

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет технології виробництва і переробки продукції
тваринництва, стандартизації та біотехнології

Кафедра ветеринарної медицини та гігієни

ВЕТЕРИНАРНА ІМУНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

для лабораторно-практичних занять та самостійної роботи
для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти
ОПП «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» спеціаль-
ності 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» ден-
ної форми здобуття вищої освіти

МИКОЛАЇВ
2022

УДК 636.09:612.017
В39

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВПШТСБ Миколаївського національного аграрного університета від 21.04.2022 р., протокол №10

Укладач:

Т. С-М. Лумедзе - асистент, кафедри ветеринарної медицини та гігієни, Миколаївський національний аграрний університет

Рецензенти:

С. П. Кот - кан.біол. наук, доцент, доцент кафедри ветеринарної медицини та гігієни. Миколаївський національний аграрний університет

А. В. Іовенко - кан.вет.наук, доцент, доцент кафедри ветеринарної медицини та гігієни. Миколаївський національний аграрний університет.

Відповідальний за випуск:

І.Х. Лумедзе – канд. вет. наук, доцент, завідувач кафедри ветеринарної медицини та гігієни. Миколаївський національний аграрний університет.

ВСТУП

Поряд з великим теоретичним внеском, який внесла імунологія в розвиток гуманної, ветеринарної медицини та біології, її методи отримали широке застосування у діагностиці, профілактиці та терапії інфекційних та неінфекційних хвороб, а також вирішення проблемне ветеринарних спеціальностей.

Імунологічні методи застосовуються для рішення багатьох задач:

1. Оцінка стану імунної системи тварини (імунного статусу) по визначенню кількісних та функціональних характеристик клітин імунної системи та їх продуктів.

2. Діагностика інфекційних хвороб та резистентності до них по виявленню та встановленню титрів антитіл (серодіагностика), виявленню антигенів збудників в організмі, визначенню клітинних реакцій на ці антигени.

3. Сероідентифікація культур бактерій та вірусів виділених з організму тварин.

4. Виявлення імунопатологічного стану, алергій, протипухлинних реакцій.

Поряд з тим імунологічні методи лежать в основі створення вакцин, сироваткових препаратів для попередження та лікування. Сучасна імунологія обґрунтувала створення нових видів лікарських препаратів – імуноцитотоксинів, препаратів з тканин імунної системи, засобів направленої доставки лікарських препаратів на основі моноклональних антитіл.

Щодо імунопатології, то цій проблемі приділена значна увага тому що порушення в імунітеті досить поширені часто зумовлюють перехід тварин до груп високого ризику захворювання. Особливо часто зустрічається імунодефіцитний стан у молодняку тварин, що негативно впливає на збереженість поголів'я.

Імунологія має велике значення в підготовці лікаря ветеринарної медицини і в майбутньому її роль зростатиме.

Тема 1. Імунологічні методи діагностики інфекційних захворювань

Імунна система захищає організм від мікроорганізмів – збудників інфекційних хвороб, злоякісних клітин, бере участь у відокремленні пересаджених органів і тканин, забезпечує нормальне функціонування кровотворних органів та систем організму, слідкує за нормальним розвитком зародка і захищає новонародженого, виділяє та утилізує мертві клітини та тканинні структури.

У захисті організму від чужорідних агентів (антигенів) вирішальну роль відіграють імунологічні механізми, які здійснюються антитілами (імуноглобулінами) та імунокомпетентними клітинами (лімфоцитами).

Антигени (гр. анти – проти, генос – рід) – це в основному генетично чужорідні речовини, які після зараження або штучного введення в організм тварин (людей), викликають у ньому імунну реакцію, внаслідок якої виробляються антитіла з якими вступають у взаємодію в організмі (*in vivo*), так і у пробірці (*in vitro*). З цього визначення виходить, що антигени мають дві основні властивості: здатність викликати імунну відповідь організму – тобто, утворення специфічних антитіл та лімфоцитів і здатність вступати з цими антитілами та лімфоцитами у специфічну реакцію.

Антигенами можуть бути бактерії (живі та вбиті, або їх специфічні білки), токсини бактерій, віруси, чужорідні клітини. Розрізняють антигени корпускулярні (корпускула – часточка), це клітини бактерій, еритроцити, клітини чужорідних організмів та розчинні – токсини та екстракти бактерій. Антигени мають декілька детермінантних рецепторів (невелика частина молекули білка), які зв'язуються з відповідними антитілами. Цей зв'язок або реакція може відбуватися як у організмі тварин (*in vivo*), так і у пробірці (*in vitro*).

Антитіла – високомолекулярні білки сироватки крові (*serum* – сироватка), що утворюються внаслідок потрапляння антигенів до макроорганізмів і вступають з цими (тобто аналогічними) антигенами у взаємодію як *in vivo* так і *in vitro*.

Головною функцією антитіл є зв'язування антигену і його подальше видалення з організму тобто збереження гомеостазу.

Взаємодія мікробного антигену та антитіл носить суворо специфічний характер і направлена у тваринному організмі на нейтралізацію збудника і його токсинів. Взаємодія антигену і антитіл *in vitro* (у пробірці) при певних умовах супроводжують видимі феномени (аглотинація, преципітація, імунний лізис), що дозволяє використовувати АГ – АТ реакції, що отримали назву серологічних (*serum* – сироватка).

Основою імунологічних механізмів є те, що антитіла і лімфоцити, які утворились при попаданні в організм антигену, реагують тільки з ним, а не з іншими антигенами. Виходячи з їх специфічності реакції можливі лише тоді коли антитіло та антиген комплементарні (ідентичні, гомологічні) один одному. Маючи специфічні антитіла проти певного антигену, можна розпізнати і виявити його серед інших. І навпаки, можна виявити в сироватці крові антитіла проти конкретного антигену. Якщо в організмі знаходиться антиген, то він викликав синтез гомологічних йому антитіл, які ми і виявляємо у сироватці крові. На цьому принципі базуються всі імунологічні діагностичні реакції, які назвали серологічними.

В основі серологічних реакцій лежить специфічна взаємодія між антигенами та антитілами в результаті чого утворюється імунний комплекс антиген – антитіло.

Серологічні реакції складаються з двох фаз. У першій, специфічній, невидимій відбувається утворення комплексу антиген – антитіло, у другій неспецифічній (фізико – хімічній) виникає певний феномен, наприклад склеювання антигену з антитілом (аглотинація), нейтралізація, лізис антигенів тощо. Обов'язковою умовою другої фази реакції є наявність електроліту, тому всі компоненти серологічних реакцій (антиген, сироватка крові з антитілами, комплекс) розбавляють ізотонічним розчином – 0,9 % кухонної солі.

Завдання та методи ветеринарної імунології

Поряд з великим теоретичним внеском, який зробила імунологія в розвитку ветеринарної медицини та біології, її методи отримали досить широке застосування в діагностиці, профілактиці та терапії інфекційних та не інфекційних захворювань.

Імунологічні методи застосовуються для вирішення багатьох задач:

1. Оцінка стану імунної системи тварин (імунного статусу) по визначенню кількісних та функціональних характеристик клітин імунної системи та їх продуктів.

2. Діагностика інфекційних хвороб та резистентності до них по виявленню та встановленню титрів антитіл (серодіагностика), виявленню антигенів збудників в організмі, виявленню клітинних реакцій на ці антигени.

3. Виявлення імунопатологічного стану, алергій, проти пухлинних реакцій.

Разом з тим імунологічні методи лежать в основі створення вакцин, сироваткових препаратів для лікування та попередження інфекційних хвороб, завдяки яким було врятовано мільйони тварин та людей.

Сучасна імунологія дала підґрунття для створення нових видів препаратів для лікування – імуноцитокінів, препаратів із тканин імунної системи, засобів направлених лікувальних препаратів на основі моноклональних антитіл які надзвичайно ефективні в лікуванні багатьох захворювань.

Біофабрики випускають антигени та імунні сироватки (антитіла) відомої специфічної направленості (діагностичні). З допомогою таких сироваток в серологічних реакціях можливо ідентифікувати невідомий мікроорганізм або, або використовуючи відомий антиген виявити в організмі антитіла, синтезовані у відповідь на проникнення збудника, і таким чином поставити діагноз (серологічна діагностика). Крім того серологічні реакції можливо використовувати для оцінки інтенсивності імунної відповіді після вакцинації або перенесеної інфекційної хвороби.

Отже у практиці ветеринарної та гуманної медицини серологічні реакції широко застосовують як методи діагностики інфекційних хвороб, а саме з **метою**:

1) виявлення специфічних антитіл у сироватці крові тварин за допомогою відомого, стандартного антигену – діагностикуму (якщо в організмі є антиген то є і специфічні йому антитіла, які виявляють);

2) визначення невідомих антигенів (бактерій, вірусів, грибів) тобто ідентифікації антигену за допомогою відомої специфічної стандартної гіперімунної сироватки (антитіло), тобто встановлення видової (сероваріантної) належності збудника хвороби виділеного з матеріалу, що досліджується.

При цьому невідомий компонент визначається за відомим. Наприклад, якщо сироватка хворої тварини реагує з конкретним відомим антигеном, це означає, що в сироватці є антитіла проти даного мікроорганізму, тобто в організмі присутній антиген, який призвів до утворення антитіл, які ми виявляємо. А вид збудника, виділеного з патологічного матеріалу, визначають за допомогою відомої імунної сироватки (антитіла). Серологічні реакції застосовують також для оцінки природнього та штучно набутого організмом тварин імунітету.

Ознайомлення з імунологічною лабораторією, обладнанням, матеріалами та правилами роботи у ній

При масових серологічних дослідженнях, виявлення титрів сироваток використовують обладнання, з допомогою якого можливо полегшити процедуру розведення сироваток, внесення компонентів реакції: автоматичні піпетки, апарат Флоринського, мікротитратор «Такачі».

Апарат Флоринського: завдяки груповій автоматичній піпетці одночасно розводять 10 сироваток крові або вносять компоненти в 10 стандартних серологічних пробірок, розміщених в 100-гніздовому штативі (10×10).

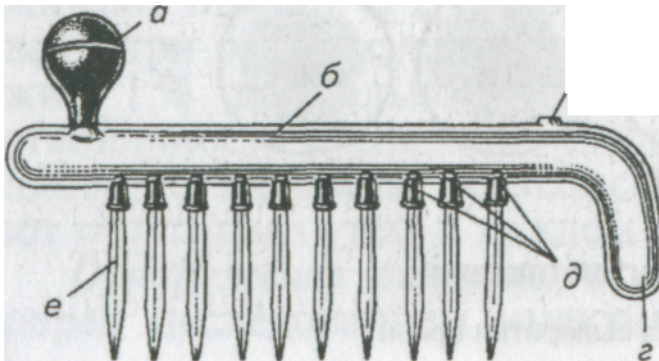


Рис. 1. Групова автоматична піпетка Флоринського:
a — гумова груша; *б* — скляний циліндр; *в* — отвір для злиття залишкової рідини; *г* — приймач для залишкової рідини; *д* — отвір в нижній частині циліндра; *е* — піпетки-мірники.

Мікротитратор «Такачі» включає в себе поліестерові пластини (129*93мм) з лунками, металеві петлі – пристосування для взяття та розведення сироваток в об'ємі 0,025 та 0,05 мл, скляні піпетки крапельниці для розливу передбачених умовами дослідження розчинника. При допомозі скляних піпеток, на які надіта крапельна насадка у вигляді пластмасового конусу з сталеву трубочкою усередині, розливають по лункам пластини ізотонічний розчин в об'ємі 0,025 мл (одна крапля) або 0,05 мл (дві краплі). Краплі

певного об'єму формуються при умові, що піпетку тримають суворо вертикально на відстані 1 см від пластини. З допомогою металевих петель беруть необхідну кількість сироватки крові. Петлі представляють собою тонкі металеві стержні з накінечниками напівсферичної форми, що складаються з пластинок з вертикальними прорізами. Головки петель з сироваткою поміщають у лунки першого ряду, обертають навколо осі, змішують сироватку з розчином, потім переносять розведену сироватку в слідуючий ряд лунок, забезпечуючи при цьому її розведення у два рази і т. д. На завершуючому етапі в лунки з допомогою крапельної піпетки вносять інші компоненти реакції. Ці пристрої можна застосовувати при постановці багатьох серологічних реакцій (РА, РЗК, РНГА та ін.).

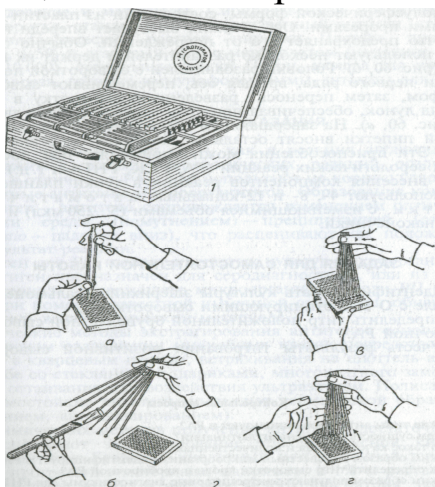


Рис. 2. Прилад Такачі — апарат для серологічного мікротитрування.

Приготування серійних розведень:

1 — загальний вигляд; 2 — схема роботи з апаратом Такачі.

Для внесення компонентів реакції в лунки планшетів усе частіше використовують 4-, 8- та 12-канальні **автоматичні піпетки** з об'ємами, що можна змінювати.

Посуд, який використовується при постановці серологічних реакцій, повинен бути чистим і сухим, стерильність не обов'язкова. Скляний посуд: аглютинаційні, преципітаційні, центрифужні пробірки, піпетки градуйовані (краще без шкідливого простору або піпеточний дозатор) і пастерівські, чашки Петрі, предметні скельця (миють і кип'ятять у дистильованій воді). Для їх обробки не слід використовувати дезінфекційні розчини, кислоти, луги. Скло повинно бути прозорим, без плям і подряпин. При постановці серологічних реакцій в пробірках слід підбирати їх так, щоб вони були однаковими за висотою і діаметром, мали однакову конфігурацію дна, однаковий колір скла.

Замість пробірок часто використовують полістеролові планшети багаторазового та одноразового використання. На кожному планшеті є лунки, розміщені у 8 рядів по 12 у кожному ряді. Лунки

однакові за розмірами і конфігурацією дна. Їх використовують для постановки реакцій гемаглютинації, мікроаглютинації, імуноферментного аналізу.

Інструменти та апаратура: бактеріологічна петля, пінцет, штативи для пробірок, лупа, аглютиноскоп, термостат, холодильник, центрифуга.

Питання для самоконтролю:

1. Дати визначення «антиген» та «антитіло».
2. Роль антитіл у захисті організму.
3. На чому основані імунологічні механізми взаємодії антигенів та антитіл.
4. Фази серологічних реакцій.
5. Задачі імунологічних методів.
6. Мета застосування серологічних реакцій.

Тема 2. Виготовлення антигенів та сироваток крові

Виготовлення клітинних (корпускулярних) антигенів. Для постановки серологічних реакцій, в якості антигену, використовують суспензію живої (18–24-годинної) культури в ізотонічному розчині натрію хлориду або суспензію культури, інактивованої (вбитої) прогріванням.

Для виготовлення антигену використовують культуру в S-формі (колонії на МПА гладенькі, блискучі), яка в ізотонічному розчині утворює гомогенну суспензію. Штами в R-формі дають спонтанну аглютинацію, тому їх не можна використовувати як антиген.

Для виготовлення антигену спочатку виділяють культуру на скошеному МПА. Отриману чисту культуру змивають стерильним ізотонічним розчином. Для цього в пробірку з ростом культури наливають 4–5 мл стерильного ізотонічного розчину, пробірку закривають пробкою і, тримаючи між долонями рук, енергійно обертають пробірку навколо осі. Отриману суспензію бактерій переливають у чисту суху стерильну пробірку і, порівнюючи з оптичним стандартом каламутності, розводять ізотонічним розчином до концентрації 2 млрд мікробних клітин в 1 мл.

Стандартні антигени відомих збудників інфекційних хвороб виробляють на біофабриках. Вони містять інактивовані (не живі) бактерії. Ці антигени називають **д і а г н о с т и к у м а м и** (від

грец. *diagnostikos* – здатний розпізнавати). Діагностикуми випускають, як правило, у рідкому стані (з консервантом) та ліофільно висушеними в ампулах або флаконах (для попередження псування).

Перед використанням діагностикум перевіряють на придатність. Звертають увагу на цілість ємності, чіткість напису на ампулі чи флаконі, відповідність його надпису, зазначеному у наставленні й на коробці, відповідність зовнішнього вигляду, термін придатності.

Перед використанням діагностикум збовтують. Він повинен бути рівномірно каламутним, не утворювати пластівці. Ліофілізований діагностикум розчиняють так, як зазначено у наставленні.

Клітинні або корпускулярні антигени використовуються у таких серологічних реакціях як аглютинації, зв'язування комплекменту, гемаглютинації та її варіантах.

Виготовлення гуморальних (розчинних) антигенів. Антигени (специфічні білки бактерій) резистентні до нагрівання (кип'ятіння, автоклавування) та гниття. При цьому вони не руйнуються і зберігають свою специфічність. Їх отримують екстрагуванням бактерій у яких повністю зруйнована клітинна стінка, тканин, які містять збудників хвороби тобто з біологічного матеріалу, який надсилають для дослідження. Існують *фізичні та хімічні* методи отримання антигенів.

Ф і з и ч н і м е т о д и екстрагування антигенів основані на механічному руйнуванні мікробних клітин шляхом розтирання з кварцевим піском, багаторазове заморожування та розморожування, дія ультразвуку.

У практиці використовують наступні методи виготовлення:

а) механічне руйнування – густу масу відмитих фізрозчином бактерій або подрібнених шматочків органів розтирають у стерильній ступці з піском чи скляним порошком, потім заливають невеликою кількістю фізрозчину, залишають за кімнатної температури на 30 – 40хв, центрифугують (або фільтрують через фільтрувальний папір чи ватно-марлевий тампон) до отримання прозорої рідини, яку і використовують як антиген;

б) заморожування та розморожування декілька разів густої суспензії бактерій чи тканин, що містить збудник, або інший білок, який виступає в ролі антигену. Заморожування призводить до руйнування клітинної стінки бактерій чи клітин, уражених вірусом та

виходу протоплазми у розчин. Після центрифугування надосадову рідину (антиген) використовують в реакції;

в) метод звукових коливань – застосовують спеціальні апарати з особливим зумером. Прилад занурюють у рідину з суспензією бактерій і включають – клітини руйнуються як при дії ультразвуку. Рідину фільтрують (до абсолютної прозорості) або центрифугують і використовують для дослідження;

г) кип'ятіння – найбільш розповсюджений метод отримання преципітиногену (антиген для реакції преципітації) – бактеріальну суспензію (подрібнену шкіру, патологічний матеріал) у фізіологічному розчині кип'ятять 1–2 год (на водяній бані), фільтрують через азбестову вату. Отриманий прозорий фільтрат – антиген – має високу специфічність;

д) довготривале (холодним способом) екстрагування фізрозчином при кімнатній температурі. Шматочки досліджуваного матеріалу масою 1–2 г розтирають у ступці з піском, кладуть у колбу заливають 0,3% карболізованим фізрозчином у співвідношенні 1:10 і залишають на 18–24 год. Одержані екстракти фільтрують через азбестову вату і використовують для реакції. У всіх випадках отриманий антиген повинен бути абсолютно прозорим.

Хімічних методів отримання антигенів достатньо широко використовують екстрагування трихлороцтовою кислотою; кислотний або лужний термогідроліз – прогрівання матеріалу, наприклад, в 1 %-му розчині оцтової кислоти або 0,1 н. розчині гідроксиду натрію; екстрагування при допомозі ацетону, сечовини, етилового спирту, ефіру та інших розчинників; використовують методи ферментативного руйнування мікробних клітин, наприклад, під дією трипсину.

Вибір того чи іншого способу виділення розчинного антигену залежить від його хімічної природи. Головною умовою до любого з методів – ефективного вилучення антигену без його денатурації.

Гуморальним антигеном також може бути бактеріальний екзотоксин. Ним може бути фільтрат бактеріальної культури вирощеної у рідкому живильному середовищі, екстракт вмісту шлунку, кишечника, проб корму.

Досліджуваний матеріал в якому припустим знаходиться токсин розводять ізотонічним розчином у відношенні 1 : 1, екстрагують при кімнатній температурі 1 годину, фільтрують через ватно-

марлевий фільтр та центрифугують при 5000 об/хв 20 хв. Надосадова рідина буде являтися антигеном.

Способи отримання крові у тварин

Щоб мати змогу досліджувати сироватку крові з метою виявлення у ній специфічних до певного антигену (збудника) антитіл, у тварин необхідно взяти кров. З узятної крові отримують сироватку.

У великої рогатої худоби, коней, овець кров беруть яремної вени (5–10 мл), у свиней з хвостової вени. У лабораторних тварин, а саме у кролів кров беруть з вени вуха, щурів та білих мишей з хвостової вени, морських свинок із серця, птахів з підкрилової вени.

Перед взяттям на ділянці тіла де буде зроблено прокол, спочатку видаляють шерсть, дезінфікують шкіру спиртом, спиртовим розчином йоду. Після взяття крові на місці уколу накладають ватний тампон, просочений спиртовим розчином йоду, а лабораторним тваринам вводять підшкірно підігрітий до температури 37°C стерильний ізотонічний розчин або розчин глюкози в об'ємі, який у два рази перевищує об'єм взятної крові.

Отримання сироваток крові. Сироватки крові використовують для визначення наявності у них специфічних антитіл з допомогою серологічних реакцій, які проводять у лабораторіях ветеринарної медицини. Для отримання прозорої сироватки кров у тварин слід брати натще. Після приймання тваринами корму, а інколи і при повторних кровопусканнях з малим інтервалом у крові виникає ліпімія (накопичення надлишку жиру). Сироватка, отримана з такої крові, буде мутною (хільозною), тому результати можуть бути хибними. Кров збирають у пробірку, не допускаючи утворення піни і руйнування формених елементів крові, а саме еритроцитів. Для цього струминку крові, що витікає з вени через голку, направляють на стінку пробірки. Пробірки маркерують, залишають за кімнатної температури на 3–4 год. Кров'яна сироватка повинна бути прозорою й свіжою, її одержують із крові методом відстою. Для ефективнішого та прискореного згортання кров ставлять у тепле місце (водяна баня) або термостат за температури 37°C на 30–40 хв (довше залишати кров не можна – відбудеться гемоліз еритроцитів). Отриману сироватку (рідина світло-жовтого кольору) переливають у чисту, суху пробірку, маркірують і відправляють для дослідження. Якщо сироватка не відділилась від тромбу, згусток крові

відділяють від стінок пробірки тонкою металевою проволокою (можна в'язальною спицею), щораз обробляючи її ватним тампоном просоченим дезрозчином та залишають у холодильнику на 5 – 12 год. Сироватку, яка відділилася від тромбу зливають у чисту суху пробірку, маркерують та відправляють у лабораторію для дослідження.

Виготовлення дефібринованої крові. Кров у тварин з вени збирають у стерильний флакон (колбу) зі скляним намистом. Під час відбору та протягом 10–15 хв флакон струшують обережними круговими рухами, фібрин осідає на кульках, а кров втрачає здатність згортатись. Дефібриновану кров переливають в інший стерильний флакон та використовують для отримання суспензії еритроцитів. Для цього звільнену від фібрину кров центрифугують, надосадову рідину (плазму) зливають. Осад, який є форменими елементами крові, в основному, еритроцити відмивають від залишків плазми фізрозчином шляхом 3–4 кратного центрифугування при 2000–3000 обертів за хвилину протягом 15 хв. Надосадова рідина повинна бути прозорою і безколірною. Видаляють її шляхом відсмоктування піпеткою з гумовою грушею. З відмитих еритроцитів готують 3–5 % суспензію, яку можна зберігати у холодильнику за температури 3–4°C протягом 5–6 діб.

Суспензію еритроцитів використовують для постановки реакцій з метою виявлення антитіл в сироватці хворих тварин.

Отримання імунних (специфічних) сироваток крові

Імунними (специфічними, позитивними) називають сироватки, що містять відомі специфічні антитіла до певного антигену (збудника інфекції, чужорідного білку чи клітин).

За призначенням імунні сироватки поділяють на **лікувально-профілактичні та діагностичні**. Лікувально-профілактичні сироватки формують в організмі тварин пасивний імунітет, який зберігається 2–3 тижні. В імунних сироватках містяться антитіла, тому їх застосовують також з лікувальною метою на початку хвороби, з тим щоб досягнути найбільшого лікувального ефекту у тварин. Сироватки можуть містити антитіла проти мікроорганізмів та токсинів, тому вони підрозділяються на антимікробні та антитоксичні.

Отримують сироватки на біофабриках та біокомбінатах шляхом гіперімунізації продуцентів імунних сироваток (коней, волів,

овець, свиней, мулів, віслюків) певним, відомим антигеном. Гіперімунізацію (зараження або введення) проводять наростаючими дозами антигенів (збудників або чужорідних, даному виду тварин, білків) за певною схемою.

По завершенню імунізації у тварин-продуцентів беруть кров, відстоюють її та отриману сироватку, досліджують на специфічну активність. При цьому отриману сироватку піддослідним тваринам вводять одночасно з аналогічними вірулентними мікроорганізмами в летальних дозах або через деякий час після зараження. Тварини не повинні захворіти.

При внутрішньовенному введенні сироваток та глобулінів тваринам з метою лікування або профілактики несприйнятливість набувається зразу після їх введення. При субкутанному або внутрішньом'язевому введенню антитіла у достатній концентрації в крові з'являються через 12–24 год. і циркулюють 1–2 тижні, гомологічні їм глобуліни 3–4 тижні, а потім розпадаються.

У подальшому сироватки стерилізують шляхом фільтрування через бактеріальні фільтри, фасують у ампули чи флакони, маркують та відправляють замовникам.

Імунні сироватки можуть бути моновалентними – містять антитіла до одного збудника (антигену) і полівалентними – до двох і більше збудників.

Принцип отримання діагностичних імунних сироваток такий же, як і лікувально-профілактичних. Діагностичні сироватки повинні характеризуватись не тільки високою активністю в серологічних реакціях, але і специфічністю. З допомогою діагностичних сироваток виявляють мікробні антигени в тканинних матеріалах та ідентифікують виділені мікроорганізми. В отриманій сироватці визначають її активність (титр).

Т и т р сироватки – це найбільше розведення (або найменша її кількість), в якому сироватка спричинює видиму реакцію з відповідним антигеном в умовах досліду.

Імунні діагностичні сироватки готують для використання в різних серологічних реакціях. На відміну від лікувально-профілактичних сироваток, які стерилізують фільтруванням, діагностичні зазвичай консервують борною кислотою, фенолом, мертиолатом, гліцерином, (щоб не допустити псування) а також ліофільно висушують і перед використанням розводять дистильованою

водою. Зберігають сироватки в холодильнику за температури 4–10°C.

Питання для самоконтролю:

1. Метод виготовлення клітинних антигенів.
2. Фізичні методи виготовлення гуморальних антигенів.
3. Способи отримання крові у різних видів тварин.
4. Виготовлення дефібринованої крові.
5. Отримання сироватки крові та її консервування.
6. Отримання гіперімунних сироваток.
7. Що таке титр сироватки та методи її зберігання.

Тема 3. Серологічні методи визначення антигенів та анти-тіл

Серед різноманітних лабораторних методів дослідження інфекційних захворювань особливе значення має серологічне, що належить до групи імунологічних методів. За його допомогою можна ідентифікувати збудника, інколи визначати антигенну його характеристику (належність до певної серогрупи, серотипу); здійснювати ретроспективну діагностику. Остання базується на виявленні відповідних антитіл у сироватці крові (інколи важливо встановити і динаміку наростання їх титру).

У мікробіологічній практиці широкого застосування набули серологічні реакції: аглютинації, гемаглютинації, преципітації, реакція зв'язування комплементу та ін.

Реакція аглютинації

Суть реакції аглютинації полягає в тому, що при додаванні сироватки крові, яка містить специфічні антигену антитіла, до рівномірної суспензії клітин антигену (наприклад бактерій) відбувається їх склеювання, утворення комочків, пластівців, зернят, які поступово осідають, формуючи характерний осад (аглютинат). Цей осад представляє собою імунний комплекс антиген-антитіло. Характер аглютинату залежить від антигенної будови мікробної клітини. Якщо антигеном є суспензія нерухомих (без джгутиків)

бактерій, які мають тільки соматичний О-антиген, утворюється дрібно зернистий осад.

Якщо антигеном служить суспензія рухомих бактерій і в аглютинації приймає участь поряд з соматичним ще і джгутиковий Н-антиген, формується крупно зернистий аглютинат.

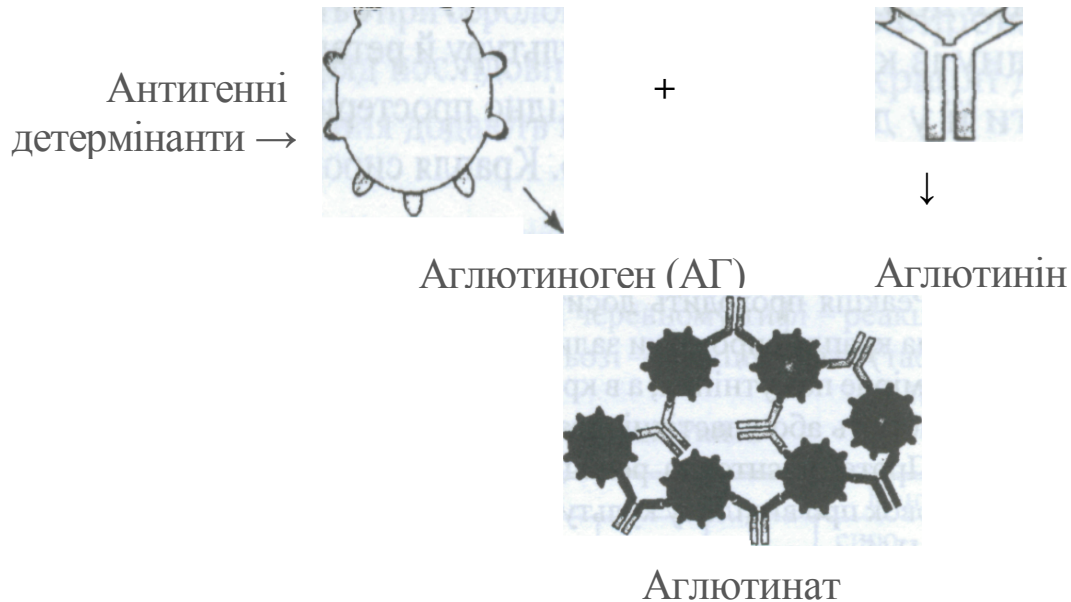


Рис. 3. Реакція аглютинації

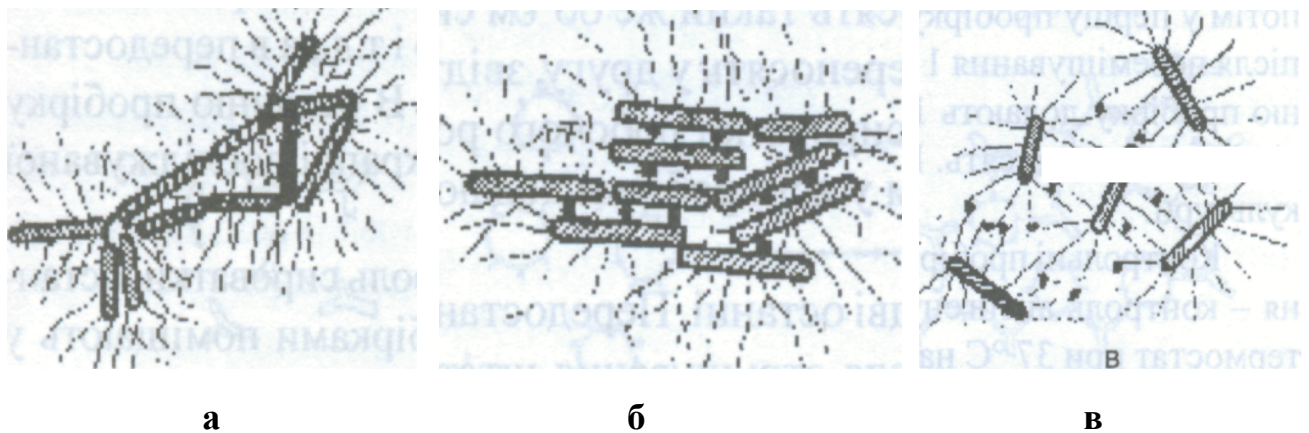


Рис. 4. Аглютинація бактерій:

а – О-аглютинація (соматична), дрібнозерниста; б – Vi-аглютинація; в – Н-аглютинація (джгутикова), крупнопластівцева.

Реакцію аглютинації (РА) у ветеринарній практиці застосовують з метою діагностики бруцельозу, сальмонельозу, колібактеріозу, кампілобактеріозу, лептоспірозу та інших захворювань. РА характеризується високою специфічністю.

Використовують її з подвійною метою:

1. Встановлення діагнозу інфекційного захворювання серологічним методом. В даному випадку слід виявити специфічні антитіла, для чого необхідно завідомо мати відомий антиген (мікробний діагностикум – суспензія у фізіологічному розчині відповідних бактерій живих або вбитих). РА виявляє не тільки клінічно хворих тварин, а і бактеріоносіїв, включаючи перехворівших тварин – реконвалісцентів.

2. Ідентифікацію мікроорганізмів серологічним методом, тобто визначення виду досліджуваного антигену (суспензія виділених бактерій) шляхом введення у дослід відомих специфічних стандартних аглютинуючих сироваток, які містять видо- та типоспецифічні антитіла. Метод серологічної типізації сальмонел, ешеріхій, стрептококів є вирішальним.

РА широко застосовують і для ототожнення немікробних антигенів, які містяться на поверхні еритроцитів. Загальновідома гемаглютинація для визначення груп крові людини та тварин, що особливо важливо для правильного підбору донора та реципієнта при переливанні крові.

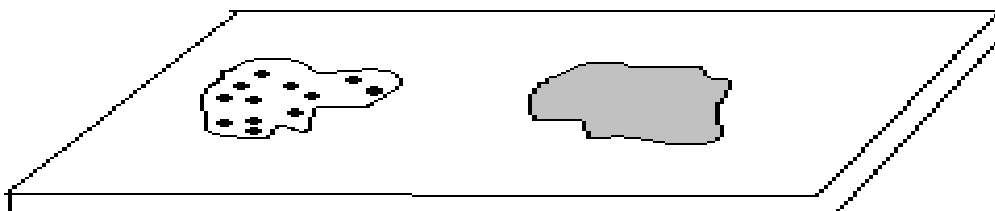
Існує кілька методів постановки РА: пробірковий (об'ємний), крапельний (пластинчатий та на склі), кров'яно-крапельний, мікроаглютинації, РА з молоком, реакція гемаглютинації та її різновиди.

Крапельний (пластинчатий) метод РА

Цей метод РА використовують з метою швидкої орієнтувальної ідентифікації (типізації) збудника чи антитіл у кров'яній сироватці.

Для типізації збудників на предметне скло (лівий край) наносять краплю відомої специфічної сироватки, а на правий край скла краплю фізрозчину (для контролю). В кожену краплю бактеріологічною петлею додають культуру досліджуваного мікроба, вирощеного на МПА (антиген) і рівномірно розмішують. Результат враховують через 2–3 хвилини.

При позитивній реакції у краплі з аглютинуючою сироваткою з'являються пластівці, крупинки. Рідина стає прозорою. У контрольній краплі рідина залишається каламутною, а пластівці і крупинки не утворюються. Реакція краще роздивляється на темному фоні (рис. 5).



Пластинчата РА – розбенгал проба (РБП)

Використовується ця реакція для діагностики бруцельозу. При постановці цієї реакції використовують антиген (мікробна завісь інактивованого збудника бруцельозу) пофарбований бенгальським рожевим. Реакцію ставлять на металевих емальованих (білих) пластинках з лунками. В лунки вносять мікропіпеткою досліджувану сироватку у дозі 0,03 мл і додають 0,03 мл антигену. Аглютинацію враховують через 4 хв після змішування. Реакція вважається позитивною при наявності вираженої аглютинації пофарбованих (вбитих) бруцел у вигляді пластівців та крупинок рожевого кольору, які чітко виділяються на білому фоні лунки.

Реакція гемаглютинації (РГА)

Гемаглютинація (від грец. *haima* – кров та лат. *agglutinatio* – склеювання) – склеювання та випадіння у осад еритроцитів, що знаходяться в рідині під дією різних агентів (антигенів) (рис. 6).

Розрізняють **2 види** гемаглютинації:

а) **пряму, або активну**, яка оснований на здатності бактерій деяких видів (та вірусів) адсорбуватись на поверхні еритроцитів тварин різних видів, викликаючи їх склеювання та осідання. Ця реакція є неспецифічною, еритроцити тварин одного і того ж виду можуть адсорбувати різні антигени;

б) **непряму або пасивну** гемаглютинацію (РНГА), коли еритроцити попередньо сенсibilізовані антигеном, аглютинуються сироваткою, імунною до цього антигену (рис. 7). Реакція непрямой (пасивної) гемаглютинації (РНГА) є специфічною і може бути використана для серологічної діагностики бактерійних та вірусних інфекцій (чума, пулороз, туляремія, холера, черевний тиф, сипний тиф, мікоплазмози та ін.).

Для постановки РНГА попередньо готують діагностикум (еритроцити, на яких адсорбований антиген). Для цього беруть у тварин (найчастіше барана) кров, дефібринують її, відмивають фосфатно-буферним розчином (рН 7,2) методом центрифугування, тричі. Останнім часом, для довготривалого збереження та попередження лізису еритроцити обробляють формаліном. Після контакту

еритроцитів з формаліном, їх також декілька разів відмивають фосфатно-буферним розчином. Антигени поліцукрової природи легко адсорбуються на поверхні еритроцитів. Для адсорбції антигену білкової природи еритроцити обробляють таніном у розведенні 1:200000. Змішують танізовані еритроцити з антигеном і залишають для адсорбції (сенсibilізації) на 2 год в термостаті (37°C), потім знову відмивають фосфатно-буферним розчином методом центрифугування. Осад розводять фізрозчином і використовують для реакції. Для цього розливають отриманий еритроцитарний антиген у пробірки (або лунки у плексигласовій дошці) і додають досліджувану сироватку. Суміш струшують і залишають при кімнатній температурі на 2 год, а потім враховують результат.

В позитивних випадках відбудеться аглютинація, тобто осад еритроцитів буде у вигляді пластівців, зерняток, розподілених по усій поверхні дна пробірки. Це означає, що в досліджуваній сироватці є специфічні антитіла до антигену. В негативних випадках еритроцити не склеюються, а осядуть на дно у вигляді невеликого рівного кружка (гудзика). Реакцію контролюють з допомогою специфічної (позитивної) та нормальної (негативної) сироваток.

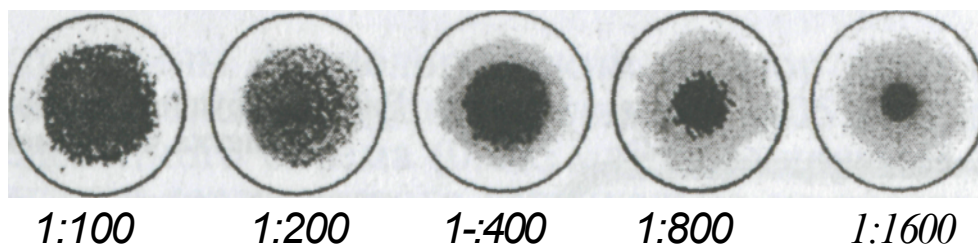


Рис. 6. Реакція гемаглютинації:
1:100... 1:1600 — розведення сироватки крові

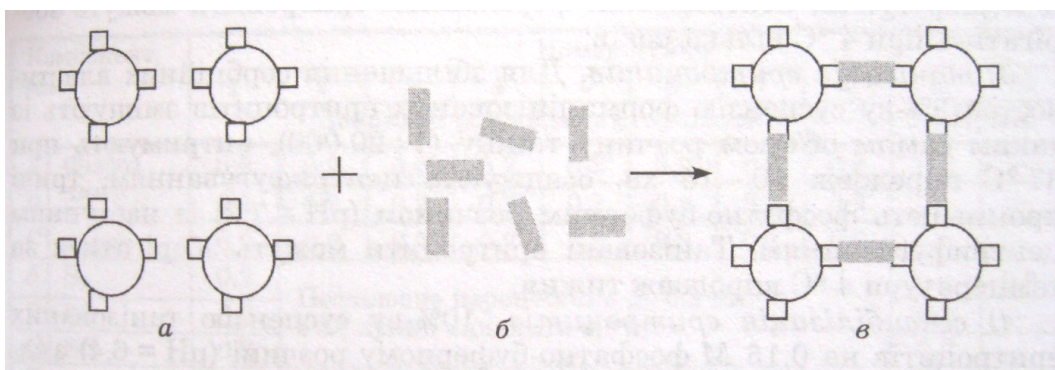


Рис. 7. Схема реакції непрямой гемаглютинації
а – еритроцити з адсорбованим антигеном (еритроцитарний антиген); б – антитіла в сироватці крові; в – аглютинація еритроцитарного антигену антитілами сироватки крові.

Питання для самоконтролю:

1. Суть реакції аглютинації.
2. Постановка та врахування результатів крапельного методу реакції аглютинації.
3. Постановка та врахування результатів пластинчатого методу роз-бенгал проби.
4. Приготування діагностичуму для РНГА.
5. Постановка РНГА та врахування результатів.

Тема 4. Реакція преципітації (РП)

Реакція преципітації (лат. *precipitatio* – осаджування) розроблена Краусом в 1897р. Суть цієї реакції полягає в тому, що при взаємодії імунної сироватки з розчинним антигеном утворюється дрібний осад, який має вигляд білувато-сірого диску або сірої лінії на межі між антигеном та антитілом в разі їх гомологічності (рис. 8).

За своєю сутністю реакція преципітації аналогічна реакції аглютинації. В основі її механізму лежить утворення та випадіння в осад комплексів антиген – антитіло. Проте вона відрізняється за характером антигенів: в реакції аглютинації вони корпускулярні (цілі клітини), а в реакції преципітації – молекулярні, в розчинному стані.

Реакція преципітації значно більш чутлива від реакції аглютинації і дозволяє виявити антиген у дуже малих кількостях

На відміну від РА в РП застосовують **розчинні** антигени у вигляді прозорих розчинів – обов'язкова умова. Ними можуть бути колоїдні розчини білків: сироваток крові, не свіжий патологічний матеріал, шкірсировина, екстракти органів і тканин тварин та рослин, продуктів тваринного та рослинного походження (м'ясо, риба, борошно), мікробних культур тощо.

Антитіла, що беруть участь у реакції преципітації, названі преципітинами, антиген – преципітиногеном, а осад – преципітатом

Преципітиногени (антигени) резистентні до нагрівання (кип'ятіння, автоклавування) та гниття. Їх отримують екстрагуванням з зруйнованих бактерій, тканин (тема 2).

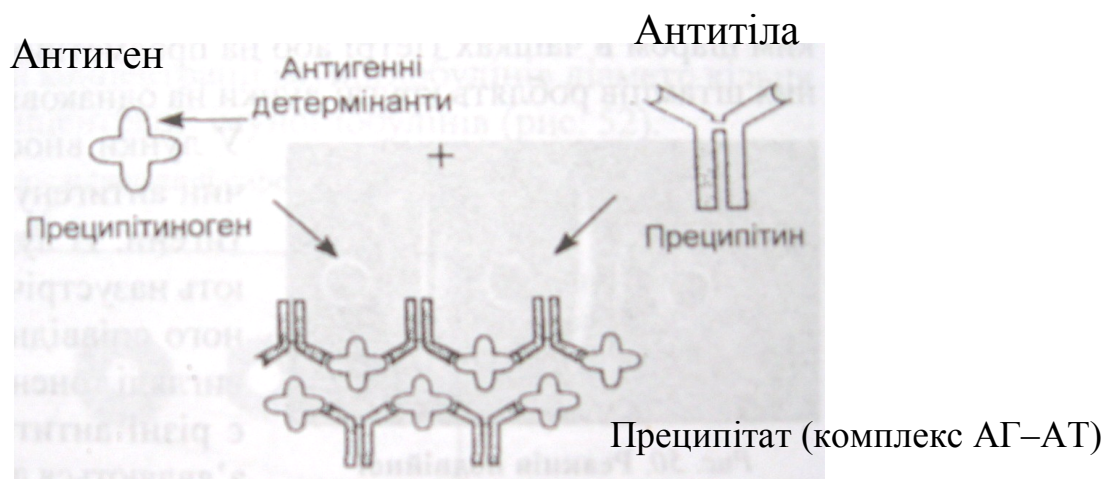


Рис. 8 Схема реакції преципітації

У ветеринарній практиці найбільше застосування знайшли реакції кільцепреципітації та дифузійної преципітації в агаровому гелі.

Реакція кільцепреципітації

Вперше була запропонована Асколі в 1910 році для виявлення антигену збудника сибірки в шкірі, вовні, трупному матеріалі. Антиген збудника сибірки термостабільний не руйнується при стерилізації матеріалу у автоклаві, тому реакцію Асколі називають ще реакцією термопреципітації. Стерилізація матеріалу в автоклаві перед його дослідженням необхідна для безпеки досліджувачів. РП також застосовують для виявлення збудників туляремії, антропозонозної чуми та ін.

Методика постановки реакції кільцепреципітації наступна. У вузькі пробірки Уленгута (діаметр 4 мм) тонкою пастерівською піпеткою розливають однакову кількість специфічної сироватки (виготовлена на біофабриці) по 0,3–0,4 мл, а потім вносять антиген. Вносити його можна двома способами: нашаруванням антигену на сироватку, або підшаруванням сироватки під антиген (щоб не пройшло змішування, так як сироватка тяжча антигену). Якщо в пробірки спочатку розлита сироватка, антиген обережно нашаро-

вують тонкою пастерівською піпеткою по стінці пробірки не доторкуючись сироватки. Пробірку треба тримати вертикально. Якщо у пробірку попередньо налили антиген (екстракт), то іншою піпеткою сироватку підшаровують під антиген обережно опускають її до дна пробірки і зливають сироватку. Головна умова реакції, щоб ці рідини не змішувались і специфічна сироватка повинна бути знизу.

При позитивному результаті на межі двох рідин майже зразу на протязі 1–2 хв (до 15 хв при дослідженні шкірсировини) утворюється різко обмежене кільце (якщо дивитися збоку) або диск-преципітат, білувато-сірого кольору.

Специфічність реакції перевіряється контролями сироватки та антигену: на імунні сироватки в окремих пробірках нашаровують в одну пробірку 0,1 мл фізрозчину, на якому готували антиген, в другу, специфічний (виготовлений на біофабриці) антиген, а також на нормальну сироватку того ж виду тварин (не гіперімунізованого), від якого отримана преципітуюча сироватка, нашаровують специфічний антиген (рис. 9).

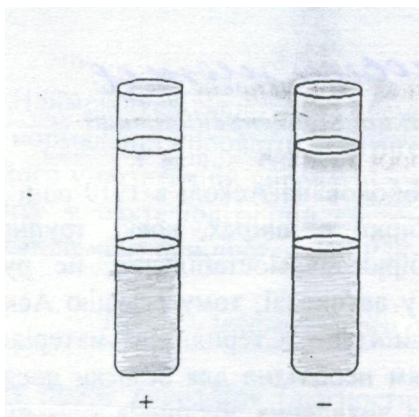


Рис. 9. Реакція кільце преципітації

Примітка: «+» – позитивний результат; «-» – негативний результат.

Реакція дифузійної преципітації (РДП)

Ця реакція вважається чутливою та ефективною в імунології. Замість рідкої фази преципітація протікає в гелі очищеному, освітленому (частіше 1%) агарі. Стерильність якого забезпечується консервантом (мертиолят або фенол).

Метод подвійної (зустрічної) двомірної дифузії по Оухтерлоні (1948) найчастіше застосовують у лабораторній практиці. Реакцію проводять в чашках Петрі або на предметних скельцях залитих розплавленим 1% нейтральним агаром. Спеціальним штампом

або металевою трубочкою у застиглому агарі роблять лунки діаметром 3 мм, одну в центрі і 5 по периферії на відстані 4 мм. Для запобігання підтікання антигену та сироватки під агар, в лунки закачують по краплі розплавленого агару. Тонкою піпеткою Пастера в центральну лунку вносять преципітуючу сироватку, а у периферичні досліджувані антигени (окремими піпетками), а також контрольний антиген. Чашки Петрі або скельця поміщають в ексікатор (вологу камеру) і залишають при кімнатній температурі на 24–48 год. Якщо реакція проходить при 37°С результати враховують через 6–12 год.

У позитивних випадках на місці контакту антигенів та антитіл утворюється молочно-біла лінія преципітату (рис. 10).

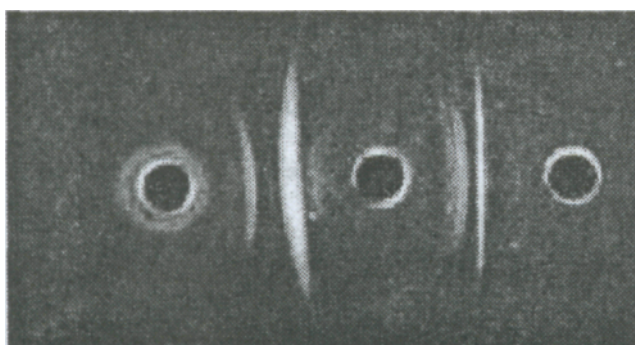


Рис. 10. Реакція подвійної імунодифузії в гелі (Ухтерлоні)

Позитивними якостями РДП в агаровому гелі є можливість її використання для реакції з відносно мутними антигенами, а також простота техніки. Недоліками цих методик є довготривалість реакції, неможливість кількісного аналізу (особливо при дослідженні токсину) та слабка чутливість у відношенні деяких бактерійних токсинів (рис. 11).

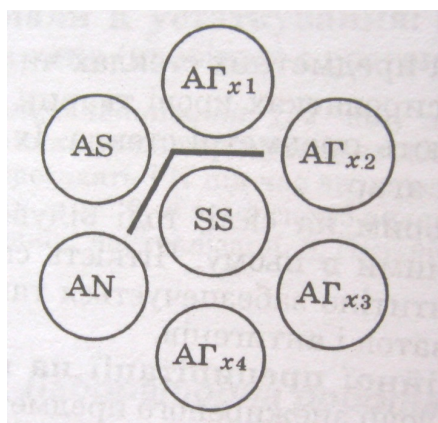


Рис. 11. Схеми РДП для виявлення антигенів
 AN – антиген нормальний (неспецифічний); AS – антиген стандартний (відомий); AG_{x1-x4} - досліджувані антигени; SS – специфічна (позитивна) сироватка.

Реакція нейтралізації токсинів(РН) за Ерліхом

РН використовують для визначення видової належності бактерійних токсинів у досліджуваному матеріалі та активності антитоксичної сироватки. У вірусології її застосовують для ідентифікації деяких вірусів або відповідних антитіл.

Для типізації бактерійного токсину у пробірки з антигеном (невідомим токсином) в 1 мл вносять такий же об'єм специфічної антитоксичної сироватки. Суміш токсин-антитоксин ставлять у термостат на 1-2 год, потім вміст пробірки вводять лабораторним тваринам (частіше морським свинкам). Тварини, які одержали суміш, де відбулась нейтралізація токсину (у випадку їх гомологічності), виживають. Якщо ж токсин не був гомологічний антитоксичній сироватці, то тварини гинуть.

З метою визначення активності антитоксичної сироватки (використовується для лікування токсикоінфекцій) у пробірки з однаковою кількістю антигену (наприклад, 1000 смертельних доз токсину правцю) вносять такий же об'єм специфічної антитоксичної протиправцевої сироватки, з кожною пробіркою поступово зменшуючи її концентрацію. Суміш токсин-антитоксин ставлять у термостат на 1 – 2 години, потім вміст кожної пробірки вводять лабораторним тваринам (з розрахунку одне розведення на дві тварини). Тварини, які одержали суміш, де відбулась нейтралізація токсину, виживають, решта гинуть. Найменшу кількість сироватки, яка нейтралізує токсин, приймають за одиницю активності антитоксичної сироватки (АО).

Питання для самоконтролю:

1. Суть реакції преципітації та її практичне значення.
2. Постановка та врахування результатів кільцепреципітації.
3. Постановка та врахування результатів дифузійної преципітації.
4. Суть та постановка реакції нейтралізації токсинів.

Тема 5. Реакція зв'язування комплементу (РЗК)

Ця серологічна реакція основана на властивості комплексу антиген-антитіло фіксувати вільний комплемент. Вперше описана в 1910 році бельгійськими бактеріологами Борде та Жангу.

В основі реакції лежать два явища – бактеріоліз та гемоліз. У прояві цих явищ бере участь комплемент, тобто творення комплексу антиген-антитіло відбувається тільки у присутності комплементу. Реакція утворення комплексу антиген – антитіло – комплемент невидима. Щоб виявити утворення комплексу, використовують додаткову індикаторну систему, яка відображає, що відбулося в першій фазі реакції. Таким чином, РЗК проходить у дві фази, або системи:

1) бактеріолітична (основна-діагностична), яка складається з досліджуваної сироватки (антитіло), антигену та комплементу;

2) гемолітична (допоміжна-індикаторна), складається з гемолізину та еритроцитів барана, яка дозволяє встановити чи утворився комплекс і зв'язався комплемент в першій системі.

Раніше в ролі антигену використовували суспензію бактерій і в позитивних випадках проходив їх лізис (бактеріоліз), тому перша система отримала назву **бактеріолітичної**. У другій системі відбувається або затримується гемоліз еритроцитів.

Гемолізін це антитіло по відношенню до еритроцитів барана. Еритроцити барана – антиген для гемолізину.

Якщо досліджувана сироватка **бактеріолітичної системи** містить антитіла гомологічні антигену, відбувається утворення комплексу антиген-антитіло, і комплемент зв'язується (фіксується) на ньому. В цьому випадку при додаванні гемолітичної системи не буде гемолізу, тому що без комплементу гемолізін не зможе лізувати еритроцити. Результат реакції позитивний (тварина хвора, або перехворіла).

Якщо ж у досліджуваній сироватці немає антитіл, специфічних до взятого антигену, комплекс антиген-антитіло не утвориться у першій бактеріолітичній системі, комплемент не адсорбується (не зв'язується), залишається у пробірці вільним, і при додаванні дру-

гої (гемолітичної) системи комплемент взаємодіє з комплексом гемолізін (антитіло)-еритроцити (антиген) і відбувається гемоліз (лізис) . Діагностичний результат негативний (тварина здорова). Таким чином, в РЗК приймають участь 5 компонентів: антиген, антитіло (досліджувані та контрольні сироватки), комплемент, гемолізін, суспензія еритроцитів барана (рис. 12).

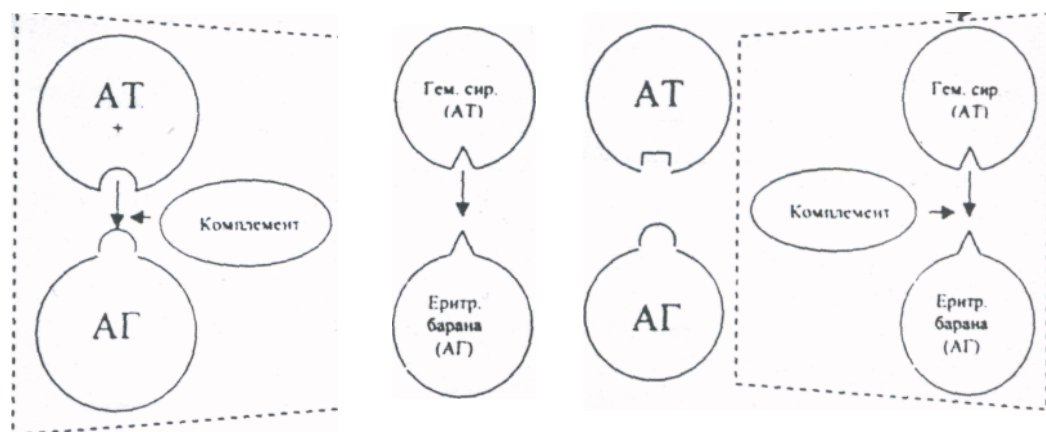


Рис. 12. Схема реакції зв'язування комплементу:
АГ – антиген, АТ – антитіло

Антигени для РЗК готують на біофабриках. Найчастіше це екстракти з зруйнованих бактерій, інфікованих ними тканин, завсінь убитих бактерій, що не мають гемолізуючої дії. На упаковці антигену зазначено номер серії, контроль, дату виготовлення, строк придатності, активність, тобто у якому розведенні його слід використовувати при постановці реакції 1:100, 1:50 і т. д.

Сироватки. В РЗК використовують сироватки, що надійшли для дослідження та контрольні: позитивні (специфічні), що містять антитіла до антигену. Вони отримані гіперімунізацією тварин збудником (антигеном); нормальні (негативні), отримані від здорових тварин і не містять специфічних антитіл. Перед постановкою реакції їх розводять фізрозчином 1:5 або 1:10, щоб не відбулось коагуляції, інактивують у водяній бані 30 хв при 63°C – кролів та собак; 56–58°C – великої рогатої худоби; 58–60°C – коней та овець; 63–65°C – ослів та мулів. Інактивують (прогрівають) сироватки з метою руйнування власного комплементу.

Еритроцити барана є антигеном в гемсистемі. Кров беруть у дорослих баранів з яремної вени у колбу (флакони) з скляними намистинами (кульками) і невеликою кількістю фізрозчину.

Кров струшують обережними круговими рухами, фібрин осідає на кульках. Рідку частину крові центрифугують, надосадкову рідину зливають. Еритроцити відмивають від сироватки фізрозчином шляхом 3-4 кратного центрифугування. Надосадкова рідина повинна бути прозорою і безколірною, потім її видалають, а осад розводять фізрозчином 1:40.

Гемолізін є антитілом в гемсистемі. Готують його на біофабриках шляхом гіперімунізації кролів відмитими еритроцитами барана: кролям внутрішньовенно вводять 4–5 разів з 2–3 денним інтервалом 40% суспензію відмитих еритроцитів. Через неділю після останньої ін'єкції у кролів беруть кров, отримують сироватку, інактивують її і консервують гліцерином 1:1, титрують і розливають в ампули. В лабораторіях перед постановкою РЗК гемолізін знову титрують, тому що активність його з часом знижується, тобто визначають найменшу кількість гемолізіну, або найбільше розведення яке у присутності комплементу викликає повний гемоліз еритроцитів.

Комплемент – складова частина свіжої сироватки крові, лімфи, тканинних рідин теплокровних тварин і людини. В РЗК використовують сироватки крові морської свинки як найбільш чутливий комплемент. Комплемент має білкову природу складної структури, швидко інактивується при нагріванні, довготривалому зберіганні, струшуванні, під дією ультрафіолетових променів, хімічних речовин (кислоти, луги, ацетон, хлороформ тощо).

На даний час біопромисловість випускає комплемент консервований висушуванням в умовах вакууму при низьких температурах (ліофілізація). Висушений, потім запаений в ампулах комплемент зберігається два роки. Перед кожною постановкою РЗК комплемент титрують, перевіряють його активність тобто визначають дозу, яку необхідно взяти в реакцію. Вона повинна бути такою, щоб повністю зв'язалась комплексом антиген-антитіло. Якщо якась частина комплементу залишиться не зв'язаною, то при додаванні гемолітичної сироватки й еритроцитів, останні будуть лізуватись. А наявність гемолізу, як відомо, свідчить про негативний результат РЗК. Ось чому так важливо визначити титр комплементу. Титром комплементу буде та його найменша кількість при якій спостерігається повний гемоліз еритроцитів.

Реакція тривалого зв'язування комплементу (РТЗК)

Ця реакція вважається більш ефективніша по чутливості у порівнянні з класичною методикою РЗК, а саме, дає можливість виявити мінімальну кількість антитіл та антигену. Суть методики полягає у тому, що бактеріолітичну систему витримують у трьох температурних режимах: після змішування компонентів – при кімнатній температурі протягом 15 хв, при температурі 4°C (у холодильнику) протягом 12–18 год, після чого підігрівають 15 хв у водяній бані (37°C) і вносять гемолітичну систему. Залишають, як і при постановці РЗК, у водяній бані і враховують результати реакції.

РТЗК рекомендовано для діагностики бруцельозу, кампілобактеріозу, туберкульозу.

Питання для самоконтролю:

1. Суть реакції зв'язування комплементу.
2. Призначення компонентів РЗК та їх отримання.
3. Відмінність РЗК від РТЗК.

Тема 6. Реакція імунофлуоресценції (РІФ) або метод флуоресцюючих антитіл (МФА)

Індикація бактеріальних і вірусних антигенів у інфікованих матеріалах, тканинах тварин та клітинних культурах за допомогою флуоресцюючих антитіл (сироваток) набула значного поширення в діагностичній практиці. Імунофлуоресцентний метод належить до методів експрес-діагностики. За чутливістю і специфічністю він не поступається іншим серологічним реакціям.

Названа реакція запропонована і розроблена Кунсом в 1942 році. Автор реакції з'єднав антитіла імунної сироватки з флуорохромом, внаслідок чого вони почали світитися (флуоресцювати) в люмінесцентному мікроскопі під дією ультрафіолетових променів. Таку сироватку назвали міченою. Кращим флуорохромом вважають флуоресцеїн ізотіоціанат (ФІТЦ). Флуорохром у певній кількості вносять у сироватку, де він адсорбується на молекулах антитіл. Мічену сироватку очищають від неіммунних білків і зайвого флуорохромом фільтрацією через сефадекс. При нанесенні на фіксований мікробний препарат міченої сироватки, антитіла адсорбуються на специфічних (гомологічних) мікробних об'єктах (антигенах), міцно з ними зв'язуються і тоді останні світяться в люмінесцентному мік-

роскопі жовто-зеленим кольором. Якщо антиген (гетерологічний) не відповідає міченим антитілам, що знаходяться у сироватці, то останні легко видаляються при промиванні препарату.

РІФ має переваги перед РА, РП, РЗК. *По-перше*, дає змогу ідентифікувати мікроби не лише в чистій культурі, а і у змішаній і в мазках-відбитках з патологічного матеріалу, гістозрізах з уражених тканин, а також у препаратах з інфікованих курячих ембріонів. *По-друге*, за її допомогою можна вивчати морфологію мікробних об'єктів (бактерій, мікоплазм, рикетсій). *По-третє*, не потребує у діагностиці багато часу, тобто є експрес-методом.

Розрізняють три модифікації реакції імунофлуоресценції: прямий, непрямий двоетапний і непрямий триетапний. Найчастіше застосовують два перші варіанти.

П р я м и й в а р і а н т (рис. 13а). Для ідентифікування збудника інфекції на предметному склі готують мазки - відбитки з виділеної культури або патологічного матеріалу. Препарат з нанесеним матеріалом підсушують на повітрі і фіксують у ацетоні від 5 до 50 хв краще при температурі мінус 20°C. На предметне скло з зафіксованим антигеном наносять люмінісцюючу імунну сироватку, що містить антитіла до антигену, що діагностують. Препарат поміщають у вологу камеру (чашку Петрі) з фільтрувальним папером, змоченим водою і витримують у термостаті при 37–38°C протягом 15–30 хв, або при кімнатній температурі в темному місці 40–50 хв. Потім препарат промивають у проточній воді 5–10 хв від залишку білків, що не зв'язались, рН не нижче 7,0.

Промитий препарат висушують фільтрувальним папером, наносять диметилфталат (нелюмінісцюючу імерсійну олію) і розглядають у люмінісцентному мікроскопі. Якщо у препараті є мікроби, специфічні щодо антитіл сироватки, то вони яскраво світяться на темному фоні мікроскопа. Цим методом користуються лише для ідентифікації невідомого антигену. Недоліком його є необхідність приготування люмінісцюючої сироватки для кожного виду ідентифікованого мікроорганізму.

Н е п р я м и й в а р і а н т РІФ (рис. 13б). Порівняно з описаним вище методом цей універсальніший, тому що за допомогою однієї універсальної міченої сироватки можна виявити різні види мікроорганізмів.

Метод двоетапний. На першому етапі на фіксований препарат наносять краплю імунної, не міченої сироватки специфічної до

передбачуваного антигену, і ставлять у термостат на 15–20 хв. Потім промивають водою. Антитіла, які відповідають антигену, що є у препараті, не відмиваються.

На **другому етапі** на препарат наносять краплю антивидової люмінісцуючої сироватки, що містить антитіла проти глобулінів першої сироватки, і знову поміщають у термостат в умовах вологої камери на 15–20 хв. Після цього препарат промивають, висушують і мікроскопують.

Антивидова сироватка – це мічені флюорохромом антитіла проти глобулінів крові тих тварин, від яких одержано імунну сироватку до передбачуваного антигену. Таким чином, антитіла першої (не міченої, специфічної) сироватки є антигеном для мічених антитіл антивидової сироватки. В результаті до комплексу антиген – антитіло, що утворився на першому етапі реакції, приєднуються антитіла антивидової сироватки, тобто утворився подвійний комплекс, який можна виявити за допомогою люмінісцентного мікроскопа (рис. 14).

Антивидові сироватки отримують імунізацією глобулінами тварин тих видів, від яких отримували специфічні сироватки.

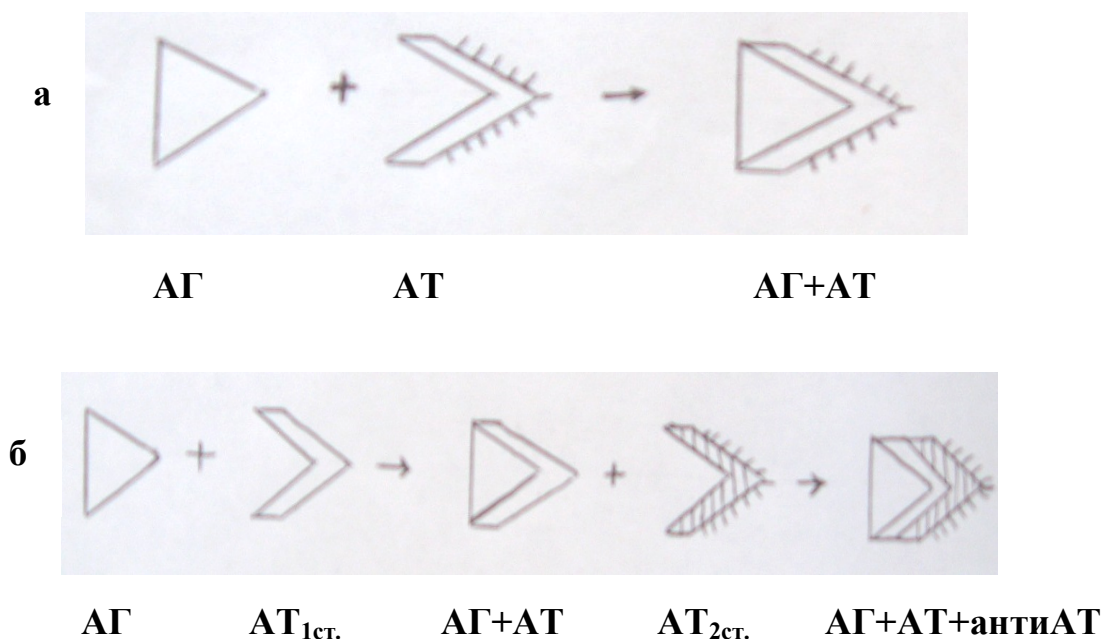
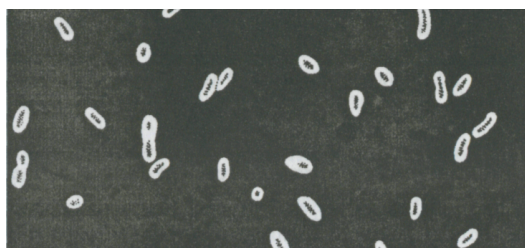


Рис. 13. Схема варіантів прямої (а) та непрямої (б) реакції імунофлюоресценції

AG – антиген; AT – антитіло; AT_{1ст.} – імунна сироватка; AT_{2ст.} – люмінісцуюча антивидова сироватка.



Питання для самоконтролю:

1. Суть реакції імунофлуоресценції.
2. Методика постановки прямого методу РІФ та врахування результатів реакції.
3. Суть та методика постановки непрямого (двоступеневого) методу РІФ.

Тема 7. Визначення імунного статусу організму

Імунна система функціонує як єдине ціле. Але при різноманітних патологічних станах у тварин показники імунітету можуть відхилятися від нормальних величин, що має як діагностичне, так і велике прогностичне значення і часто вимагає імунокорекції. Тому визначенню стану окремих ланок імунної системи надається велике значення.

У даний час на практиці використовується **двоетапний принцип** оцінки імунологічного статусу.

Оцінка імунного статусу організму починається з орієнтовного клінічного обстеження, на якому лікар збирає та оцінює імунологічний анамнез: частоту інфекційних захворювань, характер їх перебігу, вираженість температурної реакції, наявність осередків хронічної інфекції, ознаки алергізації, аутоімунний синдром, природжений (первинний), набутий (вторинний) імунодефіцит.

На **першому етапі** виявляють загальні характеристики, або грубі дефекти у системі клітинного і гуморального імунітету та в системі фагоцитозу, за допомогою простих, орієнтовних тестів, а саме:

- визначення відносного і абсолютного числа лімфоцитів у периферичній крові;
- визначення Т- і В-лімфоцитів крові;
- визначення концентрації сироваткових імуноглобулінів основних класів (М, G, А),
- визначення фагоцитарної активності лейкоцитів.

Для встановлення рівня і вираженості імунологічного дефекту рекомендують наступні тести, які називають **аналітичними або тестами другого рівня**:

- визначення субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів;
- визначення циркулюючих імунних комплексів;
- визначення компонентів системи комплементу;
- визначення лізоцимної та бактерицидної активності сироватки крові,
- визначення кількості нормальних (природних) антитіл.

При оцінці показників імунітету необхідно виключити можливість їх коливань в зв'язку з експлуатацією тварин, продуктивністю, режимом утримання та годівлі.

Проводити оцінку імунного статусу рекомендується у наступних випадках:

1. При генетичних вадах імунної системи (первинні імунодефіцити).
2. При гострих і хронічних бактеріальних, вірусних, грибкових інфекціях.
3. При аутоімунних та алергічних захворюваннях
4. При злоякісних пухлинах.

Методи визначення факторів неспецифічної резистентності макроорганізму

Захист макроорганізму від збудників інфекційних хвороб забезпечує не тільки імунна система, але і механізми неспецифічного порядку: непроникненість слизових та шкірних покривів, фагоцитоз, бактерицидна дія лізоциму, а також гуморальні фактори: комплемент, пропердін та ін. Усі ці механізми (фактори неспецифічної резистентності) являють собою першу лінію протиінфекційного захисту, оскільки при первинному контакті з збудником імунна відповідь розвивається тільки через певний час.

Опsono-фагоцитарна реакція (ОФР)

Фагоцитарна активність лейкоцитів визначається з допомогою опsono-фагоцитарної реакції.

У 1903 році Райтом було встановлено, що фагоцитоз нейтрофілами бактерій стимулюється специфічною сироваткою за рахунок антитіл, які він назвав опсонінами (гр. опсон – їжа). До опсонінів належать нормальні антитіла, комплемент, специфічні антитіла. Опсоніни діють на мікроби, змінюють їх, готують до фагоцитозу.

Лейкоцити, відмиті від сироватки, втрачають свою фагоцитарну властивість. При додаванні свіжої сироватки ця властивість знову відновлюється. Кількість опсонінів у крові, а і відповідно, і фагоцитарна активність лейкоцитів підвищується при імунізації тварин. Зниження рівня опсонінів у крові інфікованих тварин свідчить про зниження резистентності (протистояння) організму. Отже, за ступенем вираження ОФР, можна судити про стан захисних сил організму, тобто рівень неспецифічного клітинного імунітету.

Методика визначення опсоно-фагоцитарної реакції

У центрифужну пробірку наливають і ретельно перемішують 0,25 мл 2% розчину лимоннокислого натрію (для попередження згортання крові) та 0,25 мл досліджуваної крові. У цю суміш додають 0,25 мл двомілярної зависі бактерій (убитих нагріванням *Stf. epidermidis* або *E. coli*). Компоненти перемішують витримують 30 хв у водяній бані (або термостаті) при 37°C, центрифугують до утворення прозорого шару плазми, осаду еритроцитів і між ними тонкого сіруватого шару лейкоцитів. Обережно пастерівською піпеткою відсмоктують середній шар лейкоцитів, і на добре знежирених скельцях роблять 3–5 мазків, висушують їх, фіксують сумішшю Нікіфорова (суміш спирту та ефіру у рівних кількостях) на протязі 20хв, потім фарбують за Романовським-Гімзою або синькою Мансона. Підраховують у імерсійній системі мікроскопа кількість фагоцитованих бактерій у 50–100 нейтрофілах у декількох полях зору.

Відношення від ділення загальної кількості фагоцитованих бактерій на 50 (або 100) лейкоцитів (тобто число підрахованих) називають **фагоцитарним числом**. Іншими словами фагоцитарне число – це кількість бактерій що фагоцитоване у середньому одним нейтрофілом. Наприклад, при підрахуванні фагоцитованих бактерій у 100 лейкоцитах виявилось 720 мікробних клітин. На даному прикладі фагоцитарне число = $720 : 100 = 7,2$.

Оскільки слабкий фагоцитоз відбувається і у нормальній сироватці крові, то для визначення концентрації опсонінів підраховують **опсонічний індекс** – частку від ділення фагоцитарного числа в імунній сироватці (сироватці хворого) на фагоцитарне число в нормальній сироватці.

Для вирахування опсонічного індексу необхідно визначити дві ОФР: підрахувати фагоцитарне число у досліджуваної тварини

(хворої, імунізованої) та у здорової. Наприклад, в 100 лейкоцитах здорової здорової тварини виявлено 210 фагоцитованих бактерій, фагоцитарне число = $210:100=2,1$. У 100 лейкоцитах досліджуваної тварини фагоцитовано 630 бактерій – фагоцитарне число даної проби складає $630:100=6,3$. Опсонічний індекс дорівнює $6,3:2,1=3$. Якщо індекс більше одиниці, то це означає, що у досліджуваної тварини у сироватці міститься більша кількість опсонінів, ніж у контрольній, нормальній. Отриманий результат вказує на високий рівень захисних сил організму (рис. 15).

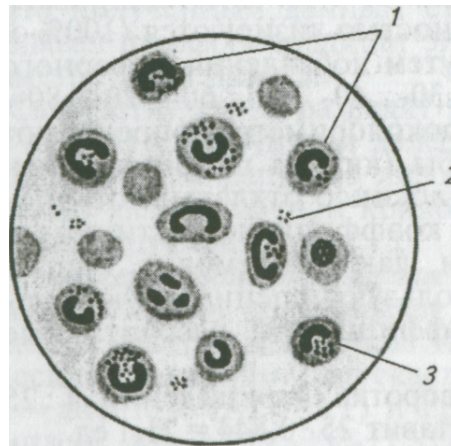


Рис. 15. Фагоцитоз стафілококів:

1 — фагоцити; 2 — вільні стафілококи; 3 — фагоцитовані стафілококи.

Питання для самоконтролю:

1. За якими показниками визначається імунний статус організму
2. Суть опсоно-фагоцитарної реакції.
3. Методика визначення фагоцитарного числа.
4. Опсонічний індекс як імунологічний показник (його прогностичне значення).

Тема 8. Визначення кількості Т-лімфоцитів

Кількість Т-лімфоцитів визначають за допомогою методу спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана (в системі ЕРУК – еритроцит розеткоутворюючі клітини, рис. 16).

Т-лімфоцити мають на своїй поверхні рецептори до еритроцитів барана, які виступають специфічним маркером для розпізнання Т-лімфоцитів. Реакцію проводять в три етапи.

1. Виділення лімфоцитів. лімфоцити виділяють із периферичної крові за допомогою методу градієнтного центрифугування. Досліджувану кров вносять в пластикову пробірку з розчином гепарину (для попередження згортання крові) та обережно перемішують, розводять фосфатним буфером у відношенні 1 : 2. Суміш обережно нашаровують на розчин фіколу. Пробірки центрифугують при 1500 об за хв 40 хв. Після центрифугування еритроцити і гранулоцити проходять через фікол і осідають на дно, а моноцити і лімфоцити залишаються над ним у вигляді кільця. Лімфоцити, сконцентровані у вигляді білуватого шару над розчином фіколу, відсмоктують пастерівською піпеткою і переносять в центрифужну пробірку. Відмивають розчином 199 від плазми.

2. Інкубація. В пластикові пробірки вносять 0,1 мл зависі лімфоцитів і додають рівний об'єм 0,5%-ї зависі еритроцитів барана. Інкубують у термостаті 37 °С 10 хв. Потім центрифугують 5 хвилин і залишають у холодильнику 4 °С на 18 год.

3. Результати враховують одним з трьох методів.

1. На предметне скло наносять краплю суміші лімфоцитів і еритроцитів, роблять мазок, фіксують метанолом, фарбують за Романовським-Гімзою. Підраховують не менше 100 лімфоцитів під імерсією мікроскопа. Клітини, які приєднали 3 еритроцита і більше вважаються Т-лімфоцитами.

2. Краплю суміші вносять у камеру Горяєва і досліджують методом фазово-контрасної мікроскопії.

3. До суміші додають краплю акридинового зеленого і через 2 – 3 хв вносять у камеру Горяєва. Досліджують з допомогою люмінесцентного мікроскопа. Яскраво зелені Т-лімфоцити оточені рожевими еритроцитами.

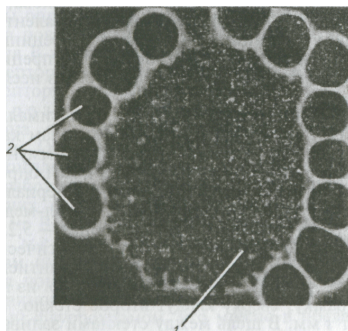


Рис. 16. Феномен розеткоутворення:

1 — лімфоцит; 2 — еритроцити на поверхні лімфоцита

Визначення кількості В-лімфоцитів

На відміну від Т-лімфоцитів, В-лімфоцити мають на своїй поверхні рецептори до імуноглобуліну класу М та до комплекменту (С).

Існує декілька методів виявлення В-лімфоцитів, але частіше застосовують метод оснований на здатності В-клітин утворювати розетки з еритроцитами барана навантаженими (сенсibiliзованими) антитілами та комплекментом (в системі ЕАС – еритроцит, антитіла, комплекмент).

Отримують антисироватку до еритроцитів барана (кролів імунізують еритроцитами барана, відбирають сироватку та інактивують, щоб вона не викликала гемоліз еритроцитів). Далі еритроцити барана змішують з антисироваткою, залишають при 37°C 40 хв. Таким чином на поверхні еритроцитів адсорбувались молекули імуноглобулінів класу М

Джерелом комплекменту використовують свіжу сироватку крові миші, яку додають до суміші, залишають при 37°C 30 хв. Досліджувані лімфоцити (отримують як Т-лімфоцити) змішують з сенсibiliзованими еритроцитами барана. Суміш інкубують 45 хв при 37°C після чого поміщають у холодильник на 18 год. Підрахунок В-лімфоцитів проводять описаним вище способом.

Питання для самоконтролю:

1. Суть методу визначення кількості Т-лімфоцитів у крові.
2. Методика визначення кількості Т-лімфоцитів.
3. Суть методу визначення кількості В-лімфоцитів у крові.
4. Методика визначення кількості Т-лімфоцитів.

Тема 9. Кількісне визначення імуноглобулінів різних класів

Стан В-системи (гуморальний імунітет) відображає кількісне співвідношення імуноглобулінів окремих класів в біологічних рідинах (сироватці крові, молоці, молозиві). З цією метою використовують метод радіальної імунодифузії (за Манчині).

Імунну сироватку проти антитіл певного класу (Ig G, IgM, IgA) вносять у розплавлений агаровий гель. Отримують цю антисироватку імунізацією імуноглобулінами іншого виду тварин. Наприклад, якщо досліджують сироватку свиней, то імуноглобулінами свиней імунізують кролів і їх сироватка буде антивидовою, тобто містить антитіла до імуноглобулінів свиней. Після застигання антитіла у агарі рівномірно розподілені. Внесений в лунку досліджуваній матеріал (антиген – сироватка крові, молозиво) радіально дифундує в товщу геля. Оскільки концентрація антитіл антисироватки скрізь однакова, то в результаті реакції антиген – антитіло в зоні гомологічності утворюються не смужка, а диск (зона) преципітації навколо лунки з антигеном (досліджуваним імуноглобуліном). Діаметр диску преципітації прямо пропорціональний концентрації антигену в досліджуваній рідині, тобто чим більше у досліджуваній сироватці імуноглобулінів (наприклад С), тим більший діаметр кільця преципітації.

В попередніх дослідах визначають оптимальне робоче розведення антисироваток до імуноглобулінів кожного класу. В кожному досліді визначають кількість імуноглобулінів в стандартній сироватці (відома кількість імуноглобулінів) і по відношенню до неї визначають кількість імуноглобулінів у матеріалі, що досліджується.

Хід реакції. В бактеріологічній пробірці змішують по 5 мл розплавленого агару та антисироватки, суміш ретельно перемішують та наносять на предметні скельця, які лежать суворо горизонтально. Після застигання агару у ньому роблять лунки діаметром 2 мм на відстані 15 мм одна від одної.

Досліджувані проби сироватки чи молозива розводять буферним розчином та вносять у лунки пастерівською піпеткою. Паралельно вносять стандартні сироватки для контролю. Скельця залишають у вологій камері на 24 год (IgG, IgA) та на 48 год (IgM) (табл. 1, 2).

Ягнята 4 міс	9,42	1,75	0,11
<i>Секрети:</i>			
Молозиво 4 год.	126,2	15,5–27,2	2,8–4,3
Молоко 12 дн.	0,7–1,4	0,1–0,2	0,01–0,2
	Разом Ig G + Ig M + Ig A		Ig G
Молозиво 6 год.	118,1–202,7		95,9–95,5
Молоко 24 год.	11,3–18,3		
Свині			
Дорослі тварини	18,31–19,5	3,15–3,19	1,44–2,68
<i>Свиноматки:</i>			
1 тиждень лактації	28,2	4,8	2,0
1 тиждень вагітності*	36,3	6,3	1,5
Поросята, 1 день	20,4–26,3	1,02–2,9	2,62–9,1
1 місяць	5,1–6,7	0,86–1,5	0,20–1,05
<i>Секрети:</i>			
Молозиво	61,8	3,19	9,66
Молоко 8–35 днів	1,35	0,89	3,04
* – в останні 4 тижні вагітності кількість Ig G та Ig M зменшується, а Ig A – зростає.			
Коні			
Дорослі тварини	15,0	1,8	2,0
Поні	13,34	1,2	1,53
Кобили	15,0–26,6	1,32	2,99
<i>Лошата:</i>			
новонароджені:	0–0,16	0,2–0,3	0
1–3 дні	7,7–19,5	0,2–0,6	н.і.*
16 днів	5,3–13	0,2–0,4	н.і.
6 місяців	6,7	4,2	0,95
<i>Секрети:</i>			
Молозиво 6 год.	89,12	9,57	1,23
Молоко 1 день	2,1–9,0	0,2–4,0	0,1
Молоко 4–6 міс.	0,1–3,0	0,1	1,3–8,0
* н.і. – немає інформації			

Собаки			
1	2	3	4
<i>Дорослі тварини:</i>			
6–12 місяців	1,44–3,74	1,2–1,7	0,3–0,6
1–2 роки	0,9–3,97	1,3–1,4	0,4–1,1
3–4 роки	0,7–3,2	0,3–1,5	0,4–1,3
5–6 років	1,3–3,3	1,1–1,8	0,6–1,6
7 років	1,7–2,2	0,3–1,8	0,6–1,6

В середньому	1,3–3,2	0,2–1,5	0,4–1,5
Коти			
Сироватка крові дорослих тварин	11,71–22,58	0,60–3,90	1,02–5,82
Молозиво	27,50–46,74	0,31–3,00	0,50–4,88
Молоко 5 днів після родів	0,94–2,55	0,10–0,40	0,09–0,20
Слина	0–0,06	0–0,12	0,03–0,20
Носовий секрет	0–0,39	0–0,15	0,03–0,29
Секрет трахеї	0–1,46	0–0,34	0–1,56
Сльоза*	0–0,17	0–0,12	0,05–0,33
Жовч	0,02–0,41	0,06–0,96	0,18–0,89
Рідина кишок	0–0,20	0–2,34	0,10–0,84
* – стимульовано пілокарпіном гідрохлоратом			
Птиця			
Сироватка крові	Ig G (Ig Y)	Ig M	Ig A
Дорослі кури	3,4–6,9	0,22–0,67	0,71–2,64
Курчата, 4 місяці	2,5–3,07	2,12	1,24–4,6
6 місяців	5,5	0,15–0,24	1,20–1,96
Індики дорослі	8,54	н.і.	н.і.
* н.і. – немає інформації			

Визначення нормальних (природних) антитіл

Одним з показників, які відображають стан гуморального імунітету, є вміст у крові нормальних (природних) антитіл, які виявляють у відсутності інфекції та імунізації тварин. Основна їх роль фіксація та знищення антигенів. Титр їх не великий (по реакції аглютинації – 1 : 10, 1 : 40). Частіше усього вони взаємодіють з мікрофлорою слизових оболонок дихального і харчотравного трактів. До природних антитіл часто відносять імуноглобуліни класу М.

Нормальні антитіла визначають імунофлюоресцентним методом, у непрямому варіанті, який оснований на візуальному виявленні антитіл, які взаємодіють з поверхневими антигенами фіксованих на склі тест бактерій з допомогою міченої антивидової сироватки.

На добре знежирене предметне скло наносять п'ять крапель (на однаковій відстані одну від одної) тест мікроба (антиген) і роблять мазки діаметром, приблизно 7 мм. Просушують на повітрі і фіксують метиловим спиртом у продовж 5хв.

Сухі мазки обводять восковим олівцем, поміщають у вологу камеру і наносять на кожний мазок досліджувану сироватку (анти-тіло) у розведеннях 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, і витримують у термостаті 30 хв.

Потім промивають, підсушують, поміщають знову у вологу камеру і наносять мічену антивидову сироватку (антитіло до досліджуваної сироватки) у робочому розведенні. Витримують у термостаті 30 хв та промивають і висушують.

Контролем служать мазки тест-мікроба, оброблені тільки досліджуваною сироваткою у розведенні 1 : 2 - свічення яскраве, жовто-зеленого кольору та міченою антивидовою сироваткою – свічення мікробів відсутнє.

Готові мазки мікроскопують під люмінісцентним мікроскопом.

Оцінюють інтенсивність свічення досліджуваної сироватки у розведеннях.

Питання для самоконтролю:

1. Суть методу визначення кількості імуноглобулінів методом радіальної імунодифузії.

2. Методика визначення кількості імуноглобулінів методом радіальної імунодифузії.

3. Суть методу визначення кількості нормальних (природних) антитіл.

4. Методика визначення кількості нормальних (природних) антитіл методом радіальної імунодифузії.

Тема 10. Визначення лізоцимної та бактерицидної активності сироватки крові

Перші відомості про існування ферментів з бактеріолітичними властивостями з'явилися на початку ХХ ст. П.Ж. Лашенков (1909), вивчаючи властивості курячого яєчного білку, встановив, що він здатний пригнічувати ріст деяких сапрофітних бактерій. В 1922р. А.Флемінг відкрив літичний фермент, що містився у яєчному білку, і назвав його лізоцимом, який здатний пригнічувати ріст до 75% сапрофітних бактерій. У сироватці крові, та багатьох секретах також міститься лізоцим. У подальшому було визначено, що високочутливим до лізоциму є *Micrococcus lysodeikticus*, який і став тест-мікробом для визначення активності лізоциму. У досліді викорис-

товується добова агарова культура мікрокока в концентрації 1 млрд мікробних клітин в 1 мл та досліджувана сироватка.

В стерильні кювети вносять 0,1 мл досліджуваної сироватки крові, додають 0,4 мл 0,5%-ного розчину кухонної солі та 2 мл завісі культури тест-мікроба.

В якості контролю в окремі кювети замість сироватки крові додають 0,5% розчин NaCl.

Вмістиме кювет перемішують скляною паличкою та визначають їх оптичну щільність (мутність) з допомогою фотоелектроколориметра при зеленому світлофільтрі. Потім кювети поміщають у термостат на 3 год при температурі 37°C (відбувається лізис, тобто розчинення тест-мікробів – рідина просвітлюється) і знову вимірюють оптичну щільність розчину, яка значно зменшується. Лізис мікробів відбувається і в контролі, проте не перевищує 10–15%.

Розрахунок відсотку лізису бактерій проводять по формулі

$$\frac{(D_0 - D_1) \times 100}{D_0} - \frac{(D_{K0} - D_{K1}) \times 100}{D_{K0}}$$

де: D_0 – оптична щільність вмістимого дослідних кювет до інкубації;

D_1 – оптична щільність дослідних кювет після інкубації;

D_{K0} – оптична щільність вмістимого контрольних кювет до інкубації;

D_{K1} – оптична щільність контрольних кювет після інкубації.

Визначення бактерицидної активності сироватки крові (БАС)

Свіжа сироватка крові тварин і людини володіє вираженими, в основному бактеріостатичними, властивостями по відношенню багатьох збудників інфекційних хвороб. Основними компонентами, які пригнічують ріст і розвиток мікроорганізмів є нормальні антитіла, лізоцим, пропердин, комплемент, лейкоїни та інші речовини. Тому БАС є інтегрованим вираженням протимікробних властивостей, що входять в склад гуморальних факторів неспецифічної резистенції.

Визначення бактерицидної активності сироватки крові засноване на врахуванні змін оптичної щільності середовища, що містить мікробну завісь та сироватку крові.

Підготовка компонентів до дослідження. Спочатку готують добову агарову культуру *E. coli*, потім змивають її фізіологічним розчином і отриману суспензію по оптичному стандарту мутності доводять до вмісту 500 млн. мікробних тіл в 1мл. В якості живильного середовища, в якому відбудуватиметься взаємодія сироватки та бактерій використовують казеїнове середовище.

В стерильні кювети розливають піпеткою по 4,5 мл казеїнового середовища і додають по 0,5 мл досліджуваної сироватки крові (дослідні кювети). Потім в кожен кювету мікропіпеткою вносять по 0,005 мл або бактеріологічною петлею діаметром 4мм завісь культури кишкової палички.

В контрольні кювети вносять ті ж компоненти, що і в дослідні, тільки замість сироватки крові в них додають по 0,5 мл стерильного фізіологічного розчину. Вміст усіх кювет ретельно перемішують, після чого закривають ват-но-марлевими пробками. Потім на фотоелектроколориметрі КФК-2 МП визначають оптичну щільність середовища у дослідних та контрольних кюветах зразу ж. Після цього кювети ставлять у термостат при температурі 37°C. Повторно оптичну щільність вмісту кювет визначають через 3 год.

Бактерицидну активність сироватки крові вираховують наступним чином: спочатку визначають який процент по відношенню до контролю склало пригнічення оптичної щільності в дослідних кюветах. Для цього різницю між показниками другого та першого вимірювання в досліді множать на 100 і ділять на різницю між другим та першим вимірюванням у контролі.

$$\frac{(D \text{ визн. через 3 год} - D \text{ визн. зразу}) \times 100}{(D \text{ контр. через 3 год} - D \text{ контр. зразу})}$$

Методи отримання моноклональних антитіл

З метою використання більшості імунологічних методів дослідження необхідно мати стандартні, препарати антитіл. Основні вимоги до цих препаратів – специфічність, стабільність, достатній вміст антитіл. Складність отримання таких препаратів шляхом імунізації тварин пов'язана з гетерогенністю антитіл, які отримують.

Кожен природній антиген багатокomпонентний і до нього можуть формуватись різні клони антитілоутворюючих клітин, що обумовлює велику різноманітність антитіл. Таким чином, антитіла, які отримані від різних особин одного виду тварин, імунізованих одним антигеном, не повністю ідентичні. Отримати абсолютно однорідні антитіла можна, тільки використовуючи клітини одного клону – потомків однієї клітини.

Використовуючи гібридомну технологію вчені провели гібридизацію антитілоутворюючих клітин, отриманих від тварин, з клітинами злоякісної пухлини – В-клітинної плазмоцитомы, які добре культивуються у пробірці. Отримані гібридні клітини володіли властивостями обох батьківських клітин: здатністю продукувати антитіла і здатністю до необмеженого розмноження поза організмом.

Таким чином, були отримані теоретично «безсмертні» клони гібридних клітин (гібридоми), здатні утворювати необмежену кількість однорідних, тобто моноклональних антитіл.

З цією метою тварину (частіше мишу) імунізують потрібним антигеном. Після того як почалась продукція антитіл, мишу забирають видаляють селезінку (головний антитілоутворюючий орган), отримують клітини селезінки, серед яких є антитілоутворюючі В-лімфоцити і змішують з клітинами плазмоцитомы (пухлини). До суміші додають речовини, які руйнують клітинну оболонку і сприяють їх злиттю між собою. В результаті утворюються різноманітні гібридні клітини. Завісь таких клітин розводять живильним середовищем і поміщають у лунки спеціальних панелей так, щоб у кожен лунку потрапила тільки одна клітина. Через певний час визначають антитіла, що утворились у кожній лунці, і знаходять ті клітини, які можна використовувати як родоначальників клону гібридомних клітин. Відібрані гібридомні клітини можна культивувати *in vivo* або *in vitro*, отримуючи необхідну кількість антитіл. Гібридомні клітини можна заморожувати, пересилати з лабораторії до лабораторії.

Питання для самоконтролю:

1. Суть методу визначення лізоцимної активності сироватки крові.
2. Методика визначення лізоцимної активності сироватки крові.

3. Суть методу визначення бактерицидної активності сироватки крові.
4. Методика визначення . бактерицидної активності сироватки крові.
5. Мета використання моноклональних антитіл.
6. Схематична методика отримання моноклональних антитіл.

Тема 11. Імуноферментний аналіз

Методи імуноферментного аналізу дозволяють виявити рівень гуморального імунітету організму тварин і його здатність адекватно реагувати на збудника інфекційних хвороб.

В останній час в діагностиці вірусних хвороб тварин і людей застосовують методи, які передбачають використання мічених ферментами антигенів чи антитіл. Ця група методів носить назву імуноферментного аналізу (ІФА) або ELISA-метод (enzyme-linked immunosorbent assay).

Для цього методу та його модифікацій характерна висока специфічність, за рівнем чутливості вони перевищують усі інші серологічні реакції.

ІФА використовують для виявлення та ідентифікації вірусу та антитіл до нього (у тварин-реконвалісцентів, тобто ті що вже переохворіли) або дослідження рівня поствакцинальних антитіл.

Суть методу полягає у тому, що до вірусомісного матеріалу (мазки-відбитки з органів) додають імуноферментний кон'югат (антитіла, зв'язані з ферментом), а після утворення комплексу антиген – антитіло, міченого ферментом, визначають цей комплекс за допомогою субстрату який під дією ферменту розкладається, утворюючи забарвлений продукт ферментативної реакції, що виявляється візуально, або за допомогою світлового мікроскопа.

Для ідентифікації вірусного антигену імуноферментний тест застосовують у двох варіантах: гістохімічному та твердофазному.

Гістохімічний варіант ІФА, або імунопероксидазна реакція

Імунопероксидазна реакція аналогічна методу імунофлюоресценції, але відрізняється тим, що для постановки реакції використовуються антитіла, мічені не флюорохромом, а ферментом пероксидазою, і облік результатів проводять не під люмінісцентним мікроскопом, а під звичайним світловим.

Матеріалом для виявлення вірусних антигенів можуть бути мазки-відбитки різних органів, парафінові гістозрізи, культура клітин, мазки крові.

Імунопероксидазну реакцію ставлять і прямому та непрямому варіантах.

Прямий гістохімічний метод ІФА. При виявленні антигену з допомогою прямого імунопероксидазного методу використовують противірусні кон'югати, тобто кон'югати, отримані з антитіл, що виділені з специфічної сироватки, у поєднанні з ферментом.

Препарати з досліджуваним вірусом фіксують охолодженням до мінус 10°C ацетоном упродовж 10 хв, висушують на повітрі і наносять 0,2–0,3 мл імунопероксидазного кон'югату (антитіла до певного вірусу, мічені ферментом) у робочому розведенні, яке вказане на ампулі. Інкують 1–2 год у вологій камері за температури 37°C, промивають 15 хв фізіологічним розчином, ополіскують дистильованою водою, висушують на повітрі. Потім наносять субстрат і через 10 хв інкубації промивають за попередньою схемою. Субстратом є діамінобензидинтетрахлорид до якого перед реакцією додають перекис водню.

Результати враховують з допомогою світлового мікроскопа. Субстрат під дією пероксидази розщеплюється, утворюючи продукт реакції блакитного кольору, який швидко переходить у коричневий. В препараті виявляють або дифузне жовто-коричнє забарвлення, або гранули коричнево-чорного кольору. В контрольних препаратах забарвлення не виявляють (рис. 18).

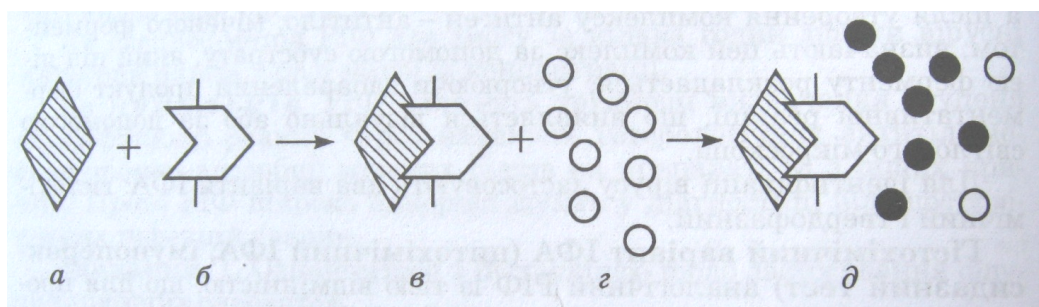


Рис. 18. Схема виявлення антигену прямим пероксидазним методом: а — зріз тканини, що містить антиген; б — антитіла, мічені ферментом; в — комплекс антиген-антитіло-фермент; г — субстрат; д — комплекс антиген-антитіло — фермент, виявлений за допомогою субстрату

Непрямий гістохімічний метод ІФА (рис. 19). Перевагою непрямого методу є універсальність мічених антивидових імуноглобулінів, а також більша чутливість його у порівнянні з прямим.

Для виявлення невідомого вірусного антигену мазки-відбитки фіксують охолодженим ацетоном протягом 10 хв. Препарати висушують і наносять специфічну до певного вірусу (імуно) сироватку (не мічену). Інкують у вологій камері при 37°C 1–2 год. Промивають фізіологічним розчином, висушують і наносять антивидовий імунопероксидазний кон'югат (антивидова сироватка, яка містить антитіла до першої сироватки, мічена ферментом), у робочому розведенні. Інкують при 37°C 1–6 год, промивають і висушують, як і за прямого методу; наносять кілька крапель бензидинового субстрату, інкують упродовж 5–10 хв, знову промивають, висушують на повітрі і мікроскопують.

Якщо у препараті є вірусспецифічний антиген, то він утворює з специфічною сироваткою комплекс антиген – антитіло, до якого приєднуються антитіла антивидової сироватки, мічені ферментом. Утворюється більш складний комплекс антиген – антитіло – антивидове антитіло – фермент. Його виявляють за нанесеним субстратом, який розщеплюється ферментом і утворює жовто-коричневий продукт реакції, який виявляють під мікроскопом, як і за прямого варіанту.

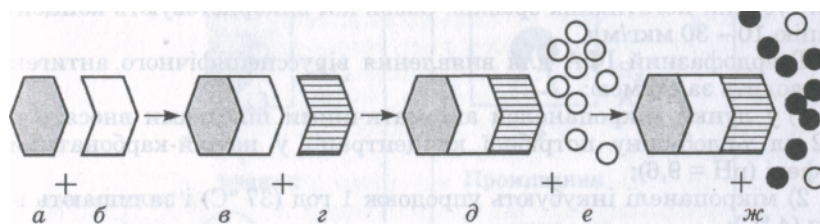


Рис. 19. Схема виявлення антигену непрямим імунопероксидазним методом:

а — мазок тканини, що містить антиген; б — специфічні антитіла до антигену; в — комплекс антиген-антитіло; г — антивидові антитіла, мічені ферментом; д — комплекс антиген-антитіло — антивидове антитіло, мічене ферментом; е — субстрат; ж — комплекс, виявлений за допомогою субстрату

Твердофазний імуноферментний аналіз. Методи твердофазного ІФА ґрунтуються на застосуванні антитіл фіксованих на нерозчинних носіях. Твердофазними носіями можуть бути синтетичні

полімери з високою сорбційною здатністю, а саме полістеролові пластинки, пробірки, нітроцелюлозні мембрани. В останній час широко використовують полістеролові мікропанелі, які мають лунки з плоским дном. Їх застосування дає змогу у короткий час досліджувати значну кількість зразків сироватки на наявність антитіл у хворих тварин чи реконвалісцентів та іншого матеріалу на наявність антигену (збудника хвороби).

Для ідентифікації антигену, з допомогою твердофазного ІФА в різних біологічних рідинах найчастіше використовують метод подвійних антитіл – «сендвіч». Лунки мікропанелей сенсibilізують специфічною до невідомого антигену сироваткою, (краще гама глобуліном, виділеним з сироватки). Для цього у лунки вносять сироватку у певному розведенні та інкубують 1 год (37°C) а потім залишають на ніч (4°C). Вранці панелі промивають тричі буферним розчином і вносять досліджуваній антиген, у контрольні лунки – наперед відомі позитивний та негативний антигени, інкубують 2 год (37°C). Промивають і вносять імуноферментний кон'югат (специфічна сироватка мічена ферментом), інкубують 1–2 год (37°C). Промивають і вносять розчин субстрату, витримують у темряві 5–20 хв за кімнатної температури. Реакцію зупиняють, додаючи розчин сірчаної кислоти. Реакцію оцінюють візуально за відмінністю у забарвленні контрольних та дослідних зразків. Позитивні зразки мають оранжево-коричневе забарвлення, негативний контроль зовсім не забарвлений або блідо-жовтий.

Наявність антитіл у сироватці крові визначається непрямим методом твердофазного ІФА показано на рис 20.

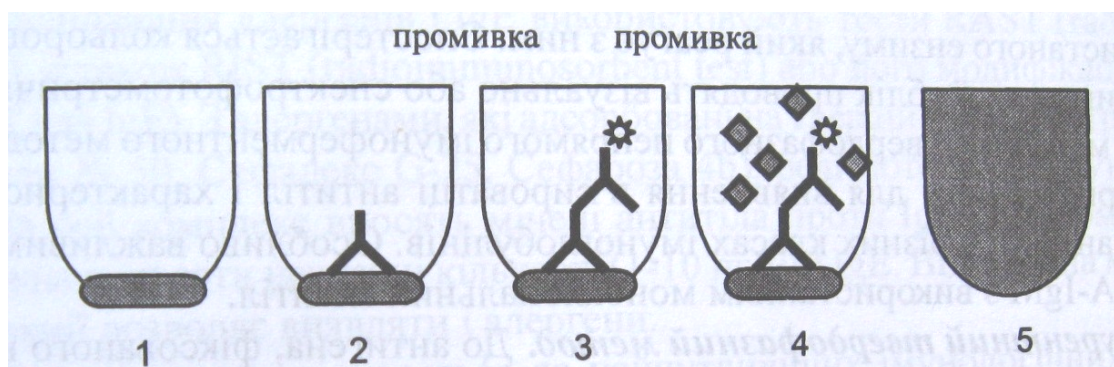


Рис. 20. Схема імуноферментного методу:

1 – тверда фаза з фіксованим антигеном; 2 – немічене антитіло, зв'язане з антигеном; 3 – антиглобулін, кон'югований з ферментом, зв'язаний з комплексом антиген-антитіло; 4 – внесення субстрату, який розкладається ферментом; 5 – зміна забарвлення в лунці свідчить про присутність ферменту, а значить, відповідно антитіла.

Облік результатів можна здійснювати з допомогою спектрофотометрії та фотоелектроколориметрії. Процес зчитування керується комп'ютером, який перераховує величину ферментативної активності у концентрацію антигену чи антитіл з швидкістю 100 зразків за хв.

Питання для самоконтролю:

1. Суть методу ІФА.
2. Суть гістохімічного методу ІФА.
3. Суть прямого варіанту гістохімічного методу ІФА.
4. Суть непрямого варіанту гістохімічного методу ІФА.
5. Суть твердофазного методу ІФА.

Тема 12. Біопрепарати: виготовлення, контроль та застосування

Біопрепаратами називають продукти, які виготовляють з мікробів, збудників інфекційних захворювань, або від тварин продуцентів імунізованих мікробними АГ і застосовують з метою специфічної профілактики терапії та діагностики інфекційних захворювань.

Біопрепарати класифікують за їх призначенням і методами виготовлення. За призначенням є 6 категорій біопрепаратів: вакцини, профілактично – лікувальні сироватки, антигени (діагностикуми) для серологічних реакцій, діагностичні сироватки, діагностичні алергени, бактеріофаги.

1. Вакцини застосовують з метою активної імунізації сільськогосподарських тварин проти інфекційних хвороб. Виготовляють живі ослаблені (атенуйовані), убиті (інактивовані) вакцини. Живі та убиті вакцини можуть бути корпускулярні (з цілих мікробних клітин). Убиті: хімічно очищені (з антигенних фракцій) і анатоксини.

Живі вакцини готують із ослаблених штамів мікробів. При введенні такої вакцини в організм культура повинна приживатись і розмножуватись, не викликаючи клінічного проявлення хвороби, що призводить до створення імунітету високої напруженості та довготривалості. Переваги живих вакцин у тому, що вони створюють через 10–14 днів міцний і тривалий (до 12 місяців і більше) імунітет, вводяться одноразово. До недоліків: зберігання в особливих умовах за температури + 4–10 °С, можливі після вакцинальні ускладнення (підвищення температури тіла, зменшення або відсутність апетиту, кволість). Сухі (ліофілізовані) живі вакцини зберігаються довше і більш стабільні.

Убиті (інактивовані) вакцини. Для виготовлення убитих вакцин використовують штами з високою вірулентністю і повноцінними антигенними властивостями. Штами вирощують на середовищах в спеціальних ємкостях (танкерах) до певної концентрації, після чого інактивують фізичним (теплом, УФ-опроміненням) або хімічним (формаліном, фенолом, спиртом, мертиололом) способами.

Хімічні вакцини готують із очищених антигенів. Вони не містять баластних речовин і пов'язаних з ними негативних факторів та ефективні в малих дозах.

Анатоксини викликають утворення активного антитоксичного імунітету. Готують їх з фільтратів культури токсигенних мікробів (збудник правця, ботулізму). До фільтратів додають формальдегід і суміш витримують у термостаті, внаслідок чого екзотоксин втрачає токсичність, але зберігає антигенність та імуногенність.

Ефективність убитих вакцин нижче ніж живих тому їх вводять двічі з інтервалом у 10-14 днів. Тривалість імунітету від 4 до 6 міс.

Для посилення імуногенності вакцинних препаратів їх змішують з неспецифічними речовинами – ад'ювантами (помічник). Ад'юванти – колоїдні речовини на яких осідають бактеріальні антигени, внаслідок чого вони повільніше всмоктуються з тканин у кров і діють довше. Створюється "депо" вакцини в тканині куди вона введена. Тому такі вакцини з ад'ювантами називають концентрованими, преципітованими, депонованими, адсорбованими. Ад'ювантом є гідроокис алюмінію, алюмінієвий галун, мінеральні масла (емульсинвакцини).

В залежності від кількості сероваріантів або видів бактерій, її називають моновалентною, дивалентною, полівалентною, асоційованою. Полівалентні вакцини містять декілька сероваріантів збудника одного виду. Асоційовані містять декілька видів збудників та сероваріантів одного мікроба. Наприклад, асоційована вакцина проти паратифу, пастерельозу та диплококової септицемії поросят.

Виготовлені вакцини обов'язково проходять державний контроль на чистоту, нешкідливість та активність або імуногенність.

Чистоту перевіряють мікроскопією (живі – посівом на живильне середовище – росте тільки вакцинний штам). Убиті повинні бути стерильними. Нешкідливість – на лабораторних тваринах при різних способах введення вакцини, при цьому тварини не повинні гинуть. Активність також перевіряють на лабораторних тваринах або на тих кому буде застосовуватись вакцина. Для цього вакцинують групу тварин, а потім через 10–14 днів вводять смертельну дозу збудника. Вакциновані

усі повинні залишитись живими, а контрольні (не вакциновані) усі повинні загинути.

2. Лікувально-профілактичні сироватки застосовують з метою пасивної імунізації тварин проти інфекційних хвороб та їх специфічного лікування. Лікувальну сироватку одержують з крові тварин-продуцентів, гіперімунізованих вірулентними штамами збудника інфекції або анатоксином за спеціальними схемами. Продуцентами є коні, воли та ін тварини. Якщо продуцент чутливий до збудника (хворіє), то його спочатку імунізують вакциною, а потім через певні інтервали вводять вірулентну культуру збудника. Щоб не допустити імунологічного паралічу, гіперімунізацію починають з малих доз антигена які поступово збільшують до сотен і тисяч смертельних доз. В результаті в організмі продуцента в сироватці нагромаджується велика кількість антитіл. Отримана специфічна сироватка, введена субкутанно в малих дозах створює імунітет через 1–2 год, який продовжується до 10–14 днів. Лікувальна доза в кілька разів більша ніж профілактична. При введенні гетерологічних(іншого виду тварин) сироваток треба завжди пам'ятати, що вони можуть викликати анафілактичний шок.

3. Гіперімунної сироватки, очищеної від неімунних фракцій готують імунний гамаглобулін, профілактично-лікувальна ефективність якого в декілька разів вища. Також застосовують неспецифічні нормальні гама і бета глобуліни які отримані від здорових тварин. Вони підвищують природню резистентність, стимулюють ріст і розвиток молодняка. Антитоксичні, (специфічні) сироватки називають антитоксинами. Отримують їх аналогічним шляхом, гіперімунізуючи тварин продуцентів не мікробними збудниками, а їх токсинами.

При відсутності гіперімунної сироватки іноді застосовують сироватку реконвалісцентів – тварин, які одужали від хвороби особливо від змішаних інфекцій. В організмі цих тварин циркулюють специфічні антитіла до декількох збудників (Тема 2).

3. Діагностичні сироватки в умовах лабораторії застосовують для контролю серологічних реакцій та ідентифікації мікоорганізмів. Готують їх також шляхом гіперімунізації тварин найчастіше кролів. Консервують їх фенолом, борною кислотою, гліцерином або висушують ліофілізацією. (Тема 2).

4. Антигени (діагностикуми) для серологічних реакцій поділяють на корпускулярні (цілі бактерії та еритроцити) і розчинні. Бактеріальні антигени можуть бути живими або убитими нагріванням. (Тема 2).

5. Алергени застосовують для алергічної діагностики хронічних

інфекційних хвороб – сапу, туберкульозу, бруцельозу, туляремії. З убитої і розрушеної культури готують фільтрат, який при нанесенні на кон'юнктиву або введений інтракутанно у сенсibiliзованих (хворих) тварин викликає місцеву алергічну реакцію.

6. Бактеріофаги (віруси бактерій) застосовують у терапії тварин при деяких інфекціях і у фагодіагностиці сибірки, бруцельозу, паратифозних(кишкових) інфекцій. Бактеріофаги готують методом культивування-пасажуванням у бактеріальних культурах з наступною фільтрацією. Фільтрат буде являтися бактеріофагом.

Питання для самоконтролю:

1. Біопрепарати та їх класифікація.
2. Вакцини: виготовлення, класифікація.
3. Депоновані вакцини.
4. Контроль вакцин.
5. Лікувально-профілактичні та діагностичні сироватки.
6. Антигени, алергени, бактеріофаги: виготовлення та використання.

Тема 13. Методи діагностики алергії у тварин

Алергічні реакції або реакції гіперчутливості, як і інші імунологічні реакції, можуть бути викликані чужерідними або власними антигенами і від-повідно називаються гетероімуними або аутоімуними. Антигени, які викликають, називають **алергенами**. Алергічні реакції є причиною розвитку багатьох патологічних процесів та хвороб. Разом з тим клітинні реакції гіперчутливості є компонентом захисту від збудників інфекцій. Розвиток гіперчутливості організму тварин до антигенів (алергенів) називають сенсibiliзацією.

У залежності від механізму розвитку алергічної реакції їх поділяють на 4 типи, перші три з яких відносять до гіперчутливості негайного типу (ГНТ), обумовлені синтезом та циркуляцією анти-тіл до певного антигену (гуморальний імунітет), а четвертий – до гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ), обумовлений сенсibiliзацією Т-лімфоцитів до певного антигену (клітинний імунітет).

I тип носить назву анафілактичний (реагіновий) – пов'язаний з утворенням антитіл класу Ig E, та їх фіксацією на поверхні базофілів та тучних клітин, які виділяють медіатори запального процесу (гістамін, серотонін, гепарин та ін.). Прикладом патологій є анафі-

лактичний шок (медикаментозний), бронхіальна астма, поліноз, алергічний кон'юнктивіт, алергічний риніт, алергічна кропивниця.

II тип – цитотоксичний. Виробляються антитіла Ig G, IgM проти антигенів, що входять в склад клітинних мембран (власних, змінених клітин). Відбувається руйнування клітин внаслідок реакції антиген – антитіло через активацію комплементу. Приклади патологій: лікарська алергія, гемолітична анемія, аутосенсibiliзація до антигенів щитовидної залози, базальних мембран нирок, шкіри та ін.

III тип – імунокомплексний – пов'язаний з утворенням імуних комплексів через активацію комплементу і лейкоцитів. Імунні комплекси (АГ–АТ) з малою молекулярною масою не фагоцитуються, не виводяться з організму, накопичуються у тканинах або ендотелії судин, активують комплемент, стимулюють утворення брадикініну та інших медіаторів, що призводить до ураження тканин і запалення (сироваткова хвороба, аутоімунні захворювання, гломерулонефрити, ускладнення після інфекційних хвороб).

IV тип – клітинний. Цей тип реакцій відрізняється від трьох попередніх тим, що не залежить від циркулюючих чи зв'язаних антитіл, а зумовлений сенсibiliзованими Т-лімфоцитами, накопичення їх у місці попадання антигену-алергену, їх активацією за участю макрофагів: алергічні явища при інфекційних захворюваннях (туберкульоз, бруцельоз, мікози), алергічний контактний дерматит, відторгнення трансплантату (табл. 3).

3. Порівняльна характеристика ГНТ і ГСТ

<i>ГНТ – В-залежні реакції</i>	<i>ГСТ – Т-залежні реакції</i>
Розвиваються через кілька секунд, хвилин після введення повторної дози алергену	Розвиваються через кілька годин (6–8), діб після введення повторної дози алергену
Пов'язані з утворенням і циркуляцією IgE, IgM, IgG	Не пов'язані з утворенням імуноглобулінів, а пов'язані з утворенням сенсibiliзованих Т-лімфоцитів
Передаються від донора до реципієнта через сироватку крові, в якій містяться імуноглобуліни — пасивна сенсibiliзація	Передаються від донора до реципієнта через лімфоїдні клітини – адоптивна (від англ. adopt присвоювати) сенсibiliзація —

	вид пасивної сенсибілізації
Як правило, спричинюються алергеном білкової природи	Спричинюються мікробами, пухлинними клітинами, різними органічними та неорганічними хімічними речовинами при довготривалому контакті
Формуються в тканинах, багатих на кровonosні судини, і в непосмугованих м'язах	Формуються в будь-яких органах і тканинах
Місцеві реакції, що виявляють стан гіперчутливості, розвиваються через 15–30 хв	Місцеві реакції розвиваються через 6–8 год і сягають максимуму розвитку через 1–2 доби

Алергічні діагностичні проби

У практиці ветеринарної медицини використовують очну та внутрішньошкірну алергічні проби з метою діагностики хронічних інфекційних хвороб таких як туберкульоз, бруцельоз, сап та ін. Якщо в організмі присутній збудник, наприклад туберкульозу (організм сенсибілізований до цього збудника), то у ділянці введення алергену виникає запальний процес у вигляді потовщення складки шкіри або витікання з ока гнійного ексудату. В даному випадку має місце алергічна реакція гіперчутливості сповільненого типу.

Очна алергічна проба виконується з допомогою очних піпеток (перед роботою стерилізують кип'ятінням). Алерген (3–4 краплі) вводять на кон'юнктиву одного ока. Результати враховують через 12 та 24 год після введення алергену. Позитивна реакція характеризується почервонінням, набряканням кон'юнктиви та виділенням гнійного ексудату.

Внутрішньошкірна алергічна проба є найбільш розповсюдженою при діагностиці туберкульозу, бруцельозу. Великій рогатій худобі та коням алерген вводять у середню частину шиї; вівцям у підхвостову складку, повіко або з внутрішнього боку стегна; свиням у вухо з зовнішньої сторони; курям у борідку; собакам та хутровим звірам у ліктьову складку чи з внутрішнього боку стегна.

Алерген вводять у центр вистриженої ділянки шкіри, продезинфікованої спиртом, використовуючи безголкові ін'єктори. Результат враховують через 72 год. Позитивна реакція характеризується

потовщенням шкірної складки (на 2мм і більше), підвищенням місцевої температури, набряком, у свиней почервонінням.

Питання для самоконтролю:

1. Класифікація алергічних реакцій.
2. Механізм та відмінності ГНТ та ГСТ.
3. Проведення очної алергічної проби.
4. Проведення шкірної алергічної проби.

Зміст

Вступ	3
Тема 1. Імунологічні методи діагностики інфекційних захворювань	4
Завдання та методи ветеринарної імунології	5
Ознайомлення з імунологічною лабораторією, обладнанням, матеріалами та правилами роботи у ній	7
Тема 2. Виготовлення антигенів та сироваток крові	9
Виготовлення клітинних антигенів	9
Виготовлення гуморальних (розчинних) антигенів	10
Способи отримання крові у тварин	12
Отримання імунних (специфічних) сироваток крові	13
Тема 3. Серологічні методи визначення антигенів та антитіл	15
Реакція аглютинації	15
Крапельний (пластинчатий) метод РА	17
Пластинчата РА – розбенгал проба (РБП)	18
Реакція гемаглютинації (РГА) та непрямой гемаглютинації (РНГА)	18
Тема 4. Реакція преципітації (РП)	20
Реакція кільцепреципітації	21
Реакція дифузійної преципітації (РДП)	22
Реакція нейтралізації (РН) за Ерліхом	24
Тема 5. Реакція зв'язування комплементу (РЗК)	25
Реакція тривалого зв'язування комплементу (РТЗК)	27
Тема 6. Реакція імуофлуоресценції (РІФ) або метод флуоресцюючих антитіл (МФА)	28
Тема 7. Визначення імунного статусу організму	31
Методи визначення факторів неспецифічної резистентності макроорганізму	32
Опсоно-фагоцитарна реакція (ОФР)	33
Тема 8. Визначення кількості Т-лімфоцитів	35
Визначення кількості В-лімфоцитів	36
Тема 9. Кількісне визначення імуноглобулінів різних класів	37
Визначення нормальних (природних) антитіл	40
Тема 10. Визначення лізоцимної та бактерицидної активності сироватки крові	41
Визначення бактерицидної активності сироватки крові	43
Методи отримання моноклональних антитіл	44
Тема 11. Імуоферментний аналіз	45
Гістохімічний варіант ІФА, або імунопероксидазна реакція	46
Твердофазний імуоферментний аналіз	48
Тема 12. Біопрепарати: виготовлення, контроль та застосування	49
Тема 13. Методи діагностики алергії у тварин	52
Список рекомендованої літератури	58

Список рекомендованої літератури

1. Аббас А. К. , Ліхтман Е. Г., Піллай Ш. Основи імунології: функції та розлади імунної системи. 6-те вид. Київ : Медицина, 2020. 328 с.
2. Ветеринарна мікробіологія : рекомендації до самостійного вивчення тем, які не розглядаються в аудиторіях / уклад. І. О. Рубленко та ін. Біла Церква, 2019. 37 с.
3. Довідник з ветеринарної імунології / А. В Андрійчук та ін. Біла Церква : БНАУ, 2019. 108 с.
4. Калініна О. С. Лабораторна діагностика вірусних хвороб тварин : навч. посіб. Львів : ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького, 2020. 64 с.
5. Коцюмбас І. Я., Калініна О. С., Авдосеєва І. К., Регенчук В. В. Інфекційний перитоніт котів : методичні рекомендації. Львів : ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, ЛНУВМБ імені С.З . Гжицького, 2020. 16 с.
6. Кулак В.В. , Чорний М. В., Сілінська О. І. Вплив гігієнічних факторів на інвазування кролів *Psoroptus Cuniculi* та змінення імунного статусу їх організму. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2018. № 1.
7. Ivaschenko N. Priority areas development of veterinary immunobiology trough the example of V. P. Ryzhenko scientific activity. *Social and Human Sciences*. 2019. № 4 (24).

Навчальне видання

ВЕТЕРИНАРНА ІМУНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

Укладач: **Лумедзе Тетяна Сеїт-Меметівна**

Формат 60x841/16 Ум. друк. арк. 3,6

Тираж 30 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК №4490 від 20.02.2013р.