх квадратів зліва направо і справа наліво, переміщуючи камеру на один ряд зверху вниз;
- у кожному квадраті потрібно рахувати елементи, що лежать всередині, а також на лівому та верхньому боці камери.

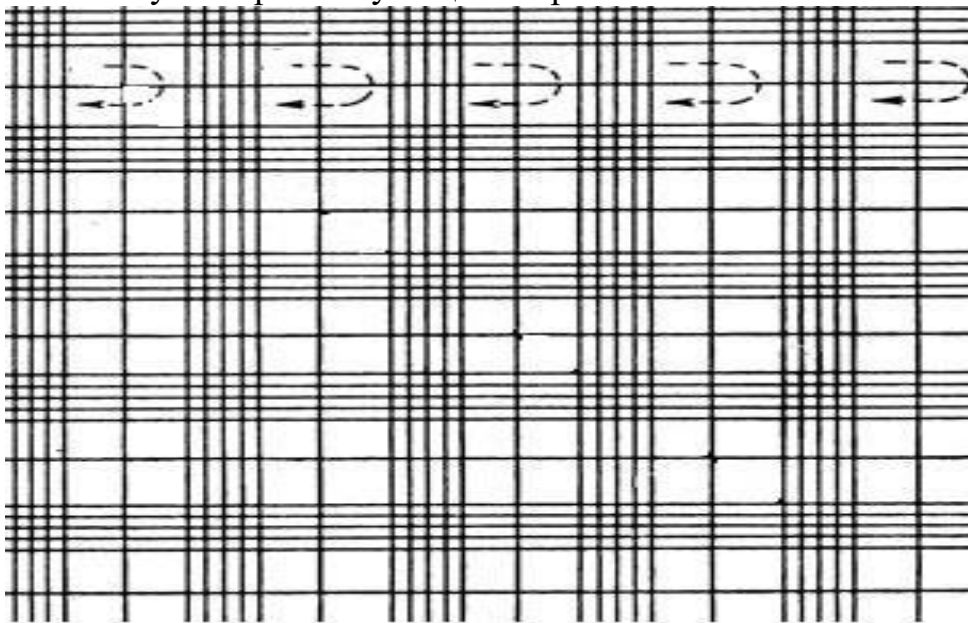


Рис. 3. Порядок переміщення сітки при підрахунку лейкоцитів

Визначення загальної кількості лейкоцитів у крові.

1. В аглютинаційну пробірку внести 0,38 мл 3% розчину ацетатної кислоти.

2. Додати у пробірку 0,02 мл крові капіляром Салі (отримаємо розведення крові – 1:20), змішати і залишити на 1-2 хв до повного лізису еритроцитів.

3. Приготувати для роботи камеру Горяєва:

- знежирити спиртом і витерти насухо камеру і покривне скло;
- перед підрахунком формених елементів крові на камеру обережно покласти знежирене покривне скло і притерти його до країв камери шляхом притиснення великими пальцями обох рук і легкими зсувами покривного скла вгору і вниз до появи веселкових ліній (кілець Ньютона) біля притертих країв, що свідчить про щільність прилягання покривного скла.

4. Заповнити камеру суспензією лейкоцитів крізь щілини між середньою пластиною і покривним склом. Суспензія клітин, витікаючи з мікропіпетки, заповнює камеру. Інші частини камери можна заповнити суспензією клітин наступного зразка лейкоцитів.

Експозиція в камері Горяєва суспензії клітин складає близько 1 хвилини для їх рівномірного осідання на поверхні камери. Підрахунок лейкоцитів у камері Горяєва проводять під мікроскопом.

5. Підрахунок кількості лейкоцитів проводити за допомогою мікроскопа (окуляр $\times 10$ або $\times 15$, об'єктив $\times 8$) у 100 великих квадратах сітки Горяєва, згрупованих по чотири, згідно *рис. 2* і *рис. 3*.

6. Лейкоцити у сітці Горяєва мають вигляд як на *рис. 4*.

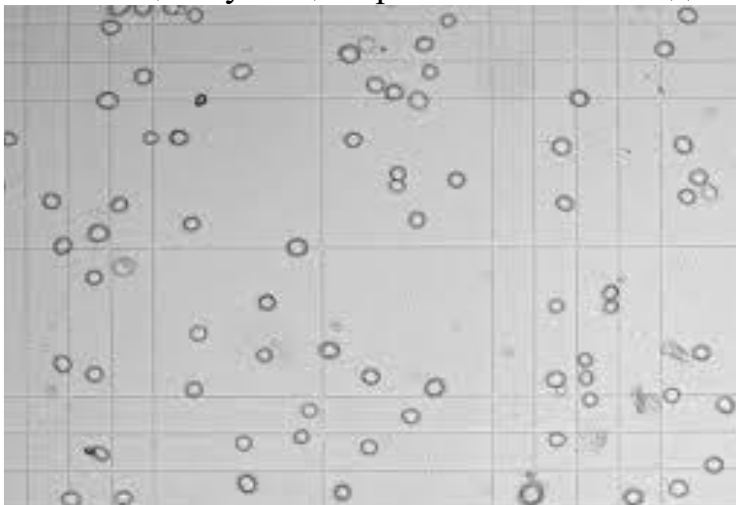


Рис. 4. Розташування лейкоцитів у сітці Горяєва

7. Загальну кількість лейкоцитів у крові розрахувати за формулою:

$$X = a \cdot 50 \cdot 106 / \text{л},$$

де X – кількість лейкоцитів в 1 л крові;

a – сума лейкоцитів у 100 великих квадратах;

106 – перерахунок із мікролітрів у літри.

Норма – $4-9 \cdot 10^9 / \text{л}$.

8. Записати результати підрахунку.

Питання для самоконтролю.

1. Клітини неспецифічного імунного захисту.

2. Онтогенез В- і Т-лімфоцитів.
3. Міграція Т- і В- лімфоцитів у периферійні лімфоїдні органи.
4. Рециркуляція лімфоцитів. Яке біологічне значення має постійне оновлення лімфоїдних клітин в організмі?
5. Активація лімфоцитів.
6. Імунна пам'ять.
7. Дайте порівняльну характеристику фагоцитів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів: фагоцитарний показник; фагоцитарне число.

Матеріали і обладнання: дріжджі сухі гранульовані; 0,9% NaCl; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (натрій лимоннокислий); фарба-фіксатор Май-Грюнвальда; фарба Романовського-Гімзи; масло імерсійне для мікроскопії; спирт етиловий 96⁰; ефір; вода дистильована; дозатори медичні лабораторні з наконечниками; центрифуга лабораторна; термостат; мікроскоп біокулярний, об'єктив ($\times 100$), окуляр ($\times 7$); лейкоцитарний лічильник.

Вказівки до виконання роботи.

Фагоцитоз – це процес розпізнавання об'єкту фагоцитозу, його поглинання, елімінація і виведення з організму. Процес фагоцитозу можна розділити на два етапи. На першому етапі антигенвмісна структура зв'язується на поверхні мембрани фагоцитуючих клітин. На другому етапі відбувається поглинання чужорідного матеріалу і його подальше руйнування. Розрізняють два основних типи клітин фагоцитів – мононуклеарні (основні з яких моноцити/макрофаги) й полінуклеарні (в основному нейтрофіли) лейкоцити. Мононуклеарні фагоцитуючі клітини відіграють важливу роль в ініціації імунної відповіді шляхом захоплення антигену, презентації його Т-лімфоцитам і секреції цитокінів. Полінуклеарні нейтрофіли – це перша лінія захисту від проникнення в організм різноманітних бактерій, грибів і найпростіших. Фагоцитарна активність нейтрофілів, як й інших фагоцитуючих клітин, відіграє значну роль протягом всього запального процесу аж до регенерації ушкодження в тканинах. Зниження фагоцитарної функції нейтрофілів може привести до хронізації запального процесу, який з гомеостатичного може перейти в імунопатологічний, наприклад, шляхом підтримки алергічного або аутоімунного процесу за рахунок порушення фагоцитами здатності до руйнування та виведення імунних комплексів із організму. Тому визначення показників фагоцитозу має значення в комплексній оцінці і діагностиці імунодефіцитних станів при рецидивуючих гнійно-запальних процесах, алергічних, аутоімунних захворюваннях, післяопераційних ускладненнях та ін. Найінформативнішими показниками для оцінки активності фагоцитозу вважають фагоцитарний показник та фагоцитарне число.

Принцип методу: метод базується на фагоцитозі нейтрофілами часток (наприклад, дріжджів), які візуалізуються в цитоплазмі клітин у вигляді гранул синього кольору.

Підготовка реактивів для визначення фагоцитратної активності нейтрофілів з використанням дріжджів.

1.1. 3,8% розчин натрію лимоннокислого: наважку натрію лимоннокислого 3,8 г перенести в мірну колбу ємністю 100 мл, розчинити в дистильованій воді та довести об'єм до мітки. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком при температурі від +4-6⁰С протягом одного тижня.

1.2. Робочий розчин фарби Романовського-Гімзи: робоче розведення готової фарби повинен визначати дослідник шляхом титрування; готують декілька розведень – 1, 2, 3 краплі барвника на 1 мл дистильованої води, далі фарбують мазки різними розведеннями, обирають мазок із найкращим забарвленням, чим і визначають титр барвника. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком при температурі +4-6⁰С протягом одного місяця.

1.3. Суміш Нікіфорова: змішати 1 об'єм спирту етилового 96⁰ з 1 об'ємом ефіру. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком у прохолодному місці, віддаленому від вогню.

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

Підготовка суспензії дріжджів.

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

Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів з дріжджами.

1. До 100 мкл крові, стабілізованої гепарином, додати 50 мкл робочого розчину дріжджів. Обережно перемішати.

2. Поставити в термостат на 30 хвилин (+37⁰С). Кожні 10 хвилин суспензію обережно перемішувати.

3. Приготувати мазок. Для цього дозатором лабораторним з верхнього шару клітин відібрати 7-8 мкл лейкоконцентрату, перенести його на предметне скло і рівномірно розподілити по поверхні скла тонким шаром за допомогою шліфувального скла.

4. Поставити пробірку на інкубацію в термостат ще на 60 хвилин (+37⁰С). Кожні 10 хвилин суспензію обережно перемішувати.

5. Через 60 хв приготувати мазок.

6. Мазок висушити на повітрі.

7. Провести фіксацію препаратів у етиловому спирті (96⁰) 15 хвилин.

8. Зафарбувати мазки за Паппенгеймом (комбіноване фарбування за Май-Грюнвальдом та Романовським-Гімза). Для цього мазки зафіксувати фарбою-фіксатором Май-Грюнвальда протягом 40 сек. Час фіксації контролювати секундоміром. Фарбу змити дистильованою водою, мазок висушити на повітрі при кімнатній температурі. Після цього мазки зафарбувати робочим розчином фарби Романовського-Гімзи протягом 20 хвилин. Час фарбування контролювати секундоміром. Фарбу змити дистильованою водою, мазок висушити на повітрі при кімнатній температурі.

9. Провести оцінку результатів. Визначати фагоцитарний індекс, фагоцитарне число.

Підрахунок результатів проводять за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву ($\times 100$), окуляр ($\times 7$). Підрахунок проводять на 200 нейтрофілів і визначають відсоток тих клітин, які містять у своїй цитоплазмі клітини дріжджів (включення синього кольору).

Вираховують показники, які характеризують стан фагоцитозу:

Фагоцитарний показник (ФП) – відсоток нейтрофілів, які беруть участь у фагоцитозі.

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

Фагоцитарне число – середня кількість дріжджів, захоплених одним нейтрофілом крові. Характеризує поглинальну здатність нейтрофілів.

$$\text{ФЧ} = \frac{\text{сумарна кількість дріжджів у клітинах}}{\text{кількість клітин з включеннями дріжджів}}$$

Норма:

Фагоцитарний показник – 50-80%.

Фагоцитарне число – 4-9.

Практичні завдання

1. У 100 фагоцитах міститься 448 фагоцитованих бактерій. Розрахуйте фагоцитарне число. Про що свідчить отриманий результат?

2. У 100 фагоцитах міститься 186 фагоцитованих бактерій. Розрахуйте фагоцитарне число. Про що свідчить отриманий результат?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

Визначення лейкоцитарної формули. Визначення життєздатності лімфоцитів.

Матеріали і обладнання (визначення лейкоцитарної формули): мікроскоп; предметне скло; піпетки; 96% спирт етиловий; барвник Романовського-Гімза; лейкоцитарний лічильник.

Матеріали і обладнання (визначення життєздатності лімфоцитів): 0,2% розчин трипанового синього; фосфатно-сольовий буфер; пробірки Eppendorf; камера Горяєва; фільтрувальний папір; мікроскоп.

Вказівки до виконання роботи.

Лейкоцити – неоднорідна за складом група клітин, що відрізняються за походженням, морфологічними (розмір клітин, будова ядра, наявність цитоплазматичних гранул), цитохімічними та функціональними властивостями. Лейкоцити поділяють на 2 типи: для одних характерна зерниста цитоплазма (*гранулоцити*), для других – незерниста (*агранулоцити*).

До зернистих лейкоцитів належать три групи лейкоцитів, що відрізняються за забарвленням цитоплазматичних гранул. *Нейтрофіли* – лейкоцити діаметром 10-15 мкм, гранули яких при нейтральних значеннях рН не забарвлюються ні кислими, ні основними барвниками. У зв'язку з сегментованою будовою ядра зрілі нейтрофіли ще називають поліморфноядерними лейкоцитами. До незрілих форм нейтрофілів належать юні та паличко-ядерні клітини.

Цитоплазма нейтрофілів блідо-рожева, з нерівномірною зернистістю, забарвленою у рожево-синій або фіолетовий колір. Ядро темно-фіолетове паличковидне або сегментоване (2-5 сегментів).

Нейтрофіли – найчисельніша група лейкоцитів периферійної крові. Вони складають 48-78 % від загальної кількості лейкоцитів. Основна ефекторна функція нейтрофілів – фагоцитоз, який вони можуть здійснювати лише 1 раз, після чого гинуть. Разом із антитілами та системою комплементу вони виконують важливу роль у розвитку гострої захисної (запальної) реакції. Нейтрофіли містять гранули кількох типів: первинні гранули містять лізоцим, кислі гідролази та мієлопероксидазу; вторинні гранули містять лактоферин та антимікробні білки (дефензини, катіонні білки).

Еозинофіли – округлі клітини діаметром 12-17 мкм, містять великі гранули, що забарвлюються кислим барвником еозином. Цитоплазма цих лейкоцитів забарвлена у слабко-блакитний колір, погано помітний через виражену жовто-червону зернистість. Ядро пухке, широке, складається з 2-3 сегментів, забарвлене у фіолетовий колір.

Еозинофіли складають 1-4 % усіх лейкоцитів. Це спеціалізовані лейкоцити, здатні вражати позаклітинні паразити (гельмінти, шистосоми), які не піддаються фагоцитозу. Токсикогенність еозинофілів зумовлена реакцією дегрануляції: чисельні гранули, що містять токсичні речовини, зливаються з цитоплазматичною мембраною та їх вміст вивільняється у позаклітинне середовище. Окрім того, еозинофіли утворюють токсичні метаболіти кисню. Обидва механізми складають основу протигельмінтного імунітету.

На поверхні еозинофілів розташовані рецептори до IgE, тому вони беруть участь у реакціях антиген-антитіло і можуть пошкоджувати не лише чужорідні, але і клітини власного організму при алергічних реакціях. Кількість еозинофілів підвищується при імунізації, запальних і алергічних реакціях, аутоімунних захворюваннях.

Базофіли – клітини округлої чи овальної форми діаметром 8-12 мкм, гранули яких забарвлюються основними барвниками. Цитоплазма забарвлена у слабо-рожевий колір з крупними гранулами темно-фіолетового кольору. Ядро округле або нечіткої структури з 2-3 лопастями, забарвлене у фіолетово-рожеве забарвлення. Базофіли присутні у циркулюючій крові у дуже невеликих кількостях (0,2-0,5 % від загальної кількості лейкоцитів). Цитоплазма базофілів заповнена гранулами, що містять різноманітні медіатори та біологічно-активні речовини (гістамін, гепарин). При активації базофілів медіатори із гранул вивільнюються, посилюючи запальний процес, індукуючи розвиток анафілактичної реакції.

До *агранулоцитів* належать лімфоцити та моноцити.

Лімфоцити (21-35% від загальної кількості лейкоцитів) – округлі клітини діаметром 5-15 мкм з крупним, забарвленим у темно-фіолетовий колір ядром, і вузьким ободком блакитної чи синьої цитоплазми з поодинокими азуровими включеннями.

Моноцити (2-8% від загальної кількості лейкоцитів) – крупніші клітини (12-20 мкм), ядро бобовидної форми світло-фіолетового або бузкового кольору займає більшу частину цитоплазми. Протоплазма синювата, іноді містить дрібну азурофільну зернистість. З крові моноцити мігрують у тканини, де перетворюються у тканинні макрофаги.

Кількісний склад окремих видів лейкоцитів периферійної крові характеризує функціональний стан кровотворної системи.

Зміни можуть бути зумовлені захворюваннями системи крові або реакцією кровотворного апарату на розвиток різноманітних патологічних станів.

Для підрахунку лейкоцитарної формули готують мазки крові з наступним фарбуванням за Романовським-Гімза.

1. Для приготування мазка крові на сухе знежирене предметне скло, ближче до короткого боку, наносять піпеткою невелику краплю крові. Предметне скло слід тримати на столі або у лівій руці за вузькі краї. Правою рукою приставляють шліфувальне скло вузьким краєм до скла з кров'ю зліва від краплі під кутом 45^о та просовують його вправо до злиття з краплею крові. Після розділення крові по ребру шліфувального скла легким швидким рухом проводять його справа наліво до тих пір, поки не буде вичерпана вся крапля (*рис. 1*). Сформований мазок не повинен доходити 1,0-1,5 см до краю скла. Правильно виготовлений мазок тонкий, має жовтуватий колір та закінчується “щіточкою”.

2. Після приготування мазки швидко висушують на повітрі до зникнення вологого блиску. При повільному висушуванні може змінюватися морфологія клітин крові. Мазки крові фіксують етиловим спиртом протягом 5 хв.

3. Зафіксовані мазки зафарбовують протягом 20 хв за методом Романовського-Гімза. В основі методики лежить здатність суміші основних (азур II) і кислих барвників (водорозчинний жовтий еозин) зафарбовувати елементи клітин крові у різні кольори і відтінки. При фарбуванні за

Романовським-Гімза ядра клітин мають колір від темно-синього до фіолетового, цитоплазма зрілих гранулоцитів забарвлюється у рожевий колір, а цитоплазма лімфоцитів, моноцитів і бластних клітин – у синій. Після зафарбовування препарати крові промивають дистильованою водою і сушать на повітрі.

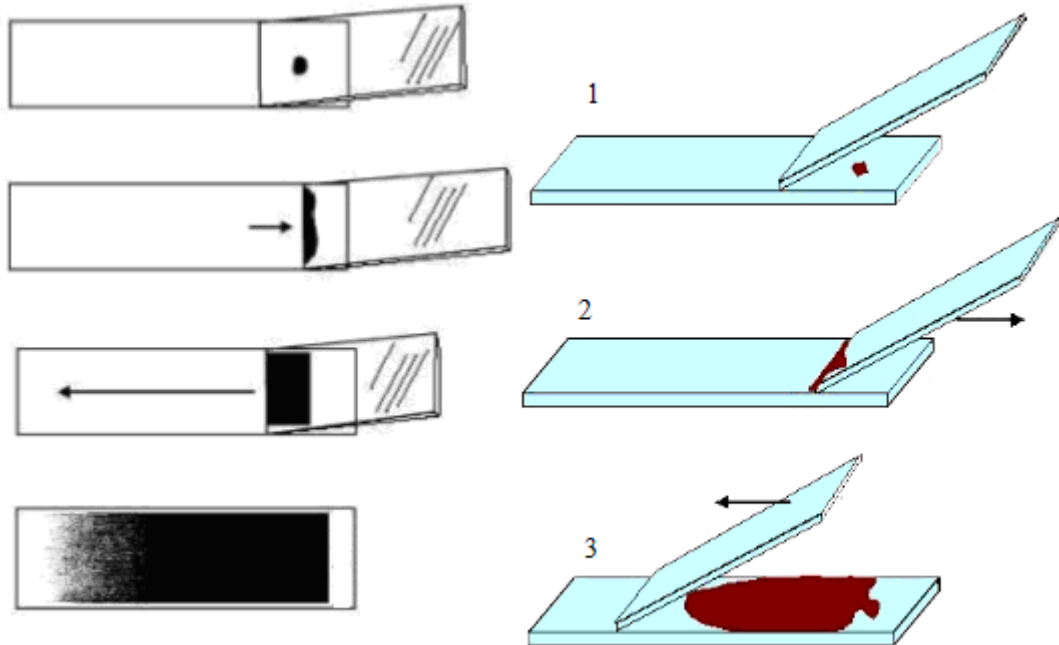


Рис. 1. Приготування мазка крові для визначення лейкоцитарної формули

4. Якісно зафарбований мазок розглядають під мікроскопом (окуляр×10, об'єктив×90), попередньо нанісши на скло краплю імерсійної олії.

Необхідно врахувати, що клітини крові розподіляються по мазку нерівномірно, тому для отримання достовірних даних при підрахунку лейкоцитарної формули прийнято рахувати лейкоцити в різних ділянках мазка крові. Для уникання повторного підрахунку одних і тих же лейкоцитів рекомендується рухатися по мазку крові зигзагами – лінією Меандра (рис. 2).

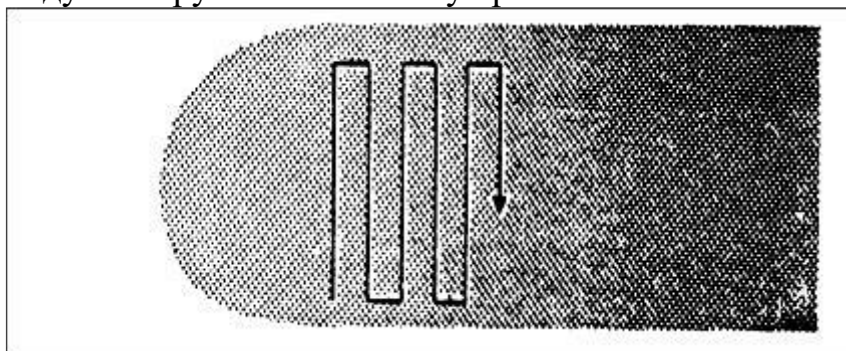


Рис. 2. Схема руху по мазку крові для підрахунку лейкоцитів

Починати підрахунок можна із середини зафарбованого мазку, рухаючи предметне скло зигзагами від центру до краю по всій поверхні мазку. Крупніші клітини розміщуються по краях препарату. Рахують усі підряд клітини (всього 200 клітин), розділяючи їх в окремі популяції з рахуванням величини клітин, форми і забарвлення ядра та цитоплазми.

Отримані результати реєструють за допомогою лейкоцитарного лічильника.

Визначають відсотковий вміст клітин різних популяцій у досліджуваному зразку.

Визначення життєздатності лімфоцитів.

Визначення життєздатності клітин проводять методом суправітального забарвлення 0,2%-м розчином трипанового синього. Життєздатність клітин розраховують як кількість життєздатних клітин, поділену на загальну кількість клітин у камері Горяєва. Клітини, забарвлені трипановим синім, вважаються нежиттєздатними. Цей барвник не проникає через мембрани живих клітин, але при їх пошкодженні здатний забарвлювати клітинне ядро.

1. На предметне скло нанести 1 краплю суспензії клітин і 1 краплю розчину трипанового синього.

2. Через 30-60 с забарвлену краплю накрити покривним склом. Надлишок суспензії видалити з використанням фільтрувального паперу.

3. Під мікроскопом (мале збільшення) підрахувати 100 клітин, враховуючи загальну кількість живих (незабарвлених) і загиблих (синіх) клітин (рис. 3).

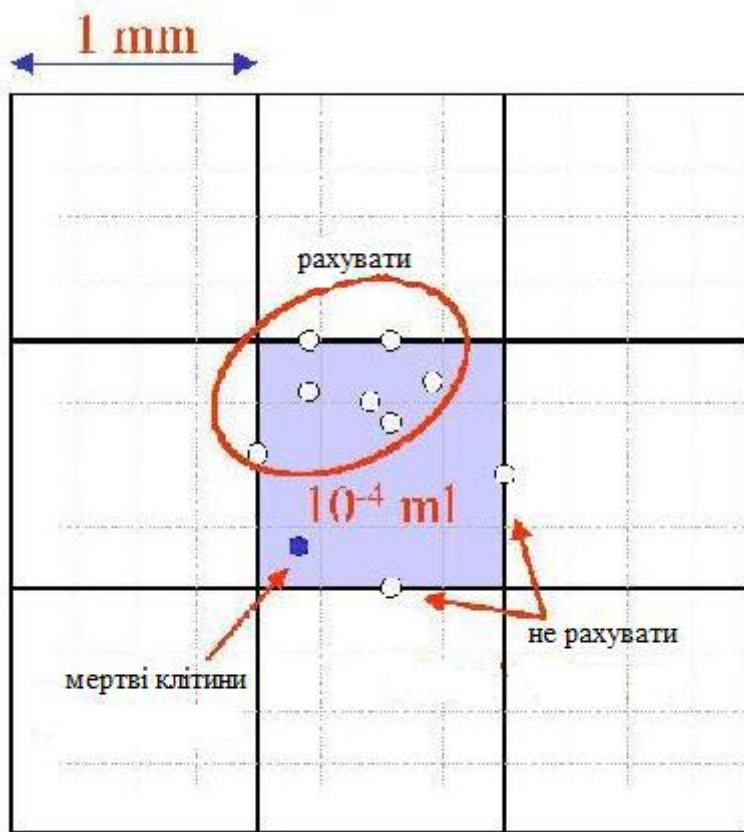


Рис. 3. Схема підрахунку життєздатних та нежиттєздатних лімфоцитів

4. Розрахувати життєздатність клітин за формулою:

$$\% \text{ життєздатних клітин} = [1 - (\text{кількість синіх клітин} + \text{загальна кількість клітин})] \times 100$$

Життєздатність клітин повинна бути не менше 95 %.

5. Для розрахунку кількості життєздатних клітин на 1 мл культури використайте формулу:

$$\text{Кількість життєздатних клітин} \times 10^4 \times 1,1 = \text{к-сть клітин/мл.}$$

Питання для самоконтролю.

1. Лейкоцити та їх групи.
2. Нейтрофіли.
3. Еозинофіли.
4. Базофіли.
5. Лімфоцити та моноцити.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

Вивчення антагонізму у мікробів. Антибіотики. Методи вивчення чутливості бактерій до антибіотиків.

Матеріали і обладнання: бактеріологічні чашки з середовищем Гаузе № 2; мікроб-антагоніст (бактерії роду *Bacillus*); тест-культури (*E. coli* та *St. aureus*); пробірки з стерильним фізіологічним розчином; бактеріологічні петлі; спиртівка; мікроскоп; предметні та покривні скельця.

Матеріали і обладнання: спиртівка; чашки Петрі з поживним середовищем АГВ; стерильні ватні тампони; диски з антибіотиками; 10 пробірок з 2 мл стерильного МПБ; антибіотик відомої концентрації; суспензія бактеріальної культури.

Вказівки до виконання роботи.

1. Вивчення антагоністичної активності бактерій методом перпендикулярних і радіальних штрихів та методом агарових блоків.

Найбільш поширеним методом виявлення антагоністичної активності на щільному поживному середовищі є **метод перпендикулярних штрихів**. Згідно цього методу поживне середовище розливають у чашки Петрі по 15-20 мл. На поверхню застиглому агару смугою засівають чисту культуру досліджуваного на антагоністичну активність штаму. Засіяні чашки поміщають в термостат при 37°C (середовище і умови вирощування можуть змінюватись в залежності від властивостей досліджуваних мікробів) і культивують 48 годин, після чого виконують підсів тест-мікробів перпендикулярно до смуги антагоністу. Для цього попередньо у фізіологічному розчині готують змив тест-бактерій згідно оптичного стандарту каламутності (500 млн. мікр.кл./1мл). Перпендикулярні смуги не мають стикатись з широкою смугою антагоніста, вони мають відступати від них на 1-2 мм. Чашки знову поміщають в термостат на добу, після чого проводиться облік результатів. Ріст чутливого мікроба відсувається від смужки антагоністу. Затримки росту тест-культур вимірюють в мм. Величина зон затримки росту може бути різною і досягати при виразній антагоністичній дії до 20 мм і більше. Крім того, дослідження антагоністичної

активності бактерій стосовно тест-мікробів проводять **методом радіальних штрихів**, при якому чисту культуру мікроорганізму, який досліджується на антагоністичну активність, засівають у центр чашки Петрі і вирощують при 37°C протягом 48 годин. Підсів тест-мікробів виконують радіально до центру чашки (рис. 1).

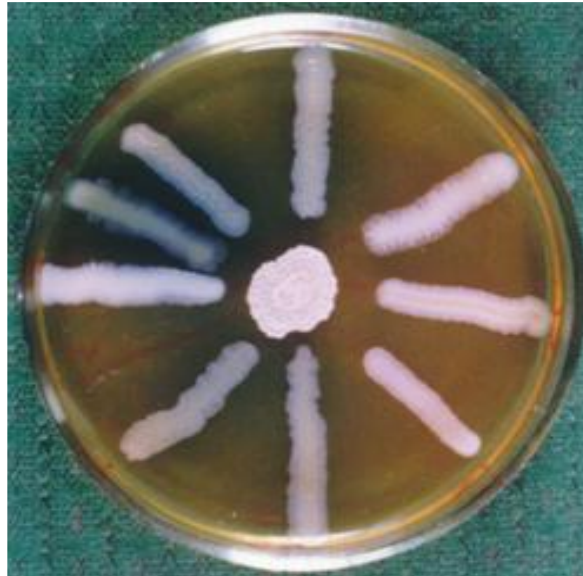


Рис. 1. Визначення антагоністичної активності бактерій методом радіальних штрихів

Метод агарових блоків. Досліджуваний мікроорганізм засівають “газоном” на поверхню агарової пластинки чашки Петрі. Після культивування вирізають агарові блоки діаметром 8 мм, які переносять на поверхню іншої агарової пластинки, попередньо засіяної одним тест-мікроорганізмом. На одну чашку Петрі можна розмістити 5-7 таких блоків. Чашки з блоками поміщають в термостат на 20-24 години. Якщо антибіотик, який синтезується та виділяється мікроорганізмом, пригнічує розвиток тест-мікроба, то навколо агарового блока утворюється зона відсутності росту.

Оформлення результатів:

Результати досліджень для кожного штаму-антагоністу оформити у вигляді таблиці:

Мікроб - антагоніст	
Тест-культура	Зона затримки росту тест-культури, мм

Методи вивчення чутливості бактерій до антибіотиків.

1. Диско-дифузійний метод визначення антибіотикочутливості.

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків слід визначати тільки у чистій культурі. Однак у ряді випадків для швидкого одержання орієнтовних даних про антибіотикограму бактерій використовують безпосередньо патологічний матеріал. Щільні субстрати (харкотиння, гній, кал та ін.) розтирають, рідини (сеча, екsudати та ін.) центрифугують, а для посіву використовують осад. Досліджуваний матеріал наносять на поверхню

поживного середовища петлею або ватним тампоном. Після одержання чистої культури дослідження повторюють. Для виготовлення інокулюму 5-10 однорідних колоній суспендують у 2 мл рідкого середовища або фізіологічного розчину. Бактеріальну суспензію (10³-10⁵ КУО/мл залежно від виду мікробів) в об'ємі 1 мл рівномірно розподіляють по поверхні середовища при похитуванні чашки, надлишок рідини видаляють піпеткою. Чашки підсушують при кімнатній температурі протягом 20-30 хв., а потім на однаковій відстані кладуть диски з антибіотиками (не більше 6) (рис. 2).

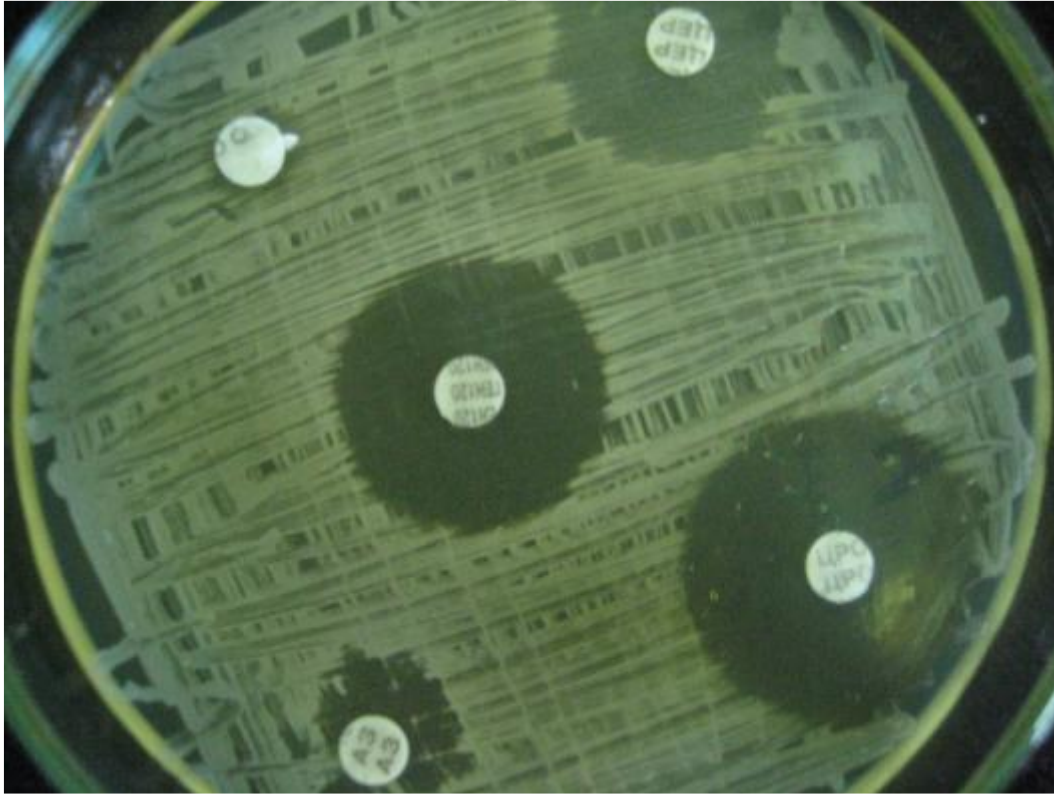


Рис. 2. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків диско-дифузійним методом

Рівномірність газону, яка визначається величиною посівної норми – найголовніший фактор одержання достовірних результатів і підлягає кількісній оцінці та якісній стандартизації. Результати враховують через 24 та 48 годин. Для контролю стандартності проведення досліджень у кожному досліді використовують тест-культури з відомою чутливістю до антибіотиків.

Оцінку результатів проводять за таблицею “Граничні значення діаметрів зон затримки росту і значення МПК антибіотиків для інтерпретації результатів” (табл. 1), яка містить граничні значення діаметрів росту для резистентних, помірно-резистентних та чутливих штамів, а також значення пригнічуючої (інгібуючої) концентрації (МПК, МІК) антибіотиків для стійких і чутливих штамів.

За своїм ступенем чутливості до антибіотиків мікроорганізми поділяються на три групи:

1 група – чутливі до антибіотиків (збудники знищуються в організмі при використанні звичайних терапевтичних доз препаратів), зона затримки росту 20 мм і більше;

2 група – помірно-резистентні (для них лікувальний ефект може бути досягнутий при використанні максимальних терапевтичних доз препаратів), зона затримки росту 15-10 мм;

3 група – резистентні (бактерицидних концентрацій препаратів в організмі створити не можливо, тому що вони будуть токсичними), зона затримки росту до 15 мм.

Таблиця 1

Граничні значення діаметрів зон затримки росту і значення МПК
антибіотиків для інтерпретації результатів

Антибіотики	Вміст антибіотика в диску, мкг	Код диску	Діаметри зон для середовища, АГВ, мм			МПК, мкг/мл	
			Стійкі	Помірковані	Чутливі	Стійкі	Чутливі
Бензилпеніцилін: при дослідженні стафілококів при дослідженні інших мікробів	6	ПЕН	≤ 20	21-28	≥ 29	–	≤ 0,1
			≤ 10	11-16	≥ 17	–	≤ 1,5
Ампіцилін: при дослідженні стафілококів синьогнійної палички	10	АМП	≤ 20	21-28	≥ 29	–	≤ 0,2
			≤ 9	10-13	≥ 14	≥ 32	≤ 8
Метилцилін	10	МЕТ	≤ 13	14-18	≥ 19	–	≤ 3
Оксацилін	10	ОКС	≤ 15	16-19	≥ 20	–	≤ 3
Цефалексин	30	ЦФЛ	–	–	–	≥ 32	≤ 10
Цефалотин	30	ЦФТ	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 32	≤ 10
Стрептоміцин	30	СТР	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 15	≤ 6
Неоміцин	30	НЕО	≤ 12	13-16	≥ 17	–	≤ 10
Канаміцин	30	КАН	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 25	≤ 6
Мономіцин	30	МОН	≤ 13	14-17	≥ 18	–	≤ 10
Гентаміцин	10	ГЕН	≤ 15	–	≥ 16	6	≤ 4
Сизоміцин	10	СИЗ	–	–	–	≥ 6	≤ 4
Тетрациклін	30	ТЕТ	≤ 16	17-21	≥ 22	≥ 12	≤ 2
Доксициклін	10	ДОК	–	–	–	≥ 12	≤ 2
Еритроміцин	15	ЕРИ	≤ 17	18-21	≥ 22	≥ 8	≤ 2
Олеандоміцин	15	ОЛЕ	≤ 16	17-20	≥ 21	≥ 8	≤ 2
Лінкоміцин	15	ЛІН	≤ 19	20-23	≥ 24	≥ 8	≤ 2
Левоміцетин	30	ЛЕВ	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 16	≤ 8
Рифампіцин	5	РІФ	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 8	≤ 2
Фузидин	10	ФУЗ	–	–	–	≥ 16	≤ 2
Поліміксин	300 ОД	ПОЛ	≤ 11	12-14	≥ 15	≥ 50 ОД/мл	–

Ристоміцин	30	РІС	≤ 9	10-11	≥ 12	–	≤ 5
------------	----	-----	----------	-------	-----------	---	----------

2. Вивчення антибіотикочутливості бактерій методом серійних розведень.

Показаннями для визначення антибіотикочутливості за методом серійних розведень є необхідність одержання кількісних даних (переважно при тяжкому перебігу інфекційних процесів) для проведення регульованої антибіотикотерапії.

Встановлення ступеня чутливості мікробів до антибактеріальних препаратів впливає на вибір антибіотика (наприклад, відмова від ліків з високою токсичністю при помірному ступені чутливості збудника до них), його дозування (концентрація антибіотика в крові повинна в 2-3 рази перевищувати його мінімальну пригнічуючу концентрацію по відношенню до збудника) і режим введення. Крім того, її кількісне визначення необхідне також для встановлення бактерицидної дії обраного препарату (як гарантії швидкого терапевтичного ефекту та безрецидивного перебігу) по відношенню до даного збудника.

Для визначення антибіотикочутливості за методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі готують пробірки (8-10 і більше) з двократними послідовними розведеннями препарату (*табл. 2*). Середовище попередньо розливають у пробірки по 2 мл. У першу додають 2 мл розчину антибіотика певної концентрації, перемішують і переносять до наступної пробірки, продовжуючи розведення до передостанньої, з якої видаляють 2 мл суміші. Остання пробірка служить контролем росту культури. У тому ж бульйоні, який використовують для розведення антибіотиків, готують суспензію добової агарової або бульйонної культури бактерій з розрахунку 10^5 - 10^6 мікробних тіл в 1 мл залежно від виду збудника. Потім до кожної пробірки з розведеннями, а також до контрольної додають по 0,2 мл виготовленої суспензії. При визначенні чутливості до пеніцилінів пеніциліназоутворюючих стафілококів рекомендують використовувати одночасно велике й мале мікробне навантаження (100, 100000 та вище мікробних тіл в 1 мл). Залежно від посівної дози значення МПК препарату може коливатись: при збільшенні дози чутливість знижується за рахунок зростання кількості пеніцилінази, що утворюється в середовищі.

Пробірки інкубують у термостаті при 37°C протягом 18-24 год. Результати враховують, визначаючи наявність або відсутність росту в середовищі з різними розведеннями препарату. Остання пробірка, в якій спостерігають затримку росту культури (прозорий бульйон), відповідає МПК (мінімальній пригнічуючій концентрації) або МБСК (мінімальній бактериостатичній концентрації) препарату відносно даного мікроба і вказує на ступінь його чутливості. Якщо ознаки росту з'являються в усіх пробірках, досліджуваний штам резистентний до максимальної концентрації препарату, яку було взято у дослід. Відсутність росту бактерій в усіх пробірках, крім контрольної, свідчить, що МПК препарату нижча, ніж та, що використовується в досліді.

Таблиця 2

**Схема визначення антибіотикочутливості
методом серійних розведень**

Компоненти, мл	Пробірки								Контроль		
	1	2	3	4	5	6	7	8	бактерій	антибіотика	
	МПБ	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Пеніцилін, 100 Од/мл	2,0	→	→	→	→	→	→	→	↑	–	2,0
Концентрація антибіотика, Од/мл	50	25	12,5	6,3	3,2	1,6	0,8	0,4	0,4	–	50
Суспензія бактерій, 10 ⁵ /мл	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	–
Інкубація в термостаті при 37 ⁰ С 18-24 год.											
Результат											

Для визначення бактерицидного ефекту антибіотика з декількох останніх пробірок, в яких немає ознак росту, роблять висів на сектори агару в чашках Петрі. Через 24-48 год. інкубації при оптимальній температурі відмічають ту найменшу концентрацію препарату в пробірці, посів з якої не дав росту, її вважають мінімальною бактерицидною концентрацією (МБЦК).

Оформлення результатів:

Отримані результати оформити у вигляді таблиці для кожної досліджуваної культури:

Антибіотик	Код диску	Діаметри зон для середовища АГВ, мм	Висновок про ступінь чутливості	МПК, мкг/мл

Питання для самоконтролю.

1. Визначте, який тип симбіозу наведений у прикладі.

Клітковина розкладається спеціалізованими групами мікроорганізмів – грибами, актиноміцетами, бактеріями *Cellulomonas*, *Cellvibrio*. В процесі засвоєння целюлози цими мікроорганізмами вона перетворюється в целобіозу. Інші види мікроорганізмів викликають подальший гідроліз целобіози з утворенням глюкози, яка є універсальним джерелом енергії і використовується більшістю мікроорганізмів.

2. Які методи застосовують для визначення антагоністичної активності бактерій?

3. Як провести вивчення анатагоністичної активності бактерій методом перпендикулярних шрихів?

4. Яким вимогам повинні відповідати поживні середовища для визначення антибіотикочутливості?

5. З якою метою проводиться оцінка антибіотикочутливості мікроорганізмів?

6. Які переваги методу серійних розведень над визначенням антибіотикочутливості диско-дифузійним методом?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

Отримання лейкоконцентрату методом спонтанного осадження еритроцитів розчином желатину (мікрометод). Отримання лімфоцентрату в градієнті щільності фікол-верографіну.

Матеріали і обладнання: 3%-й розчин желатину; центрифужні пробірки; розчин Хенкса.

Матеріали і обладнання: фікол-400; 76% розчин верографіну; фосфатно-сольовий буфер (ФСБ); розчин Хенкса; скляні пробірки; камера Горяєва.

Вказівки до виконання роботи.

Для виділення лейкоцитів чи окремих субпопуляцій імуніцитів з метою подальшого вивчення їх функціональної активності використовують ряд методів. Ідеальні методи розділення лейкоцитів характеризуються незначною втратою клітин за умови одночасного збереження фізіологічної активності виділених клітин. В основі методів виділення лейкоцитів лежать два принципи:

1. Розділення клітин за їх фізичними властивостями (розміри, щільність, заряд).

2. Розділення клітин за поверхневими антигенами.

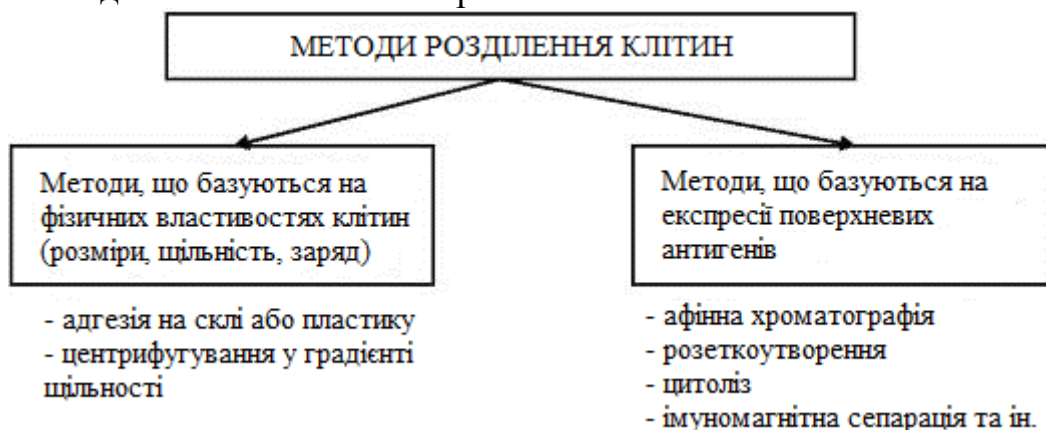


Рис. 1. Основні методи розділення лейкоцитів

Метод отримання лейкоконцентрату з використанням желатину застосовують при достатній (3-5 мл) кількості крові для аналізу. Цей метод дозволяє виділити усі лейкоцити периферійної крові (і мононуклеари (лімфоцити і моноцити), і гранулоцити (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли)).

1. Кров об'ємом 3-5 мл вносять у пробірки з гепарином (25 од/мл) або трилоном Б (1 мл 2,7%-го розчину трилону Б на 10 мл крові).
2. Для одержання лейкоконцентрату до взятої крові додають 3 % розчин желатину у співвідношенні 1:5.
3. Кров перемішують і витримують на водяній бані при +37 °С 20-30 хвилин для осадження еритроцитів. За дії желатину еритроцити склеюються у «монетні стовпці» і швидко осідають.
4. Після осідання еритроцитів плазму з лейкоцитами переносять у сухі чисті пробірки і центрифугують 10 хвилин при 1500 об/хв.
5. Надосадову рідину виділяють, осад розбавляють 0,5-1,0 мл середовища 199 або розчину Хенкса.
6. Отримані лейкоцити використовують для подальшого дослідження.

Отримання лімфоцентрату в градієнті щільності фікол-верографіну.

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

У якості градієнта щільності для розділення клітин крові можна використовувати комерційний препарат Фікол-400 або суміш фіколу з рентгеноконтрастними речовинами з високою щільністю (урографін, верографін або ізопак).

Фікол – це синтетичний сополімер сахарози і епіхлоргідрину. В імунологічних дослідженнях використовують 6,1 % або 9%-і розчини фіколу з молекулярною масою 400 кДа. Для приготування розчину фіколу його розчиняють у теплій дистильованій воді.

Приготування градієнту щільності фікол-верографін

1. Підготовка фіколу – 4,32 г порошку фікол-400 розчиняють в 48 мл дистильованої води.
2. Підготовка верографіну – 10,14 мл 76% розчину верографіну доводять дистильованою водою до 21 мл.
3. Підготовка градієнту щільності – розчини фіколу-400 і верографіну змішують. За допомогою аерометру вимірюють щільність отриманого розчину,

що повинна складати 1,077 г/мл. Якщо щільність вища, ніж потрібно, то додають розчин фіколу-400, якщо нижча – розчин верографіну. Градієнт щільності можна зберігати протягом 30 діб при +4°C у посуді із оранжевого скла.

При відсутності фіколу-400 градієнт щільності можна приготувати лише із одного верографіну. З цією метою 10 мл 76% верографіну змішати з 43,1 мл дистильованої води і додати 0,45 мл фосфатно-сольового буфера. Отриманий розчин верографіну має щільність 1,077 г/мл і може бути використаний як градієнт щільності.

Отримання лімфоцентрату.

1. Отриманий зразок крові розводять у співвідношенні 1:3 розчином Хенкса без Ca^{2+} і Mg^{2+} або ФСБ.

2. Розведenu кров (3 мл) обережно нашаровують на 3 мл розчину фікол-верографіну з щільністю 1,077 г/мл. При цьому межа розділення фаз кров/градієнт не повинна бути порушена.

3. Врівноважені пробірки центрифугують протягом 35-40 хвилин при прискоренні 400 g.

4. У результаті центрифугування кров розділяється на 4 окремі фракції: перша фракція на дні пробірки містить еритроцити і уламки клітин крові; друга фракція – це розчин фікол-верографіну; третя фракція, розміщена над градієнтом, утворена суспензією лімфоїдних клітин; четверта фракція утворена плазмою з еритроцитами.

Відбирають 2/3 (по висоті над фазою) рідини, а залишену 1/3 збирають разом з кільцем мононуклеарних клітин.

5. Зібрану суспензію переносять до центрифужної пробірки, додають надлишок (6-8 мл) розчину Хенкса без Ca^{2+} і Mg^{2+} або ФСБ і проводять два послідовних центрифугування (10 хвилин при 1500 об/хв) зі зміною відмиваючого розчину.

6. Отриманий осад ресуспензують у 0,5 мл розчину Хенкса і підраховують кількість мононуклеарних клітин за допомогою камери Горяєва.

7. Для подальших досліджень використовують суспензії виділених клітин з 95-98 % життєздатності.

8. Позначте на рисунку отримані фракції (позначені цифрами).

Питання для самоконтролю.

1. Основні методи виділення лейкоцитів.
2. Способи відділення чистої популяції лімфоцитів.
3. Отримання лімфо концентрату.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Волощук О. М. Імунологія: навчально-методичний посібник. Чернівці: Чернівецький національний університет, 2021. 128 с.
2. Широбоков В. П., Климнюк С. І., Понятовський В. А., Бобир В. В., Виноград Н. О., Войцеховський В. Г., Галкін О. Ю. та ін. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищих мед. навч. закладів. За ред. В. П. Широбокова. Вінниця: Нова Книга, 2021. 920 с.
3. Майкл Р. Барер, Вілл Ірвінг, Ендрю Свонк, Нелюм Перери. Медична мікробіологія. Посібник з мікробних інфекцій: патогенез, імунітет, лабораторна діагностика та контроль: переклад 19-го англ. видання: у 2 т. Т.1. За ред. Майкла Р. Барера, Вілла Ірвінга, Ендрю Свонка, Нелюм Перери. Наук. ред. пер. Сергій Климнюк, Валерій Мінухін, Сергій Похил. К.: ВСВ «Медицина», 2020. 434 с.
4. Климнюк С. І., Ситник І. О., Творко М. С., Широбоков В. П. Практична мікробіологія. Тернопіль, Укрмедкнига, 2020. 440 с.