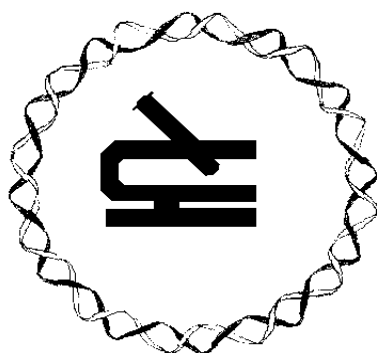


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

**СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ
БАКТЕРІАЛЬНИХ
ТА ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ**

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДО ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ З КУРСУ «ІМУНОЛОГІЯ»



ОДЕСА
ОНУ
2018

УДК 577.27.083.33(072)

С329

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

Рецензенти:

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

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

Серологічні методи діагностики бактеріальних та вірусних
С329 інфекцій : метод. вказівки до проведення лаб. занять з курсу
«Імунологія» / Т. В. Гудзенко, О. Ю. Зінченко, М. Б. Галкін,
Г. І. Жумінська, Т. В. Іваниця. – *Одеса : Одес. нац. ун-т ім
І. І. Мечникова*, 2018. – 42 с.

Методичні вказівки до проведення лабораторних занять присвячені розгляду основних методів серологічної діагностики бактеріальних та вірусних інфекцій. Вони містять детальні плани організації лабораторних занять студентів для ознайомлення їх з основними методами діагностичної імунології.

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

УДК 577.27.083.33(072)

ЗМІСТ

Список скорочень	4
Вступ	5
Правила роботи в лабораторії	6
Заняття 1. Приготування корпускулярних антигенів кишкової палички	6
Заняття 2. Реакція аглютинації (РА)	10
Заняття 3. Реакція непрямой (пасивной) гемаглютинації РНГА (РПГП)	14
Заняття 4. Реакція гемаглютинації (РГА)	17
Заняття 5. Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА)	20
Заняття 6. Реакція зв'язування комплементу (РЗК)	22
Заняття 7. Реакція преципітації	28
Заняття 8. Імуноферментний аналіз	31
Контрольні питання	39
Список рекомендованої літератури	40

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

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

ВСТУП

Імунологія - не тільки теоретичний, але й суто практичний розділ біології та медицини. На основі дослідження імунологічних закономірностей формується серологічна діагностика, розробляються засоби специфічної профілактики та терапії інфекційних захворювань (вакцини та сироватки), здійснюється переливання крові, трансплантація органів, тканин та багато інших лікувальних заходів клінічної та практичної медицини.

Реакції імунітету, тобто реакції взаємодії антигену (АГ) та відповідного йому антитіла (АТ), завдяки високій специфічності та чутливості знайшли широке застосування у діагностиці інфекційних захворювань та в наукових медико-біологічних дослідженнях. У реакціях імунітету як АТ обов'язково беруть участь сироватка хворої людини або імунізованої тварини, тому вони мають назву серологічних (від латинського "serum" - сироватка). Серологічні реакції мають застосування у двох випадках:

1. Для виявлення АТ у сироватці хворого, тобто з метою серодіагностики інфекцій. Так для виявлення АТ у сироватці хворого беруть відомі культури мікроорганізмів-збудників інфекційних захворювань (часто використовують отримані на виробництві АГ-діагностикуми. Якщо сироватка хворого реагує з певними АГ, значить вона містить відповідні АТ і можна зробити висновок, що даний мікроорганізм є збудником захворювання у обстежуваного хворого.

2. Для визначення виду, типу АГ, наприклад мікоплазм, тобто з метою ідентифікації збудника хвороби. При цьому невідомий компонент визначають по відомому. З метою ідентифікації (визначення виду, типу АГ) мікроорганізмів використовують імунні діагностичні сироватки. Позитивний результат реакції свідчить про те, що вилучений збудник захворювання ідентичний тому, котрим імунізували тварину для отримання діагностичної сироватки.

Широке запровадження імунологічних методів дослідження в різні області біології та медицини потребує підготовки висококваліфікованих спеціалістів. Задача малого практикуму з імунології - допомогти студентам опанувати сучасні імунологічні методи, відпрацювати методичні навички, поглибити їх та закріпити отримані знання.

Мета занять: ознайомити студентів із застосуванням імунологічних методів для діагностики інфекційних захворювань та навчити постановці серологічних реакцій, що мають широке застосування у лабораторній практиці.

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

Правила роботи в лабораторії

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

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

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

ЗАНЯТТЯ 1. Приготування корпускулярних антигенів кишкової палички

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

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

а) корпускулярні антигени:

- як індуктори алергічної реакції;
- в серологічному аналізі при виявленні антитіл в сироватках людей та тварин;
- як вакцини для профілактики ряду інфекційних захворювань;
- для вивчення закономірностей формування імунної відповіді;

б) розчинні антигени:

- у діагностиці відторгнення трансплантанта, аутосенсibiliзації, як специфічний антиген використовують тканинні екстракти;
- у діагностиці, терапії та профілактиці злоякісних новоутворень;
- створення багатокомпонентних молекулярних вакцин;

Принципи приготування корпускулярних антигенів

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

Інактивацію проводять:

а) фізичними методами:

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

- дією ультразвуку;

- опроміненням ультрафіолетовим промінням;

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

б) хімічними методами:

- дією формаліну, спирту, ацетону, фенолу тощо.

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

При цьому використовують такі методи:

- підрахунок під мікроскопом в лічильній камері: еритроцитів, лейкоцитів, лімфоцитів, дріжджів, одноклітинних водоростей, бактерій та інших мікроорганізмів більших розмірів;

- висів бактеріальної суспензії на тужаві живильні середовища;

- визначення за оптичною густиною бактеріальної суспензії спектрофотометрією з наступним висівом на тужаві живильні середовища. Для визначення залежності оптичної густини від кількості бактерій будують калібрувальну криву.

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

Принцип методу приготування розчинних антигенів

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

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

Найчастіше клітини руйнують:

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

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

- диференційне для частинок з різною масою;
- зональне для частинок різної маси і форми, але з однаковою низькою густиною, наприклад, субодиниці рибосом;
- метод врівноваженого центрифугування в градієнті густини сахарози, солей винної кислоти або хлориду цезія для частинок одного типу, але дуже різних за розміром. Наприклад, розподіл фракції мембран.

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

- вибірково осадження важкими металами;
- гельфільтрацією;
- електрофорезом;
- афінною хроматографією.

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

Умови приготування корпускулярного антигена кишкової палички:

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

Практичне завдання: Приготувати корпускулярний антиген кишкової палички.

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

Методика приготування корпускулярного антигена кишкової палички включає наступні етапи:

I. Приготування бактеріальної суспензії

1. Налити 5 мл NaCl в пробірку (А) з добовою агаровою культурою *E. coli*;
2. Обережно крутити пробірку (А) між долонями до відокремлення мікробної маси, або використати для цього мікробіологічну петлю;
3. Перевірити чистоту бактеріальної суспензії, досліджуючи під мікроскопом морфологічні та тінкторіальні властивості;

4. Перенести бактеріальну суспензію в центрифужну пробірку (Б) стерильною пастерівською піпеткою;
5. Закрити стерильною гумовою пробкою центрифужну пробірку (Б);
6. Тричі відмити клітини розчином NaCl, центрифугуючи при 5000 об/хв. протягом 30 хв.

II. Стандартизація антигену

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

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

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

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

$$1 \text{ мл} - 16 \times 10^9 \text{ клітин};$$

$$x \text{ мл} - 25 \times 10^9 \text{ клітин};$$

$$x = 1,56 \text{ мл}$$

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

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

III. Інактивація антигену

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

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

Відсутність росту свідчить про інактивацію антигену.

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

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

Наприклад: О-антиген *E. coli*

інактивований 100 °С

5 мл (5×10^9 кл/мл)

IV курс 7 група

Т.Н. Іванова

12.09.2018 р.

Зберігають антиген в холодильнику при 4 °С.

Матеріали та обладнання:

1. Добова агарова культура *Escherihia coli* штам М-17.
2. Бактеріальні стандарти мутності: №9, №10, №11.
3. МПБ в пробірках по 5 мл.
4. Фізіологічний розчин (0,85 %).
5. Стерильні хімічні пробірки.
6. Пастеровські піпетки.
7. Піпетки градуйовані (1 і 5 мл).
8. Скляні ампули (10 мл).
9. Лейкопластир.
10. Ножиці.
11. Металевий штатив для пробірок.
12. Мікробіологічна петля.
13. Спиртівка.
14. Предметні скельця.
15. Набір реактивів для забарвлення за методом Грама.
16. Мікроскоп.
17. Водяна баня.
18. Центрифужні пробірки.
19. Стерильні гумові пробки № 14,5.
20. Центрифуга.

ЗАНЯТТЯ 2. Реакція аглютинації (РА)

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

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

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

- в медицині для діагностики багатьох інфекційних захворювань:

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

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

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

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

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

Реакція аглютинації протікає у 2 фази:

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

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

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

Умови проведення реакції аглютинації:

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

2) наявність електроліту - фізіологічного розчину.

Практичне завдання: Провести діагностику бруцельозу.

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

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

Платівкова реакція аглютинації Хедлсона

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

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

Таблиця 1

Схема постановки реакції Хедлсона

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

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

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

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

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

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

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

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

Для діагностичної оцінки результатів використовують таку схему:

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

Пробіркова об'ємна розгорнута реакція Райта

Призначення: для серологічної діагностики бруцельозу та визначення титру аглютининів до бруцел.

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

У штативі поставити ряд чистих аглютинаційних або звичайних пробірок, на кожній з них восковим олівцем написати ступінь розведення (від 1:100 до 1:3200), на двох останніх - відмітити контроль сироватки (КС) та контроль АГ (КАГ) (табл. 2).

Таблиця 2

Схема постановки розгорнутої реакції аглютинації Райта

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

→↓ - напрям титрування

В усі пробірки, окрім № 7, розлити по 1 мл фізіологічного розчину.

З основного розбавлення сироватки (1:50) методом перекатки приготувати ряд послідовних (кратних двом) розбавлень від 1:100 до 1:3200 в аглютинаційних пробірках, встановлених у штативі. Для цього у першу пробірку наливають 1 мл основного розбавлення сироватки (1:50), після ретельного струшування вмісту, 1 мл переносять у 2-у пробірку, потім у 3-ю і т.д. З 6-ої пробірки 1 мл видаляють (у банку з дезрозчином) для збереження однакового об'єму. У 7-у пробірку (КС) вносять 1 мл основного розбавлення сироватки (1:50). Додають по дві краплі бруцельозного діагностикуму у кожен пробірку з розбавленням сироватки (з 1 по 6) та у 8-у пробірку (КАГ). Штатив з пробірками енергійно струшують і ставлять у термостат при 37 °С на 18-20 годин.

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

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

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

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

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

Матеріали та обладнання:

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

ЗАНЯТТЯ 3. Реакція непрямой (пасивної) гемаглютинації РНГА (РПГА)

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

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

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

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

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

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

Принцип методу. Феномен непрямой (пасивної) гемаглютинації ґрунтується на склеюванні - аглютинації навантажених антигеном еритроцитів сироватками, що мають специфічні антитіла до антигену (рис. 2).

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

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

Умови проведення реакції непрямої (пасивної) гемаглютинації:

- 1) для титрування специфічних АТ до бруцел необхідна досліджувана сироватка від хворого з підозрою на бруцельоз;
- 2) використовують суспензію стандартного еритроцитарного діагностикума у концентрації 2,5 %, до складу якого входять формалінізовані еритроцити барана, сенсibiliзовані ліпополісахаридом з *Brucella abortus*;
- 3) температура 37 °С;
- 4) наявність електроліту - 0,85 % розчин NaCl.

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

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

Методика постановки реакції непрямої (пасивної) гемаглютинації

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

Приготування еритроцитарного діагностикуму

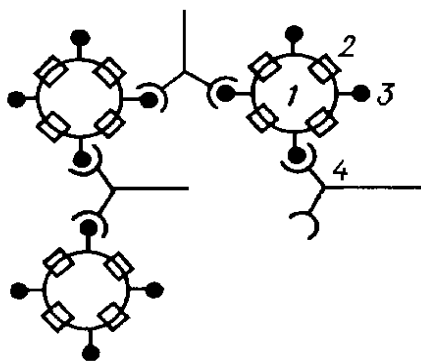


Рис. 1. Схема реакції непрямої (пасивної) гемаглютинації

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

Для постановки реакції частіше використовують еритроцити барана або людини групи О. Рекомендовано використовувати формалінізовані еритроцити, так як вони не лізуються у присутності таніну і при адсорбції антигену. Оброблені таким чином еритроцити отримують при змішуванні рівних об'ємів суспензії еритроцитів (2,5 %) та розчину таніну (1:20000). Контакт 10-15 хв. при Т 37 °С.

Потім суміш центрифугують, видаляють осад фосфатним буфером рН 7,2. Відмиті еритроцити розводять фізіологічним розчином до концентрації 2,5% і змішують з антигеном (1:2). Витримують 15 хв. при кімнатній температурі, далі центрифугують, осад еритроцитів тричі відмивають фізіологічним розчином або фізіологічним розчином з нормальною сироваткою кроля в розбавленні 1:250. У промисловому виробництві еритроцитарний діагностикум ліофілізують.

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

Підготовка досліджуваної сироватки:

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

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

Методика постановки реакції:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

титр сироватки 1:50 - реакція слабо позитивна;

титр сироватки 1:100 і вище - позитивна.

Таблиця 3

Схема постановки РНГА (РПГА)

Інгредієнт	Доза реагентів, мл								
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	К зр.
Фізіологічний розчин, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сироватка, мл	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 ↓	-
Еритроцитарний діагностикум, мл*	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Облік результатів	++++	++++	+++	+++	++	++	+	+	-

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

→↓ - напрям титрування

Матеріали та обладнання:

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

ЗАНЯТТЯ 4. Реакція гемаглютинації (РГА)

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

У 1941 р. Хьорст та незалежно від нього Мак Кліленд та Хейр помітили, що вірус грипу склеює (аглютинує) еритроцити курей. Потім це явище було підтверджено багатьма лабораторіями. Було встановлено, що вірус грипу аглютинує не тільки еритроцити курей, але й інших видів птахів та ссавців (качок,

голубів, чайок, морських свинок, собак тощо). Виявилось також, що гемаглютинуючі властивості мають багато інших вірусів: осповакцини, енцефаломієліту пацюків, ящура, паротиту, поліоми тощо аглютинують еритроцити. Реакція вірусної гемаглютинації (РГА) не відноситься до чітких імунно-серологічних реакцій, хоча природна комплементарність компонентів, які беруть участь у ній (вірусів та еритроцитів) багато у чому нагадує специфічність імунологічних реакцій.

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

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

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

Умови проведення реакції гемаглютинації:

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

Практичне завдання: Провести лабораторну діагностику грипу.

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

Методика постановки реакції гемаглютинації:

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

Для приготування 1% суспензії еритроцитів використовують метод дефібринування: кров з вени крила курки забирають у стерильну банку (бажано з притертою пробкою), у котрій є скляне намисто, що покриває дно банки у 2 шари. Після забору крові банку закривають і безперервно струшують до повного зсідання крові (приблизно 15-20 хв.). Охолоджену дефібриновану кров переливають у центрифужні пробірки. Центрифугують 10 хв. при 2000 об/хв. Осад 3-4 рази промивають фізіологічним розчином, щоразу еритроцити осаджують центрифугуванням (режим зазначено вище). Для приготування 1% суспензії еритроцитів на кожен мілілітр компактного осаду відмитих еритроцитів додають 99 мл фізіологічного розчину. До використання суспензію зберігають у холодильнику.

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

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

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

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

Таблиця 4

Схема титрування вірусу в реакції гемаглютинації

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

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

→↓ - напрям титрування

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

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

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

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

Матеріали та обладнання:

1. Досліджуваний біоматеріал: алантоїсна або хоріоалантоїсна рідина, що містить вірус.
2. Фізіологічний розчин.
3. Кров куряча або людини (О-група).
4. Пластмасові планшети для постановки серологічних реакцій.

5. Піпетки градуйовані (1мл).
6. Скляна стерильна банка з притертою пробкою та скляним намистом.
7. Центрифужні пробірки.
8. Центрифуга.

ЗАНЯТТЯ № 5. Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА)

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

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

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

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

Умови проведення реакції гальмування гемаглютинації.

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

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

Практичне завдання:

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

Методика постановки реакції.

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

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

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

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

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

Схема постановки РГГА

Інгредієнти	Розбавлення сироватки						КС	КВ	К ер.
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320			
Фіз. р-н	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4
Сироватка діагност. (1:10)	0,2	0,2→	0,2→	0,2→	0,2→	0,2↓	0,2	-	-
Вірус (4АО)*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2	-
1% суспензія еритроцитів	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Облік результатів	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-	-

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

→↓ - напрям титрування

Для перевірки специфічності гальмування гемаглютинуючих властивостей вірусу ставлять три контролю:

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

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

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

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

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

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

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

Матеріали та обладнання:

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

ЗАНЯТТЯ 6. Реакція зв'язування комплементу (РЗК)

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

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

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

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

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

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

Умови проведення реакції зв'язування комплементу.

Для постановки РЗК необхідні такі інгредієнти:

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

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

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

Методика постановки реакції зв'язування комплексу

Досліджуваним матеріалом є сироватка крові.

Схема проведення РЗК передбачає постановку ряду дослідів у наступному порядку: титрування і визначення робочої дози гемолітичної сироватки; титрування і визначення робочої дози комплексу; титрування імунної сироватки на антикомплементаРНість; основний дослід РЗК.

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

Кров відбирають у велику колбу з намістом. Колбу з кров'ю струшують протягом 5-6 хв. для дефібринування крові з метою попередження зсідання, після чого і центрифугують при 1500-2000 об/хв. протягом 10 хв. Супернатант (плазму) відбирають, а осад еритроцитів промивають 2-3 рази з п'яти об'ємами фізрозчину.

В реакції застосовуються 3% суспензія еритроцитів, яку готують з осаду відмитих еритроцитів (1 мл еритроцитів суспендують у 33 мл фізрозчину).

Титрування гемолітичної сироватки. Її отримують шляхом 3-4 кратної внутрішньовенної імунізації кроликів 50% суспензією еритроцитів барана у кількості 2-5 мл з проміжками 2-3 дні.

Отриману сироватку прогрівають при 56 °С протягом 30 хв., для консервації додають до 0,5 % сухої борної кислоти, титрують, розливають у ампули і зберігають у холодильнику при 4 °С. Сухі препарати гемолітичної сироватки розводять стерильним фізрозчином згідно з інструкцією.

Титрування роблять для отримання нової серії сироватки, а також з метою контролю її придатності при довготерміновому зберіганні - 1 раз на 3-4 місяці. Для визначення титру гемолітичної сироватки (гемолізіну) ставлять реакцію гемолізу з розбавленнями сироватки, що зменшуються, та комплексом, взятим у розбавленні 1:10 (табл. 6,7).

Таблиця 6

Схема розбавлення гемолітичної сироватки

Інгредієнт	Розбавлення сироватки							
	1:100	1:400	1:800	1:1000	1:1200	1:1500	1:1800	1:2100
Гемолітична сироватка в розведенні (1:10)	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Фізрозчин	1,8	3,9	7,9	9,9	11,9	14,9	17,9	20,9

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

Таблиця 7

Визначення титру гемолізіну

Інгредієнт, мл	Розбавлення гемолізіну, мл						Контроль		
	1:100	1:400	1:800	1:1000	1:1200	1:1400	ГС	К	КЕ
Гемолітична сироватка	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
Еритроцити барана (3% суспензія)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Комплемент в розведенні (1:10)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-
Фіз. р-н*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4
Результат	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-

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

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

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

У вказаному досліді за титр гемолізіну буде розбавлення сироватки 1:1200 (повний гемоліз).

Для РЗК гемолітичну сироватку використовують у робочій дозі, рівній потроєному титрові сироватки 1:1200 розбавлення робочої дози буде 1:1400).

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

3% суспензії еритроцитів у колбі швидко приливають рівний об'єм гемолітичної сироватки, взятий у робочому розбавленні. Суміш витримують при 37 °С в термостаті 30 хв. для сенсibiliзації еритроцитів і після цього використовують в роботі.

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

Для визначення дози комплементу, в котрій його слід застосовувати в реакції, комплемент титрують. У допоміжному ряду пробірок готують розведення комплементу (табл. 8). Потім їх розливають каліброваною піпеткою по 0,1 мл в дослідні пробірки, туди ж додають фізрозчин по 0,2 мл та гемосистему по 0,2 мл. Штатив з пробірками струшують і направляють у термостат при 37 °С на 1 год.

Титрування комплементу

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

Примітка: *Інкубація при 37° протягом 1 год.

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

Контроль: ГС-контроль гемолітичної сироватки на гемотоксичність;

К - контроль комплементу на гемотоксичність;

КЕ - контроль еритроцитів на стабільність у фізрозчині.

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

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

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

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

Титрування антигену

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

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

У дослідний ряд пробірок градуйованою піпеткою переносять по 0,1 мл кожного розбавлення антигену (табл.9). Потім у кожен пробірку додають по 0,1 мл комплементу, взятого у робочій дозі, і по 0,1 мл фізрозчину. Пробірки струшують і інкубують 1 год. в термостаті при 37 °С. Після інкубації в усі пробірки додають по

0,2 мл сенсібілізованої гемосистеми. Пробірки знову струшують і термостатують при 37 °С ще одну годину. По закінченні цього терміну читають результати і визначають, за якої максимальної кількості антигену відбувається гемоліз. Ця кількість є “розчинною” дозою антигену, котру і приймають за титр.

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

Титрування сироватки на антикомплементаРНість. Імунна (досліджувана) сироватка. Для її отримання у хворого беруть з вени кров у об’ємі 5-10 мл, зазвичай натщесерце або через 6 год після прийому їжі. Отриману сироватку інактивують прогріванням при 56 °С протягом 30 хв.

Досліджувані сироватки людини і тварин у великих концентраціях можуть мати антикомплементаРНю дію. У зв’язку з цим під час роботи з такими сироватками необхідно визначити, які розбавлення її не мають антикомплементаРНих властивостей (табл.10).

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

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

Таблиця 10

Титрування досліджуваної сироватки на антикомплементаРНість

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

Примітка: *Інкубація при 37° протягом 1 год.

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

Постановка основного дослідження РЗК. Перед постановкою реакції спочатку змішують досліджувану сироватку, антиген і комплемеентаРНт. Суміш витримуть у термостаті за температури 37 °С протягом години. По закінченню указанного терміну у пробірку додають сенсібілізовану гемолітичну систему (табл. 11).

Схема постановки основного досліду РЗК

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

Примітка : *Інкубація при 37° протягом 1 год.

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

Пробірки знову струшують і термостатують за тієї ж температури годину, а потім оцінюють результати реакції зв'язування комплекменту.

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

За титр досліджуваної сироватки приймають максимальне її розбавлення, за якого ще спостерігається затримка гемолізу на “xxx”. За відсутності специфічної реакції, коли

АТ не відповідає АГ, спостерігається повний гемоліз в усіх дослідних пробірках з досліджуваною сироваткою.

Матеріали та обладнання:

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

ЗАНЯТТЯ 7. Реакція преципітації

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

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

Реакцію преципітації використовують:

- у судовій медицині для визначення видової приналежності кров'яних плям, сперми;
- у санітарній експертизі - виявляють домішки молока тварин одного виду до молока тварин іншого виду, домішки штучного меду до натурального, фальсифікація м'ясних, рибних, борошняних виробів;
- у біології - визначають генетичні зв'язки споріднених тварин, рослин;
- в імунології - для виявлення та кількісного визначення імуноглобулінів у крові;
- у вірусології - для виявлення антигенів та антитіл до різних вірусних захворювань, а також для вивчення антигенної структури вірусів, наприклад вірусів кору, ящуру, віспи, поліомієліту та ін.
- у бактеріології - для визначення антигенів у діагностиці ряду інфекцій (дизентерії, сибірської виразки, менінгіту, пневмонії), а також для виявлення бактеріальних токсинів (наприклад у вивченні токсину утворення у збудника дифтерії).

Реакція преципітації - надзвичайно специфічна і чутлива імунологічна реакція, яка дає можливість виявити антигени у 10^{-6} г білка.

Принцип реакції. В основі реакції преципітації лежить утворення, агрегація та утворення осаду комплексів антиген-антитіло. При цьому антиген має назву преципітиногена, антитіло - преципітин, утворюється комплекс - преципітат (Рис. 6).

Відрізняє реакцію преципітації від реакції аглютинації те, що у першій - антиген розчинний, у другій - корпускулярний.

Антигеном можуть слугувати екстракти та лізати мікроорганізмів, тканин, органів, складні високомолекулярні суміші та хімічно чисті речовини.

Преципітуючу сироватку отримують шляхом гіперімунізації тварин (коней, овець, кролів) відповідним антигеном. Така сироватка має високий титр антигену (не менш 1:100000).

Феномен реакції: антитіла, з'єднуючись з антигенами викликають їх агрегацію, що візуально виявляється помутнінням прозорих рідин та утворенням осаду. Осадження з рідин комплексів АГ-АТ відбувається тільки у діапазоні еквівалентних співвідношень концентрації взаємодіючих молекул. У разі надмірної кількості одного з реагентів утворюється комплекс і феномен реакції не проявляється.

Основні методи проведення реакції преципітації: реакція кільцепреципітації та реакція преципітації в агарі (гелі).

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

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

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

Методика визначення імуноглобулінів методом радіальної імунодифузії у гелі (метод Манчіні)

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

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

Методика постановки РІД

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

Розчин Б: 0,05 М НСІ готують заносючи 0,15 мл НСІ в 100 мл дист. води;

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

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

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

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

5. Агар, розплавляють та охолоджений до 56 °С, змішують попередньо прогрітою у термостаті при 37 °С сироваткою і виливають рівномірним шаром на поверхню планшету, установленого чітко горизонтально.

6. Після того, як агар затужавіє, пробійником, який має діаметр 2 мм, роблять отвори на відстані 15 мм за схемою (рис. 3)

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

Рис. 3. Схема постановки реакції преципітації по Манчїні

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

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

9. Облік та оцінка результатів.

По закінченню експозиції лінійкою вимірюють діаметр кільця приципітації. Рівень імуноглобулінів визначають за калібровочною кривою, яка виражає залежність між рівнем імуноглобулінів та діаметром кільця преципітації. Для цього сироватку на осі абсцис відкладають діаметр кільця преципітації (8 мм) контрольної сироватки з відповідною моноциклічною сироваткою, а на осі ординат - відому концентрацію імуноглобуліна у МЕ/мл або мг/мл, яка присутня у контрольній сироватці кожного розбавлення.

Знайдені точки перетину з'єднуються прямою, нахил якої не повинен перевищувати 40-50 °С.

Для визначення рівня Ig у досліджуваній сироватці на осі абсцис відкладають діаметр кільця преципітації досліджуваної сироватки, встановлюють перпендикуляр до перетину з кривою із точки перетину роблять проекцію на вісь ординат. Вміст Ig виражають у МЕ/мл або мг/мл.

Матеріали та обладнання

1. Досліджувана сироватка.
2. Моноспецифічні сироватки проти імуноглобулінів G, M, A людини.
3. Стандартна сироватка людини.
4. Агар.
5. Веронал-мединаловий буфер.
6. Полістиролові планшети.
7. Водяна баня.

8. Ексикатор.
9. Термостат.
10. Піпетки на 1 мл.
11. Мікрошприці та дозатори.

ЗАНЯТТЯ 8. Імуноферментний аналіз

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

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

Основні принципи твердофазного ІФА (ELISA).

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

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

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

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

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

Інкубація субстрату з іммобілізованим кон'югатом, як правило, приводить до розвитку кольорової реакції. На певній стадії реакцію зупиняють, а чіткість забарвлення оцінюють візуально, порівнюючи із стандартом, або за оптичною густиною (фотометрія за певної довжини хвилі). Деякі варіанти методу

припускають забарвлення самої твердої фази. У цих випадках використовують хромогенні субстрати, що дають продукти у вигляді нерозчинних, іммобілізованих на твердій фазі забарвлених преципітатів.

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

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

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

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

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

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

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

Методичні варіанти ТФ ІФА:

- **ELISA.** Прямий варіант, що передбачає утворення двошарових імуних комплексів.

При здійсненні цієї найпростішої модифікації ІФА виямки панелей сенсibiliзують (іммобілізують) антигенами (антитілами), а потім інкубують антитілами (антигенами) з міченими ферментом. Зв'язування кон'югату, що

містить фермент з твердою фазою відбувається лише у тому разі, коли обидва компоненти системи взаємно комплементарні.

Модифікацією цього варіанту є конкурентний аналіз, у якому Ag(At), мічений ферментом, конкурує з неміченим At(Ag). У цьому випадку ферментативна активність утвореного комплексу At-Ag-Ф (Ag-At-Ф) обернено пропорційна кількості Ag(At) у досліджуваному зразку (рис.5,6).

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

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

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

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

Практичне завдання: Провести серодіагностику сифілісу

- визначити наявність антитіл до *Treponema pallidum* у сироватці крові людини непрямим методом ELISA.

Матеріали та обладнання

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

1. Антиген трепонемний ультразвуковий, сухий - 1 фл.-5 мл.
2. Антитіла діагностичні проти імуноглобулінів людини, мічені пероксидазою, сухі (кон'югат) - 1 фл.- 0,5 мл.
3. Сироватка крові людини, яка має антитіла до *Treponema pallidum*, суха - позитивна контрольна сироватка - 1 фл.-0,5 мл.
4. Сироватка крові людини, яка не має антитіл до *Treponema pallidum*, суха - негативна контрольна сироватка - 1 фл. - 0,5 мл.
5. Сухий біологічно активний концентрат сироватки молока - 4 фл. - по 9 г.
6. Пептон сухий ферментативний для бактеріологічного застосування - 4 фл. по 6 г.
7. Кислота 5-аміносаліцилова - 5 фл.

8. Гідропірит - 6 табл. по 1,5 г.
9. Твин-20 або сорбіталь Л-20 детергент 1 фл. - 8 мл.
10. Натрій хлористий (для приготування промиваючого розчину) 1 пакет - 180 г.
11. Натрій вуглекислий кислий (для приготування буферного розчину) 1 фл. - 3,0 г.
12. Натрій вуглекислий (для приготування буферного розчину) 1 фл. - 1,5 г.
13. Натрія гідроокис 1 фл. - 0,4 г.
14. Планшети 4 шт.

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

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

Розчин для приготування антигену готують з вуглекислого натрію та кислого вуглекислого натрію. Розчином для промивання планшетів слугує 0,9 %-ний розчин хлористого натрію. Розчином для розведення сироваток слугує сорбент. Розбавлення кон'югату готують у розчині, що містить рівні частини сорбенту та 0,9% розчину хлористого натрію.

Сорбція розведених сорбентом сироваток крові необхідна під час проведення ІФА для попередження можливих неспецифічних результатів.

Призначення. Тест-система призначена для серодіагностики сифілісу.

Приготування розчинів.

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

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

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

Розчин № 4. Вміст флакону з етикеткою "Сироватка крові людини, що містить антитіла до *Treponema pallidum* суха" розчиняють у 0,5 мл стерильної дистильованої води, потім відбирають 0,1 мл і розчином №6 розводять до 1:10. З отриманого розчину відбирають 0,1 мл та розчином №6 розбавляють до 1:20,

отримуючи при цьому розбавлення сироватки крові 1:200. Ретельно перемішують. Сорбцію сироватки крові проводять при температурі (37 ± 1) °C протягом 60 хв.

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

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

Розчин № 5. Вміст флакону з етикеткою “Антитіла діагностичні проти імуноглобулінів людини, мічені пероксидазою, сухі (кон’югат)” розводять у 0,5 мл стерильної дистильованої води. Робочий розчин готують використовуючи розчин, який складається з рівних об’ємів розчинів № 6 та № 3, містить детергент у розбавленні, яке зазначене на етикетці флакону. Не зберігають. Залишки вихідного розчину кон’югату зберігають при температурі мінус 20-16 °C у пробірках по 0,1 мл протягом 2-х місяців.

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

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

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

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

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

Хід аналізу

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

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

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

3. Адсорбцію антигену на поверхні виямок проводять протягом 18 ± 2 год. при температурі 18-22 °С.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Контролі при проведенні імуноферментного аналізу:

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

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

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

Облік результатів:

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

1. Візуальний облік реакції:

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

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

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

- оптична густина (ОГ) субстратної суміші у виямках, у котрі вносили розчин № 3 з детергентом, має бути не більше 0,25;
- ОГ субстратної суміші у виямках, у котрі вносили розчин № 6, має бути не більше 0,25;
- ОГ субстратної суміші у виямках, у котрі вносили негативну контрольну сироватку (розчин № 4а), має бути не більше 0,35;
- ОГ субстратної суміші у виямках, у котрі вносили позитивну контрольну сироватку (розчин № 4), має бути не більше 0,9.

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

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

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

Можливі помилки

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

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

Форма випуску

Тест-система імуноферментна є набором інгредієнтів, упакований в одну коробку.

Тест-системи зберігають в закритих складських приміщеннях при температурі 2-10 °С 1 рік.

Транспортування здійснюється будь-якими видами критого транспорту при температурі 2-10 °С.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

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

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.И., Фрейдлин И.С. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учеб.пособие. - М.: Медицина, 1993. - 240 с.
2. Вершигора А.Е. Основы иммунологии. - К.: Вища школа, 1990. - 504 с.
3. Иммунологические методы / Под.ред. Г.Фримеля - М.: Медицина, 1987.- 472 с.
4. Иммунология: Практикум /Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, И.Е. Вихоть. - К.: Изд-во при Киевском ун-те, 1989. - 304 с.
5. Кохан І. Імунологія. Підручник імунності, серології, імунохімії, імунобіології, імуногенетики для студентів медичних і біологічних інститутів. - Київ - Торонто: Кобза, 1994. - 443 с.
6. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология. М.: Медицина, 1983. - 368 с.
7. Никитин В.М. Справочник серологических реакций. - Кишнев.: Штиинца, 1977. - 206 с.
8. Петров Р.В. Иммунология. - М.:Медицина, 1983. - 368 с.
9. Петров Р.В., Лопухин Ю.М., Чередеев А.И. Оценка иммунного статуса человека: Методические рекомендации. - М.: Минздрав СССР, 1984. - 36 с.
10. Петров Р.В., Борисова А.М., Пересадин И.А. Иммунная система и проблемы хронизации заболеваний. - М.: Минздрав СССР, 1991. - 26 с.
11. Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных заболеваний. М: Медицина, 1989. - 697 с.
12. Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике вирусных инфекций: Учебное пособие /Гирич В.М., Букринская А.Г., Порохницький В.Г. и др. - К.: Вища школа, 1992. - 303 с.
13. Фролов А.Ф., Шевченко Л.Ф., Ширококов В.П. Иммунология: Практикум. - К.: Здоров'я, 1989. - 245 с.
14. Ускоренная первичная оценка иммунологического статуса человека. Методические рекомендации. /Ваничкин А.А., Бушуева Н.Н., Дегтяренко Т.В., Усов Н.И., Лебедев К.А., Понякина И.Д. - Одесса: Од.НИИ глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова, 1990. - 23 с.
15. Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения. Методические рекомендации. - Киев: Минздрав. УССР, 1988. -20 с.

Навчальне видання

Гудзенко Тетяна Василівна

Зінченко Оксана Юріївна

Галкін Микола Борисович

Жумінська Ганна Іванівна

Іваниця Тетяна Володимирівна

СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ БАКТЕРІАЛЬНИХ ТА ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

Методичні вказівки
до проведення лабораторних занять з курсу «Імунологія»

В авторській редакції

Підп. до друку 20.12.2018. Формат 60x84/16.

Ум.-друк. арк.2,33. Тираж 20 пр.

Зам. № 1819.

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

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12

Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р. Р 51