

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания

для обучающихся по организации и проведению самостоятельной работы

по дисциплине «ОБЩАЯ ИММУНОЛОГИЯ»

для студентов специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия»

Введение

Методические рекомендации дисциплины «Общая иммунология» составлены в соответствии с Федеральным Государственным образовательным стандартом высшего образования по специальности 30.05.01 – «Медицинская биохимия».

Содержание программы подготовки студентов предусматривает ознакомление студентов на профессиональном уровне с современными методами иммунологии в медицинских исследованиях, существующими подходами к решению диагностических и медицинских задач.

Общая иммунология - это раздел медицины, который занимается диагностикой и лечением нежелательных, обычно чрезмерно выраженных иммунных реакций на вещества из окружающей среды.

Основной **целью** пособия является получение необходимого объема знаний, навыков и умений в области иммунологии. Материал, собранный в разделах пособия, посвящен иммунологическим механизмам аллергических заболеваний, диагностике, лечению.

Объем информации отличается доступностью изложения основных аспектов этиологии, патогенеза, клиники, диагностики и лечения аллергических заболеваний.

Курс позволяет студентам приобрести знания о механизмах воздействия аллергенов на организм человека и функционировании его в новых условиях.

В основу подготовки студентов положено изучение современных достижений в области иммунологии. Практические занятия проводятся с целью выработки навыков клинического мышления и углубления теоретических знаний.

Для современного специалиста важно формирование системных фундаментальных знаний, умений и навыков по биохимическим закономерностям, представляющих важность при подготовке студентов медиков к системному восприятию естественнонаучных и профессиональных дисциплин, формировании у них навыков биохимического анализа, необходимых для последующей практической деятельности.

Целью данного пособия является формирование общепрофессиональных компетенций будущего специалиста по специальности 30.05.01 Медицинская биохимия.

Знания, полученные в ходе освоения дисциплины, применяются при написании выпускной квалификационной работы, при прохождении преддипломной практики, а также в дальнейшей профессиональной деятельности.

В результате освоения дисциплины обучающийся должен:

ЗНАТЬ:

- о месте иммунологии, как медико-биологической науки, среди клинических медицинских дисциплин;
- о наиболее актуальных направлениях в иммунологии;

- об иммунобиотехнологии, как важнейшем звене иммунологии по разработке и получению высокоэффективных диагностических и лечебных средств на основе новых технологий.
- строение и функции иммунной системы;
- клеточные и гуморальные факторы врожденного и приобретенного иммунитета;
- межклеточные взаимодействия в иммунной системе;
- гормоны и медиаторы иммунной системы
- основы иммуногенетики
- болезни иммунной системы (иммунопатологию)
- принципы назначения иммуномодулирующих препаратов;
- основные принципы лечения иммунодефицитов.

УМЕТЬ:

- оценить иммунный статус в норме и патологии;
- обследовать пациентов с иммунопатологией;
- оценить иммунные нарушения при различных заболеваниях;
- собрать иммунологический анамнез

ВЛАДЕТЬ:

- современными методами иммунного анализа;
- тестами оценки иммунного статуса человека 1 и 2 уровня

Общая характеристика самостоятельной работы студента при изучении дисциплины

Самостоятельная работа проводится в виде самостоятельного изучения литературы и подготовки заданий. Основной целью этих видов самостоятельной работы является улучшение профессиональной подготовки специалистов высшей квалификации, направленное на формирование действенной системы фундаментальных и профессиональных знаний, умений и навыков, которые они могли бы свободно и самостоятельно применять в практической деятельности.

В ходе постановки целей и задач необходимо учитывать, что их выполнение направлено не только на формирование общеучебных умений и навыков, но и определяется рамками данной предметной области.

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала курсистудент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану- графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна

отводится на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных. Все это поможет в решении задач, тестировании и подготовке к экзамену.

Методические рекомендации при подготовке к творческим проектам

Изучение основных разделов биологической химии заканчивается разработкой творческих заданий, на которых обобщается весь материал по данной части учебной программы.

Творческие задания представляет собой не только одну из форм текущего контроля, но и одну из активных форм учебных занятий, проводимых как в виде беседы преподавателя со студентами, так и в виде занятия, посвященного обсуждению определенной темы.

Целями творческих заданий являются: выяснение у студентов знаний, их углубление (повышение) и закрепление по той или иной теме курса; формирование у студентов навыков анализа теоретических проблем на основе самостоятельного изучения учебной и научной литературы.

Основная задача творческих заданий – пробудить у студента стремление к чтению и использованию дополнительной литературы. На коллоквиум могут выносятся как проблемные (нередко спорные теоретические вопросы), так и вопросы, требующие самостоятельного изучения, а также более глубокой проработки.

На самостоятельную подготовку к творческому заданию студенту отводится 1-2 недели. Подготовка включает в себя изучение рекомендованной литературы и составление конспекта.

Методические рекомендации по подготовке к экзамену

Подготовка к экзамену по общей биохимии должна быть систематической и планомерной. Результат освоения теоретического материала, написание и осмысление конспектов по основным и дополнительным темам, решение задач, а также проведение лабораторного практикума, закрепление практических навыков и построение логической взаимосвязи между теорией и практикой – все это является залогом усвоения полного объема полученных знаний и достаточной базой для подготовки к экзаменам.

Перед сдачей экзамена рекомендуется просмотреть все источники библиографического списка и собственные конспекты. Вопросы к экзамену приведены в рабочей программе дисциплины.

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала курса «Общая иммунология» студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных. Все это поможет в решении задач, тестировании и подготовке к зачету.

Методические указания по подготовке к лабораторным занятиям

При подготовке к практическим занятиям рекомендуется изучить контрольные вопросы по данному занятию, теоретический материал, изложенный в пособии, обратить внимание на технику безопасности и изучить методику проведения опытов. В протоколе должны быть отражены следующие разделы:

1. Номер занятия.
2. Название работы.
3. Цель работы.
4. Принцип метода и химический механизм реакций.
5. Расчеты.
6. Результаты.
7. Выводы.

Методические рекомендации по подготовке к индивидуальным заданиям

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала курса студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных. Все это поможет в решении задач, тестировании и

подготовке к контрольным точкам.

Методические рекомендации при подготовке к докладам

Изучение основных разделов заканчивается разработкой творческих заданий, на которых обобщается весь материал по данной части учебной программы.

Творческие задания представляет собой не только одну из форм текущего контроля, но и одну из активных форм учебных занятий, проводимых как в виде беседы преподавателя со студентами, так и в виде занятия, посвященного обсуждению определенной темы.

Целями творческих заданий являются: выяснение у студентов знаний, их углубление (повышение) и закрепление по той или иной теме курса; формирование у студентов навыков анализа теоретических проблем на основе самостоятельного изучения учебной и научной литературы.

Основная задача творческих заданий – пробудить у студента стремление к чтению и использованию дополнительной литературы. На занятия могут выноситься как проблемные (нередко спорные теоретические вопросы), так и вопросы, требующие самостоятельного изучения, а также более глубокой проработки.

На самостоятельную подготовку к творческому заданию студенту отводится 1-2 недели. Подготовка включает в себя изучение рекомендованной литературы и составление конспекта.

Методические указания к тестам

Самостоятельные ответы на вопросы, как и решение задач существенно дополняют лекции и самостоятельно пройденный материал по дисциплине. В процессе анализа и решения задач студенты расширяют и углубляют знания, полученные из лекционного курса и учебников, учатся глубже понимать биохимические законы и формулы, разбираться в их особенностях, границах применения, приобретают умение применять общие закономерности к конкретным случаям. В процессе решения задач вырабатываются навыки вычислений, работы со справочной литературой, таблицами. Решение задач не только способствует закреплению знаний и тренировке в применении изучаемых законов, но и формирует особый стиль умственной деятельности, особый метод подхода к биохимическим явлениям.

На занятиях используются:

- 1) задачи-упражнения, помогающие студентам приобрести твёрдые навыки расчёта и вычислений;
- 2) задачи для демонстрации практического применения тех или иных законов;
- 3) задачи для закрепления и контроля знаний;
- 4) познавательные задачи.

Несмотря на различие в видах задач, их решение можно проводить по следующему общему плану, который надо продиктовать студентам:

1. прочесть условие задачи; посмотреть, все ли термины в условиях задачи известны и

понятны (если что-то неясно, следует обратиться к учебнику, просмотреть решения предыдущих задач, посоветоваться с преподавателем);

2. написать схему реакции, если это необходимо;

3. установить, какие законы и соотношения могут быть использованы при решении данной задачи;

4. составить уравнения, которые характеризуют рассматриваемые явления с количественной стороны;

5. решить эти уравнения относительно неизвестных величин, получить ответ.

Методические указания по подготовке к практическим занятиям

При подготовке к практическим занятиям рекомендуется изучить вопросы по данному занятию, теоретический материал, изложенный в литературе и интернет-источниках.

На подготовку к практическому заданию студенту отводится 1 неделя. Подготовка включает в себя изучение рекомендованной литературы, составление конспекта, подготовка к ответам на вопросы.

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины

Перечень основной литературы

1. Просекова, Е. В. Иммунологические методы исследования в клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / Е. В. Просекова, Н. Р. Забелина, В. А. Сабыныч. — Владивосток: ТГМУ, 2016. — 120 с. — ISBN 978-5-98301-070-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/3095>
2. Дроздов, А. А. Заболевания крови. Полный справочник [Электронный ресурс] / А. А. Дроздов, М. В. Дроздова. — Электрон. текстовые данные. — Саратов : Научная книга, 2019. — 370 с. — 978-5-9758-1847-8. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/80202.html>
3. Иммунология : учебное пособие для вузов / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, Р. Х. Равилов [и др.]. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2026. — 188 с. — ISBN 978-5-507-50520-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/443303>

Перечень дополнительной литературы:

1. Анохина, Н. В. Общая и клиническая иммунология [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н. В. Анохина. — 2-е изд. — Электрон. текстовые данные. — Саратов : Научная книга, 2019. — 159 с. — 978-5-9758-1755-6. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/81032.html>
2. Александрова Т.П. Физико-химические методы анализа [Электронный ресурс]: учебное пособие / Т.П. Александрова, А.И. Апарнев, А.А. Казакова. — Электрон. текстовые данные. — Новосибирск: Новосибирский государственный технический университет, 2014. — 90 с. — 978-5-7782-2394-3. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/44699.html>
3. Тугуз, А. Р. Иммунология : учебное пособие / А. Р. Тугуз ; составитель А. Р. Тугуз. — Майкоп : АГУ, 2018. — 176 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/146134>
4. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия: учебное пособие / С. В. Лелевич. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>
5. Клиническая биохимия: учебное пособие / Т. П. Бондарь, К. С. Светлицкий, Н. И. Ковалевич [и др.]. — Ставрополь: СтГМУ, 2020. — 204 с. — ISBN 978-5-89822-635-0. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/216803>
6. Шабалдин, А. В. Иммунология: учебное пособие / А. В. Шабалдин. — практикум. — Кемерово: КемГУ, 2023. — 84 с. — ISBN 978-5-8353-3070-6. — Текст: электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/392204>
7. Дьячкова, С. Я. Иммунология : учебное пособие для вузов / С. Я. Дьячкова. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 168 с. — ISBN 978-5-8114-9986-1. — Текст : электронный // Лань :

электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/208682>

8. Левкова, Е. А. Иммунология и клиническая иммунология. Аутоиммунные заболевания : учебное пособие для вузов / Е. А. Левкова, О. Г. Елисютина, О. В. Аплевич. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 44 с. — ISBN 978-5-507-48425-6. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/380675>

9. Левкова, Е. А. Клиническая иммунология: первичные иммунодефициты : учебное пособие для вузов / Е. А. Левкова, О. В. Аплевич, Н. С. Татаурщикова. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 68 с. — ISBN 978-5-507-49370-8. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/417734>

10. Иммунология: курс лекций с практическими заданиями : учебное пособие / Н. И. Потатуркина-Нестерова, И. С. Немова, М. Н. Артамонова, А. С. Хитрова. — Ульяновск : УлГУ, 2022. — 114 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/314507> бное пособие для студентов медицинских вузов / Л.В. Ганковская [и др.]. — Электрон. текстовые данные. — М. : ПедиатрЪ, 2014. — 124 с. — 978-5-906332-39-4. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/70802.html>

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания

для обучающихся по организации и проведению практических работ

по дисциплине «ОБЩАЯ ИММУНОЛОГИЯ»

для студентов специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия»

Ставрополь, 2026 г.

Основные представления о строении и функции иммунной системы. Современные представления о защите организма от инфекций, иммунотерапия и иммунопрофилактика.

Вопросы

1. Органы системы иммунитета, строение, функция.
 - Костный мозг.
 - Тимус.
 - Селезенка.
 - Лимфатические узлы.
 - Лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми и кожей.
2. Клетки – участники иммунных процессов, происхождение, функция.
 - Этапы гемопоэза.
 - Фагоцитарная ветвь: (нейтрофилы, моноциты, фиксированные макрофаги, белые отростчатые эпидермоциты, эпителиоидные клетки).
 - Лимфоциты, Т-клетки (этапы созревания, положительная и отрицательная селекция, дифференцировка), В-лимфоциты.
 - NK-клетки.
 - Базофилы, эозинофилы, тучные клетки.
 - Прочие клетки (эндотелий, тромбоциты, эритроциты, фибробласты).
 - Пути рециркуляции лимфоцитов, распределение лимфоидных клеток в различных тканях.
3. Молекулы – эффекторы и регуляторы системы иммунитета.
 - Понятие «кластерные детерминанты».
 - Интегрины, селектины.
 - Рецепторы (Ig, комплемента, цитокинов, апоптоза, ко-стимуляции, TCR, BCR).
 - МНС.
 - Цитокины, хемокины, ростовые факторы, цитокиновая сеть.
 - Иммуноглобулины (строение, классы, субклассы, идиотип, антиидиотипические антитела).
 - Система комплемента (классический и альтернативный пути, МАК).
 - Белки острой фазы воспаления.
 - Другие гуморальные факторы (гормоны, витамины, микроэлементы).
4. Защита от инфекций в норме.
 - Особенности антигенов инфекционных агентов, определяющие ход иммунного ответа.

- Локализация инфекционных агентов (внеклеточные и внутриклеточные микроорганизмы).
- Проникновение микроорганизмов в организм (условия проникновения, защитные механизмы первой линии обороны, понятие о «первичном очаге иммунного ответа», формирование воспаления).
- Вторичный иммунный ответ (особенности формирования, в зависимости от вида возбудителя).
- Модификация активности иммунной системы компонентами патогенов.
- Факторы, позволяющие микроорганизмам избегать действия защитных механизмов.

5. Иммунопрофилактика.

- Теоретические основы иммунопрофилактики (основные принципы, механизмы и обоснование ограничений иммунопрофилактики).
- Традиционные вакцины (классификация, прививочный календарь).
- Противопоказания и осложнения профилактических прививок.
- Оказание помощи при возникновении прививочных осложнений.
- Вакцины нового типа.

Свойства антигена. Антигены. Понятие об антигене, гаптене.

Вопросы

1. Исследование органов иммунной системы (клинические, инструментальные и лабораторные методы).
2. Методы исследования гуморального звена иммунной защиты (количественные методы, нормы, диагностическая значимость, показания к назначению):
 - Иммуноглобулины.
 - Белки острой фазы.
 - Система комплемента.
3. Способы изучения реактивных реакций.
4. Методы исследования клеточного звена иммунного ответа (методика, нормы, диагностическая значимость, показания к назначению).
 - Проточная цитометрия.
 - Функциональные пробы (пролиферативные и нагрузочные тесты, кожные пробы).
5. Исследование фагоцитоза.
6. Классификация иммунопатологии.
7. Понятие об иммунодефицитах, классификация.

8. Первичные иммунодефициты (определение, этиология, классификация).
9. Общие проявления первичных иммунодефицитов.
10. Иммунодефициты с преимущественным дефектом антителообразования:
 - наследственные гипогаммаглобулинемии – болезнь Брутона, ТКИД,
 - селективный дефицит IgA,
 - иммунодефицит субклассов IgG,
 - селективный дефицит IgM,
 - транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста.
11. Комбинированные иммунодефицитные заболевания (ИДЗ):
 - дефицит пуриноклеотидфосфорилазы (PNP),
 - синдром Незеловфа.
12. ИДЗ, ассоциированные с другими значительными дефектами:
 - Синдром Вискотта-Олдрича,
 - Синдром Ди-Джорджа,
 - Гипер IgE синдром.
13. Общий переменный иммунодефицит.
14. Другие иммунодефициты:
 - Синдром Луи-Бар (атаксическая телеангиоэктазия).
15. Дефекты системы фагоцитоза:
 - Болезнь Чедиака-Хигаси.
 - Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.
 - Хроническая гранулематозная болезнь.
 - Синдром ленивых лейкоцитов.
16. Дефекты системы комплемента:
 - Дефекты классического пути.
 - Дефекты альтернативного пути.
 - Дефекты образования МАК.
 - Наследственный ангионевротический отек.

Вторичные иммунодефициты, клиника, диагностика, методы иммунокоррекции.

Вопросы

1. Онтогенез иммунной системы:
 - Формирование иммунной системы во внутриутробном периоде.
 - Особенности иммунитета у детей.

- Иммунная система в пожилом возрасте.
 - Иммунитет и беременность.
2. Приобретенные формы вторичных иммунодефицитов:
 - Бактериальные инфекции.
 - Персистирующие вирусные инфекции.
 - Врожденные вирусные инфекции.
 - Инфекции иммунной системы.
 3. Индуцированные формы вторичных иммунодефицитов:
 - Иммунодефициты, вызываемые лекарственными препаратами (стероиды, циклофосфамид, азатиоприн, метотрексат, циклоспорин, такролимус, рапамицин, антибиотики).
 - Нарушение питания (белково-энергетическая недостаточность, ожирение, дефицит микроэлементов и витаминов).
 - Иммунотоксическое влияние экологических и производственных факторов.
 - Влияние ионизирующего излучения на иммунитет.
 - Иммунодефициты при наркозе и хирургических вмешательствах.
 - Иммунодефициты, индуцированные другими патологическими состояниями (ожоги, уремия и т.д.).
 4. Спонтанная форма вторичного иммунодефицита.
 5. Общие механизмы формирования иммунной недостаточности.
 6. Обследование при подозрении на вторичный иммунодефицит:
 - Клинические проявления.
 - Лабораторная диагностика.
 7. Общие принципы терапии.
 8. Классификация иммуностропных средств.
 9. Препараты на основе природных факторов:
 - Препараты микробного происхождения.
 - Препараты на основе компонентов клеточной стенки бактерий.
 - Препараты на основе нуклеиновых кислот.
 - Прочие препараты микробного происхождения.
 10. Препараты, происходящие из организма человека и высших позвоночных:
 - Препараты иммуноглобулинов.
 - Пептидные препараты (пептиды тимусного происхождения, пептиды иной природы).
 11. Препараты на основе цитокинов:
 - ИНТЕРФЕРОНЫ.

- Интерлейкины и другие цитокины.

12. Синтетические препараты:

- Циклические соединения.
- Полиэлектролиты.
- Синтетические аналоги природных иммуномодуляторов.
- Другие синтетические иммуномодуляторы.

13. Препараты других групп (витамины, микроэлементы, адаптогены и др.).

Иммунологические механизмы аутоиммунных процессов, общие принципы лечения.

Иммунный надзор как фактор предотвращения опухолевого роста, современные принципы иммунотерапии опухолей.

Контрольные вопросы:

1. Аутоотолерантность и ее механизмы:
 - Механизмы центрального звена индукции толерантности.
 - Механизмы периферического звена индукции толерантности.
 - Селекция аутореактивных В-лимфоцитов.
2. Естественные (нормальные) антитела.
3. Искусственная иммунологическая толерантность.
4. Основные типы аутоиммунных заболеваний:
 - Критерии, определяющие аутоиммунную природу заболеваний (по Э.Витебскому).
 - Общая характеристика аутоиммунной патологии.
 - Различия между системными и органоспецифическими аутоиммунными заболеваниями.
5. Механизмы индукции аутоиммунных процессов:
 - Нарушение изоляции «иммунологически привилегированных» органов и тканей.
 - Экспрессия молекул МНС II класса «неантигенпрезентирующими» клетками.
 - Перекрестное реагирование аутологичных и бактериальных антигенных детерминант.
 - Модификация структуры собственных белков организма.
 - Нарушение процесса отрицательной селекции.
 - Увеличение продукции естественных аутоантител.
 - Нарушения в регуляторной цитокиновой сети.
6. Иммунологические механизмы аутоиммунных поражений:
 - Аутоиммунные процессы гуморального типа.

- Аутоиммунные процессы клеточного типа.
7. Наиболее значимые аутоиммунные заболевания (диагностика):
 - Аутоиммунные поражения щитовидной железы.
 - Инсулинзависимый сахарный диабет.
 - Ревматоидный артрит.
 - Системная красная волчанка.
 - Болезни системы крови.
 8. Общие принципы лечения аутоиммунной патологии.
 9. Иммунный надзор за опухолевым ростом (концепция Ф.М.Бернета).
 10. Антигены, ассоциированные с опухолями.
 11. Механизмы избегания опухолями иммунного надзора:
 - Слабая экспрессия молекул МНС I класса.
 - Отсутствие экспрессии молекул CD80 и CD86.
 - Антитела, индуцируемые опухолевым антигеном, защищают опухоли.
 - Формирование иммунологической толерантности к опухолевому антигену.
 - Опухоли продуцируют вещества, их защищающие.
 12. Современные способы иммунотерапии опухолей:
 - Непосредственная цитокиноterapia.
 - Адоптивная цитокиноterapia (LAK, CIK, TIL).
 - Опухолевые вакцины.
 - Применение иммунотоксичных и других модификаций антител.
 - Создание искусственных белков.
 13. Принципы лечения лимфопролиферативных заболеваний.

Иммунохимические основы аллергических заболеваний. Лекарственная аллергия, клинические варианты, принципы лечения и профилактики.

Контрольные вопросы:

1. Аллергены:
 - Ингаляционные – растительного и животного происхождения.
 - Пищевые.
 - Лекарственные.
 - Инфекционные.
 - Промышленные.
2. IgE-опосредованные реакции и другие типы гиперчувствительности:

- Терминология: аллергия, анафилаксия, атопия, сенсибилизация.
 - Свойства IgE (структура, рецепторы, клетки-продуценты и их локализация, метаболизм, регуляция синтеза).
 - Роль IgE в норме и при патологии.
 - Реагиновые аллергические реакции и их стадии.
 - Медиаторы аллергических реакций.
 - Гиперчувствительность, связанная с нереагиновыми антителами:
 - Цитотоксические реакции.
 - Иммунокомплексная патология.
 - Гиперчувствительность замедленного типа.
3. Псевдоаллергические реакции.
4. Диагностика аллергических реакций ГНТ и ГЗТ.
5. Основные аллергические заболевания:
- Аллергический ринит.
 - Бронхиальная астма.
 - Крапивница.
 - Пищевая аллергия.
 - Атопический дерматит.
 - Аллергический контактный дерматит.
 - Многоформная экссудативная эритема и синдром Стивенса-Джонсона.
 - Анафилактический шок.
6. Принципы иммунотерапии аллергических заболеваний.
7. Лекарственная аллергия:
- Классификация побочных реакций на лекарственные препараты (Паттерсон Р.).
 - Факторы риска развития лекарственной аллергии.
 - Клиническая классификация аллергических реакций на лекарственные средства.
 - Основы постановки диагноза лекарственной аллергии.
 - Клинические варианты аллергических реакций на лекарственные вещества.
 - Принципы лечения и профилактики лекарственной аллергии.

Первичные иммунодефициты. Иммунодиагностика.

Вопросы

1. Классификация иммунодефицитов с преимущественным нарушением антител?
2. Иммунологические нарушения при врожденных иммунодефицитах с нарушением антител?
3. Наследственная гипогаммаглобулинемия, клинические проявления?

- 4.Общая переменная иммунная недостаточность, клинические проявления?
- 5.Селективный дефицит IgA, транзиторная младенческая гипогаммаглобулинемия, клинические проявления?
- 6.Иммунодиагностика гуморальных иммунодефицитов?
- 7.Принципы лечения иммунодефицитов с преимущественным нарушением антител?

Первичные иммунодефициты. Иммунодиагностика.

Вопросы

- 1.Иммунологические нарушения при врожденных дефектах фагоцитоза?
- 2.Хроническая гранулематозная болезнь, клинические проявления?
- 3.Синдром Джоба, клинические проявления?
- 4.Иммунодиагностика врожденных дефектов фагоцитоза?
- 5.Иммунологические нарушения при врожденных дефектах комплемента?
- 6.Наследственный ангионевротический отек Квинке, клинические проявления?
- 7.Иммунодиагностика врожденных дефектов комплемента?

Вторичные иммунодефициты

Вопросы

1. Определение и классификация вторичных иммунодефицитных состояний (ВИД)?
2. Основные повреждающие факторы, приводящие к ВИД?
3. Основные клинические признаки ВИД?
4. Перечень «болезней-масок» ВИД?
5. Иммунодиагностика ВИД?

ВИЧ-инфекция

Вопросы

1. Определение и классификация ВИЧ-инфекции?
2. Этиология ВИЧ-инфекции?
3. Патогенез ВИЧ-инфекции?
4. Клинические проявления ВИЧ-инфекции?
5. Диагностика, особенности иммунного статуса ВИЧ-инфицированных?
6. Принципы терапии ВИЧ-инфекции?

Аутоиммунные заболевания

Вопросы

1. Классификация аутоиммунных заболеваний?
2. Иммунопатогенетические нарушения при аутоиммунных заболеваниях?

3. Иммунодиагностика аутоиммунных заболеваний?
4. Основные принципы терапии аутоиммунных заболеваний?

Иммунограмма в клинической практике. Аллергодиагностика

Вопросы

1. Организация иммунологической лаборатории?
2. Показания к назначению иммунологического обследования?
3. Оценка системы фагоцитоза?
4. Фенотипирование клеток иммунной системы?
5. Методы определения иммуноглобулинов?
6. Аллергодиагностика in vivo и in vitro?

Первичные и вторичные иммунодефициты

Вопросы

1. Классификация ПИДС (ТКИД, дефекты гуморального звена, системы фагоцитоза, комплемента)?
2. Генные нарушения и иммунопатогенез ПИДС?
3. Клинические проявления ПИДС?
4. Диагностика ПИДС?
5. Современные методы лечения (генная терапия, трансплантация костного мозга) ПИДС?
6. ВИДС (этиология, иммунопатогенез, клинические проявления, диагностика)?

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины

Перечень основной литературы

1. Просекова, Е. В. Иммунологические методы исследования в клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / Е. В. Просекова, Н. Р. Забелина, В. А. Сабыныч. — Владивосток: ТГМУ, 2016. — 120 с. — ISBN 978-5-98301-070-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/3095>
4. Дроздов, А. А. Заболевания крови. Полный справочник [Электронный ресурс] / А. А. Дроздов, М. В. Дроздова. — Электрон. текстовые данные. — Саратов : Научная книга, 2019. — 370 с. — 978-5-9758-1847-8. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/80202.html>
5. Иммунология : учебное пособие для вузов / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, Р. Х. Равилов [и др.]. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2026. — 188 с. — ISBN 978-5-507-50520-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/443303>

Перечень дополнительной литературы:

10. 1. Анохина, Н. В. Общая и клиническая иммунология [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н. В. Анохина. — 2-е изд. — Электрон. текстовые данные. — Саратов : Научная книга, 2019. — 159 с. — 978-5-9758-1755-6. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/81032.html>
11. Александрова Т.П. Физико-химические методы анализа [Электронный ресурс]: учебное пособие / Т.П. Александрова, А.И. Апарнев, А.А. Казакова. — Электрон. текстовые данные. — Новосибирск: Новосибирский государственный технический университет, 2014. — 90 с. — 978-5-7782-2394-3.—Режим доступа:<http://www.iprbookshop.ru/44699.html>
12. Тугуз, А. Р. Иммунология : учебное пособие / А. Р. Тугуз ; составитель А. Р. Тугуз. — Майкоп : АГУ, 2018. — 176 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL:

<https://e.lanbook.com/book/146134>

13. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия: учебное пособие / С. В. Лелевич. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>
 14. Клиническая биохимия: учебное пособие / Т. П. Бондарь, К. С. Светлицкий, Н. И. Ковалевич [и др.]. — Ставрополь: СтГМУ, 2020. — 204 с. — ISBN 978-5-89822-635-0. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/216803>
 15. Шабалдин, А. В. Иммунология: учебное пособие / А. В. Шабалдин. — практикум. — Кемерово: КеМГУ, 2023. — 84 с. — ISBN 978-5-8353-3070-6. — Текст: электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/392204>
 16. Дьячкова, С. Я. Иммунология : учебное пособие для вузов / С. Я. Дьячкова. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 168 с. — ISBN 978-5-8114-9986-1. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/208682>
 17. Левкова, Е. А. Иммунология и клиническая иммунология. Аутоиммунные заболевания : учебное пособие для вузов / Е. А. Левкова, О. Г. Елисютина, О. В. Аплевич. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 44 с. — ISBN 978-5-507-48425-6. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/380675>
 18. Левкова, Е. А. Клиническая иммунология: первичные иммунодефициты : учебное пособие для вузов / Е. А. Левкова, О. В. Аплевич, Н. С. Татаурщикова. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 68 с. — ISBN 978-5-507-49370-8. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/417734>
 10. Иммунология: курс лекций с практическими заданиями : учебное пособие / Н. И. Потатуркина-Нестерова, И. С. Немова, М. Н. Артамонова, А. С. Хитрова. — Ульяновск : УлГУ, 2022. — 114 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/314507>
- бное пособие для студентов медицинских вузов / Л.В. Ганковская [и др.]. — Электрон. текстовые данные. — М. : ПедиатрЪ, 2014. — 124 с. — 978-5-906332-39-4. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/70802.html>

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания

для обучающихся по организации и проведению лабораторных работ
по дисциплине «ОБЩАЯ ИММУНОЛОГИЯ»
для студентов специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия»

Лабораторная работа № 1

ЛАБОРАТОРИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ МНОГОПРОФИЛЬНОГО ЛПУ. ЗАДАЧИ. СТРУКТУРА. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ. ЭТАПЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

План занятия

1. Структура лаборатории клинической иммунологии. Задачи. Техническая оснащенность. Автоматизация.
2. Основы техники безопасности. Санэпидрежим. Дезинфицирующие средства. Правила работы с дезинфицирующими средствами.
3. Этапы лабораторных иммунологических исследований: преаналитический, аналитический, постаналитический. Задачи этапов, характеристика возможных ошибок.
4. Виды биоматериала, поступающего на исследование. Техника обработки, получение проб, условия хранения проб.

Практические навыки:

Прием биоматериала, оценка качества биоматериала и сопроводительной документации, маркировка, регистрация, приготовление проб для анализа;

освоение работы:

- с центрифугой;
- микроскопом;
- на иономере;
- с термостатом;
- техника обработки лабораторной посуды, подготовка посуды к работе, правила утилизации биоматериала;
- знания основ санэпидрежима;
- умение оформлять сопроводительные документы и результаты анализов.

Методические указания к выполнению заданий

В лаборатории клинической иммунологии проводятся исследования биоматериала, относящегося к группе потенциально инфицированного (кровь, суспензия клеток, сыворотка, плазма, секреты, моча и др.). Это требует соблюдения основных требований техники безопасности, санэпидрежима.

Правила работы в лаборатории клинической иммунологии:

- биоматериал студентам раздает преподаватель или ответственный по группе;
- работу с биоматериалом проводят в халатах, шапочках, перчатках;
- на рабочем месте не должны находиться предметы, не относящиеся к работе;
- на рабочем столе необходимо иметь емкость с дезинфицирующим раствором и

ветошью;

- рабочее место после работы дезинфицируют;
- при попадании биоматериала на спецодежду или рабочую поверхность место дезинфицируют, одежду замачивают в кастрюле с дезинфицирующим раствором;
- одноразовый вспомогательный материал, использованные пробирки, инструменты и другие предметы, контактировавшие с биоматериалом, дезинфицируют в соответствующих маркированных емкостях с дезинфицирующим раствором;
- в конце занятия рабочее место приводят в порядок, перчатки погружают в соответствующую промаркированную емкость с дезинфицирующим раствором, моют руки.

Освоение техники работы с приборами:

- на центрифуге (центрифугирование смешанной слюны);
- на ионометре (измерение pH готового буферного раствора);
- с микроскопом (подсчет клеток мазка крови).

После выполнения задания провести обработку использованного оборудования: центрифугу и ионометр протереть ветошью, смоченной дезинфицирующим раствором; объектив микроскопа иммерсионного протереть сухой чистой ветошью, окуляры – 70° спиртом. Объективы установить в нерабочее положение.

Освоение техники обработки посуды и утилизации биоматериала

Утилизация биоматериала:

- а) сгустки крови сбрасывают в специальную маркированную емкость и засыпают сухой хлорной известью в соотношении 1 ч. сухой хлорной извести и 5 ч. сгустков крови;
- б) остатки слюны обрабатывают тем же способом;
- в) остатки сыворотки сливают в маркированную емкость и заливают дезинфицирующим раствором в соотношении 1:5.

Обработка лабораторной посуды:

- а) стеклянные пробирки после освобождения биоматериала закладывают в маркированную тару, заливают дезинфицирующим раствором, и после часа инкубации пробирки проходят этап предстерилизационной обработки и стерилизации;
- б) пластиковую одноразовую посуду после обработки в дезинфицирующем растворе сбрасывают в специальный пакет для лабораторных отходов;
- в) пластиковую посуду многоразового использования после обработки дезраствором тщательно промывают проточной, затем дистиллированной водой, подсушивают и готовят к работе;
- г) силиконируют посуду, предназначенную для работы с клетками (раствор для

силиконирования: 1 ч. силикона + 10 – 16 ч. эфира).

Контрольные вопросы

1. Приготовление растворов, используемых для подщелачивания или подкисления основных рабочих растворов
2. Приготовление забуференного раствора.
3. Постааналитический этап иммунологических исследований, утилизация биоматериала.
4. Способы консервации крови в иммунологических исследованиях. Примеры ряда консервантов, их приготовление, использование, хранение.
5. Техника забора крови, получения сыворотки. Способы хранения.

Лабораторная работа № 2

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП ЛАБОРАТОРНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

План занятия

1. Техника работы на основных приборах, используемых в иммунологической лаборатории.
2. Техника электро- и пожаробезопасности.
3. Техника приготовления реактивов для проведения иммунологических исследований.

Практические навыки:

- умение работать:
 - на вертикальном фотометре;
 - на хемиллюминометре;
 - с пипеточными дозаторами;
 - на аналитических весах.
- умение приготовить реактивы и измерить их объем.

Методические указания к выполнению заданий

Выдачу химических реактивов проводит преподаватель или старший лаборант лаборатории. Работу на приборах контролирует преподаватель.

Реактивы и оборудование:

- вертикальный фотометр, предназначенный для определения оптической плотности исследуемых образцов в ИФА методе;
- пипеточные дозаторы со сменными наконечниками, предназначенные для точного измерения объема растворов: физиологического, ЭДТА, гепарина, глюкозы, лимонной кислоты.

Освоение работы на анализаторах:

- освоение работы на фотометре по программам «Качественный метод определения антител» и «Количественный метод определения антител» на

примере определения антител к тиреоглобулину (ТГ);

- ввод маркировки образца;
- проведение дозирования раствора одно- и многоканальным дозатором в разных объемах.

После выполнения заданий приборы выключить, провести обработку поверхностей приборов и дозаторов дезинфицирующим средством.

Использованную посуду, наконечники, остатки клеточной суспензии, сыворотки обработать согласно требованиям санэпидрежима.

Освоение принципов приготовления реактивов

Приготовление физраствора (изотонический раствор NaCl):

физиологический раствор 0,9 %-ный, pH 7,0-7,2: взвесить на аналитических весах 9 г химически чистого хлорида натрия (NaCl), растворить его в небольшом количестве дистиллированной воды и довести объем до 1 л дистиллированной водой; измерить pH полученного раствора на иономере. Доведение pH до нужных показателей проводится одномолярным раствором HCl (1 моль/л) или NaOH. Хранится физраствор при комнатной температуре.

Приготовление антикоагулянтов

Раствор гепарина с концентрацией 200 ЕД/мл: к 1 мл исходного раствора гепарина (коммерческий), содержащего 5000 ЕД/мл гепарина, добавить 24 мл стерильного физиологического раствора pH 7,2. Хранить при + 4 °С. Конечная концентрация в смеси с кровью 20 ЕД/мл (10 мл крови + 1 мл гепарина с содержанием 200 ЕД/мл, или 0,1 мл гепарина + 1 мл крови).

2,7 и 6 %-ные растворы ЭДТА (трилон Б) – динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты – Na ЭДТА: взвесить 2,7 г ЭДТА и 6 г ЭДТА; растворить каждую навеску в 100 мл стерильного физиологического раствора pH 7,2. Хранить при + 4 °С. Учитывая, что ЭДТА способствует снижению экспрессии CD4, а гепарин угнетает фагоцитоз, в клинической лабораторной иммунологии используют смесь гепарина и ЭДТА.

Смесь гепарина и ЭДТА: смешать 1 ч. гепарина с содержанием 200 ЕД/мл с 2 объемами 6 %-ного ЭДТА. Хранить при + 4 °С. Используют в соотношении 1:10 с кровью (1 мл антикоагулянта + 10 мл крови).

Приготовление цитратного гемостабилизатора (для предотвращения агрегации тромбоцитов). Взвесить 13,2 г цитрата натрия (хч), 4,8 г лимонной кислоты (хч), 25 г глюкозы (хч); довести до 1 л стерильной дистиллированной водой. Оптимальное значение pH 6,5. Хранить при + 4 °С. Используется в соотношении к лейкоцитарной взвеси 1 : 7. Записать основные моменты занятия и этапы лабораторных иммунологических исследований.

Контрольные вопросы

1. Техника безопасности при работе в лаборатории. Утилизация биоматериала.
2. Преаналитический этап иммунологических исследований. Прием биоматериала, требования к его качеству, обработка крови, получение и хранение проб сыворотки крови.
3. Приготовление цитратного гемостабилизатора.
4. Приготовление антикоагулянтов.

Лабораторные работы № 3-4

СИСТЕМА ЛИМФОЦИТОВ. Т-И В-ЗВЕНО ИММУНИТЕТА. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА Т-ЛИМФОЦИТОВ (Е-РОК). ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА В-ЛИМФОЦИТОВ (ЕАС-РОК)

План занятия

1. Характеристика маркеров Т- и В-лимфоцитов.
2. Принцип метода. Компоненты реакции.
3. Приготовление реактивов.
4. Подготовка биоматериала к анализу (выделение лимфоцитов).
5. Техника проведения анализа, учет результатов, контроль качества.

Практические навыки:

умение:

- подсчитать содержание лейкоцитов в камере Горяева и в мазке крови пообщепринятым лабораторным методам;
- выделить лимфоциты в градиенте плотности;
- подсчитать абсолютное и относительное содержание лимфоцитов в выделенной популяции;
- приготовить раствор краски по Романовскому – Гимзе и покрасить мазки;
- приготовить реактивы для анализа;
- работать с центрифугой, микроскопом, пользоваться камерой Горяева.

Методические указания к выполнению заданий

На поверхности как В-лимфоцитов, так и Т-лимфоцитов имеются рецепторы. Важнейшие маркеры, характерные для В-лимфоцитов, – рецепторы иммуноглобулиновой природы. Для их выявления используют метод иммунофлюоресценции с мембранными иммуноглобулинами. Добавляя к лимфоцитам антисыворотку против иммуноглобулинов человека, меченных флюорохромом, можно подсчитать лимфоциты, несущие иммуноглобулиновые детерминанты, т. е. В-лимфоциты.

Кроме того, В-лимфоциты, как и Т-лимфоциты, можно определить по наличию на их мембране рецепторов к эритроцитам барана. (Е-РОК, ЕАС-РОК, розеткообразные клетки). Принцип метода заключается в выявлении Т- и В-клеток по их способности образовывать «розетки» с бараными эритроцитами. «Розетки» представляют собой лимфоцит, окруженный тремя или более эритроцитами барана. Процент содержания Т- и В- лимфоцитов определяется подсчетом числа «розеток» на 200 лимфоцитов.

Определение числа Т- и В-лимфоцитов имеет важное значение для диагностики иммунодефицитных состояний, оценки гуморального и клеточного иммунитета, выявления лимфопролиферативных, инфекционных и других заболеваний, для контроля за их лечением.

У здоровых людей В-лимфоциты составляют 20 – 30 % общего числа лимфоцитов; Т-лимфоциты – 50 – 70 %, около 10 % лимфоцитов не имеют рецепторов для Т- и В- лимфоцитов.

Реактивы и оборудование:

- раствор фиколл-верографина в градиенте плотности (для выделения лимфоцитов);
- раствор Хенкса или среды 199 (готовые);
- раствор глютаральдегида (для фиксации клеток);
- метанол;
- краски по Романовскому – Гимзе (для окраски мазков);
- эритроциты барана;
- смесь ЕАС (эритроциты барана, нагруженные АТ в среде комплемента) для определения количества В-лимфоцитов;
- центрифуга, микроскоп, камера Горяева;
- ареометр или денситометр (для измерения плотности раствора);
- силиконированные или пластмассовые пробирки;
- предметные стекла (обезжиренные).

Приготовление реактивов:

1) раствор фиколл-верографина (для выделения лимфоцитов):
из раствора 76 %-ного верографина приготовить 33,8 %-ный верографин (плотность – 1020 – 1025): 33,9 мл 76 %-ного верографина + 42,1 мл, дистиллированной воды = 76 мл 33,8 %-ного верографина; из фиколла приготовить 9 %-ный раствор: 10,8 г фиколла + 109,2 мл воды = 120 мл 9% фиколла; соединить 7 ч. верографина и 16 ч. фиколла: 52,5 мл верографина + 120 мл фиколла = 172,5 мл раствора фиколл-

верографина (плотность – 1,077). Плотность измерить ареометром. Для лучшего растворения использовать воду, подогретую до 37 °С. К верографину добавлять раствор фиколла, а не наоборот;

2) эритроциты барана: используют эритроциты одного животного или смесь, полученную от нескольких. Эритроциты можно хранить в течение двух недель при + 4 °С в растворе Олсвера. Перед употреблением эритроциты барана 3 – 4 раза отмыть фосфатным буфером и приготовить 0,5 %-ную по объему взвесь клеток;

3) раствор Олсвера : 2,05 г глюкозы + 0,8 г цитрата натрия + 0,42 г хлорида натрия + 100 мл дистиллированной воды (рН доводят до 6,1 раствором лимонной кислоты).

Выделение лимфоцитов из периферической крови для определения Т- и В-лимфоцитов:

- взятую из вены кровь в пробирку с ЭДТА (2,7 %-ный раствор ЭДТА из расчета 1 мл на 10 мл крови; рН 7,4) развести в соотношении 1 : 3 раствором Хенкса (без Ca^{++} и Mg^{++});

- в пробирку налить 3 мл раствора фиколл-верографина (плотность 1,077);

- с помощью пастеровской пипетки или шприца с длинной иглой осторожно наслоить 8 мл разведенной крови на раствор фиколлверографина, пробирки центрифугировать 30 мин в горизонтальном положении при 1500 об/мин;

- из белесого кольца, образовавшегося после центрифугирования на границе смеси фиколл-верографина и разведенной крови, осторожно пастеровской пипеткой собрать взвесь моноклеарных клеток. Биоматериал готов к анализу.

Техника постановки анализа

Для определения количества Т-клеток: концентрацию эритроцитов барана довести раствором Хенкса (или средой 199) до 0,5 %-ной концентрации; в силиконизированные или пластиковые пробирки объемом 1,2 мл внести 0,1 мл суспензии выделенных в градиенте лимфоцитов, довести раствором Хенкса или средой 199 до объема 2×10^6 мл; смесь инкубировать при 37 °С 5 мин, затем центрифугировать 5 мин при 750 об/мин и инкубировать 60 мин при + 12 °С; после инкубации клетки фиксируют глютаровым альдегидом (0,1 мл 0,8 %-ного раствора). Мазки фиксируют в метаноле (или смеси Никифорова), красят по Романовскому – Гимзе.

Для определения количества В-клеток: содержание лимфоцитов, выделенных в градиенте фиколл-верографина, довести раствором Хенкса или средой 199 до 2×10^6

мл; в силиконизированные или пластиковые пробирки внести 0,1 мл лимфоцитов и 0,1 мл 0,5 %-ного раствора ЕАС комплекса (эритроциты барана, нагруженные АТ в среде комплемента); смесь центрифугировать при 150 – 200 g/мин 5 мин.

Образовавшиеся «розетки» фиксируют, добавляя в пробирки 0,05 мл 3 %-ного раствора глутарового альдегида в фосфатном буфере. Фиксируют 20 мин при комнатной температуре и прекращают фиксацию добавлением избытка дистиллированной воды; затем клетки осаждают при центрифугировании (1000 об/мин).

Надосадочную жидкость удаляют. Оставшуюся взвесь тщательно пипетируют и заносят на хорошо обезжиренное стекло, которое потом высушивают на воздухе и фиксируют 5 мин в метаноле.

После окраски мазков по Романовскому – Гимзе препараты готовы для подсчета клеток. Время окрашивания – 17 – 20 мин в разведении 1:10.

Учет результатов

Полученные мазки Т- и В-клеток микроскопируют в иммерсионной системе микроскопа. Подсчитывают количество лимфоцитов, фиксирующих на своей поверхности 3 и более эритроцитов на 200 лимфоцитов.

Пересчет их количества на абсолютное число осуществляется по формуле: $\text{абс кол-во Е-РОК} = \text{абс. кол-во лейкоцитов} \times \% \text{ лимфоцитов} \times 10000$

Контрольные вопросы

1. Отличительные характеристики Т- и В-клеток
2. Основные функции Т-клеток.
3. Основные функции В-клеток.
4. Этапы получения клеточной взвеси с использованием градиента плотности.
5. В-система клеток. Субпопуляции. Методы идентификации.
6. Т-система клеток. Субпопуляции. Методы идентификации.

Лабораторная работа № 5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

План занятия

1. Принцип метода определения количества лейкоцитов и лимфоцитов.
2. Приготовление лейкоконцентрата и лимфоцитов из гепаринизированной крови.
3. Приготовить градиент плотности 1,077 – 1,078.

4. Разделение клеток на фиколл-верографине.

Практические навыки:

умение приготовить:

раствор для получения гепаринизированной крови;

мазки и лейкоконцентрат;

градиент плотности 1,077 – 1,078;

умение получить отдельные популяции лейкоцитов.

Методические указания к выполнению практических заданий

Клеточные реакции определения субпопуляций и функциональной активности ИКК проводят обычно в суспензии лейкоцитов или их отдельных популяций, которые выделяют из цельной крови. Большинство реакций можно ставить с использованием как суспензии очищенных клеточных популяций, так и с суспензией неразделенных лейкоцитов.

Принцип метода

Получение лейкоцитов основано на различиях удельной массы эритроцитов (1,097) и лейкоцитов (1,077). Сущность метода состоит в том, что кровь выдерживают при 37 °С в течение часа, в результате чего она расслаивается.

Нижний слой содержит преимущественно эритроциты (с примесью лейкоцитов), верхний слой представляет собой плазму, обогащенную лейкоцитами. Плазму отсасывают, клетки осаждают центрифугированием.

Реактивы и оборудование:

- раствор фиколл-верографина в градиенте плотности (для выделения лимфоцитов);
- центрифуга;
- камера Горяева;
- микроскоп;
- пробирки;
- кровь с гепарином;
- пипетки.

Приготовление реактивов:

- 1) раствор фиколл-верографина для выделения лимфоцитов:

- из раствора 76 %-ного верографина приготовить 33,8 %-ный раствор верографина (плотность 1,200): 33,9 мл 76 %-ного верогра-фина + 42,1 мл бидистиллированной воды или ЗФР = 76 мл раствора 33,8 %-ного верографина;
- из фиколла приготовить 9 %-ный раствор: 10,8 г фиколла + 109,2 мл воды = 120 мл 9 %-ного фиколла;
- соединить 52,5 мл верографина и 120 мл фиколла = 172,5мл раствора фиколл-верографина (плотность 1,077).

Плотность измерить ареометром. Для лучшего растворения ис-пользовать воду, подогретую до 37 °С. К верографину добавлять фиколл, а не наоборот;

2) забуференный физиологический раствор 0,15 моль/л; рН 7,2 – 7,4: взвесить 8,2 г хлористого натрия, 1,15 г натрия фосфорнокислого двухзамещенного, 0,2 г калия фосфорнокислого двухзамещенного; довести до 1 л дистиллированной водой; измерить рН на ионометре; хранить при комнатной температуре;

3) цитратный гемостабилизатор (для предотвращения агрегации тромбоцитов): взвесить 13,2 г цитрата натрия (хч), 4,8 г лимонной ки-слоты (хч), 25 г глюкозы (хч); довести до 1л стерильной дистиллиро-ванной водой. Оптимальное значение рН 6,5. Хранить при + 4 °С.

4) антикоагулянты: приготовление раствора гепарина с concentra-цией 200 ЕД/мл: к 1 мл исходного гепарина, содержащего 5000 ЕД/мл гепарина, добавить 24 мл стерильного физиологического раствора рН 7,2. Хранить при + 4 °С. Конечная концентрация в смеси с кровью 20 ЕД/мл (10 мл крови + 1 мл гепарина с содержанием 200 ЕД/мл, или 0,1 мл гепарина + 1 мл крови).

Техника постановки анализа

Выделение популяций лимфоцитов:

- кровь с антикоагулянтом развести в 2 раза ЗФР, осторожно перемешать;
- осторожно наслоить по краю пробирки раствор градиента плотности 1,077 – 1,078 на кровь в соотношении 1:1 или 1:2;
- центрифугировать при 1500 об/мин 15 мин;
- определить расположение слоя моноцитов;
- осторожно отобрать дозатором или стерильной пастеровской пипеткой белесоватое кольцо мононуклеаров (лимфоцитов) на границе плотности и разведенной крови, перенести в другую пробирку;
- отмыть дважды взвесь мононуклеаров ЗФР центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин;
- оставить 1мл осадка, оставшиеся (2мл) вылить;
- добавить к выделенным клеткам цитратного гемостабилизатора (1 ч.

стабилизатора) 7 ч. лейкоцитарной взвеси;

– подсчитать в камере Горяева количество выделенных клеток по общепринятым лабораторным методам;

– клеток должно быть не менее 80 %.

Контрольные вопросы

1. Техника приготовления «градиента плотности» 1,077 – 1,078.
2. Способы получения популяции лимфоцитов. Недостатки и преимущества.
3. Подсчет количества лимфоцитов (абсолютное и относительное количество).
4. Этапы получения клеточной взвеси с использованием градиента.

Лабораторная работа № 6-7

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ.

СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА. ОБЩАЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ

АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕМЕНТА

План занятия

1. Принцип метода определения общей гемолитической активности комплемента по 50 %-ному гемолизу. Значимость показателя.

2. Подготовка реактивов.

3. Подготовка образцов и вспомогательного материала.

4. Техника постановки анализа.

5. Учет результатов анализа.

Практические навыки:

– умение приготовить:

- . веронал-медиановый буфер;
- . раствор Олсвера;
- . стандартизованную 5 %-ную взвесь эритроцитов барана;
- . гемолитическую систему;

– умение: работать с ионометром, аналитическими весами, спектрофотометром;

- . построить калибровочную кривую.

Методические указания к выполнению практических заданий

Существуют два пути оценки активности компонентов:

1) определение общей гемолитической активности по титру (50 или 100 % гемолиза);

2) для более полной характеристики выраженности активации компонента – определение отдельных компонентов компонента (C3, C4, C5 и др.) методами РИД, ИФА, турбодиметрии.

Принцип метода

Общая активность компонента определяется в гемолитической системе, которую используют для реакции связывания компонента (эритроциты барана + специфическая антисыворотка). При взаимодействии сыворотки, содержащей компонент, с антикомпонентарной сывороткой происходит гемолиз эритроцитов. Гемолитическая активность компонента устанавливается по минимальному количеству свежей сыворотки, необходимой для лизиса 50 % эритроцитов, содержащихся в 1 мл стандартизованной гемолитической системы при 37 °С за час. Активность компонента выражается в 50 %-ных гемолитических единицах. У здорового человека система неактивна и уровень компонента сыворотки равен 40 – 80 CH₅₀. Активация компонента приводит к усилению фагоцитоза иммунных комплексов и бактерий; увеличению выхода ферментов из лизосом; стимуляции гистаминообразования с повышением проницаемости капилляров; усилению хемотаксиса; лизису клеток, на которых фиксирован компонент и т.д. В активации компонента участвуют ионы кальция и магния.

Реактивы и оборудование:

- веронал;
- медунал;
- глюкоза;
- цитрат натрия;
- хлористый натрий;
- гемолитическая сыворотка (готовая);
- эритроциты барана;
- фотоэлектроколориметр с кюветами толщиной 5 мм или спектрофотометр;
- центрифуга, центрифужные пробирки;
- холодильник, водяная баня;

- ионометр;
- пластмассовые пробирки для забора и хранения сыворотки.

Приготовление реактивов:

- 1) пятикратный веронал-медиаловый буфер с кальцием и магнием: 5,75 г веронала растворить в 500 мл горячей дистиллированной воды, охладить до 20 °С и добавить 3,75 г медиала; 85 г NaCl; 0,22 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 1 г $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, общий объем раствора довести до 2 л, pH раствора 7,3 – 7,4 (при необходимости pH скорректировать раствором NaOH или HCl), хранить до использования при + 4 °С;
- 2) раствор Олсвера: 0,8 г цитрата натрия, 2,05 г глюкозы, 0,4 г хлорида натрия растворить в 80 мл дистиллированной воды и довести объем до 100 мл, pH раствора довести до 6,1 раствором NaOH 1 моль/л. Подготовленный раствор стерилизовать кипячением на водяной бане 3 раза по 15 мин.;
- 3) эритроциты барана: свежую дефибрированную кровь барана смешать с равным объемом раствора Олсвера, хранить при + 4 °С, использовать после 3 – 4 дней стабилизации в течение 4 – 8 недель;
- 4) раствор гемолитической сыворотки: лиофилизированную сыворотку развести дистиллированной водой (титр разведения указан на флаконе). Хранить до использования при + 4 °С.

В день исследования приготовить:

1) рабочий раствор веронал-медиалового буфера с ионами Ca^{+++} и Mg^{+++} (ВМБ): к одному объему ВМБ добавить 4 объема дистиллированной воды. Хранить в холодильнике 2 ч;

2) для проведения анализа гемолитическую сыворотку развести ВМБ по трехкратному титру так, чтобы ее титр в 3 раза превышал рабочий титр, указанный на флаконе;

3) 5%-ную стандартизированную взвесь эритроцитов барана (при необходимости): эритроциты отмыть ВМБ, для чего центрифугировать несколько раз (до бесцветности) по 5 мин при 3000 об/мин. Из полученного осадка (принятого за 100 %) приготовить 5 %-ную взвесь эритроцитов: к 1 объему осадка добавить 17 объемов ВМБ^{++} . Для стандартизации необходимо 1 мл 5 %-ной взвеси эритроцитов смешать с 3 мл дистиллированной H_2O . Эритроциты лизируются при центрифугировании. Оптическая плотность (ОП) полученного гемоглобина должна соответствовать 1,1.

3) раствор гемолитической системы: к приготовленной стандартизированной системе взвеси эритроцитов медленно, при постоянном помешивании добавить

равный объем приготовленной гемолитической сыворотки в тройном титре. Смесь инкубировать 30 мин в термостате при 37 °С для сенсibilизации эритроцитов. Хранится смесь 2 – 3 ч (можно приготовить гемолитическую сыворотку впрок для длительного хранения – 2 – 4 недели при + 4 °С).

Техника постановки анализа

Исследуемую сыворотку развести ВМБ⁺⁺ 1:10 (0,5 мл + 4,5 мл); разлить в 10 пробирок в объеме от 0,05 до 0,5 мл с разницей между от-дельными пробирками в 0,05 мл; сыворотку довести буферным раствором до объема 1,0 мл; затем в каждую пробирку добавить по 1,0 мл раствора стандартной гемолитической системы; пробирки встряхнуть и инкубировать 60 мин в термостате при 37 °С, затем охладить 10 мин в холодильнике при + 2 + 4 °С и центрифугировать 10 мин при 1500 – 2000 об/мин.

Одновременно поставить контроль по отсутствию гемолиза (1,0 мл раствора сенсibilизированных эритроцитов и 1,0 мл ВМБ).

Учет результатов

Степень гемолиза определяется на ФЭК (при длине волны 400 – 480 нм) в кювете толщиной 5 мм или на спектрофотометре (541 нм). Процент гемолиза можно высчитать по числовым значениям экстинции по формуле

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{\text{ЕОП} \cdot 100}{\text{ЕК}},$$

где ЕОП – показатель экстинции опыта, ЕК – показатель экстинции контроля (100 % гемолиза).

За единицу гемолитической активности комплемента (СН50) принимают его количество, способствующее 50 %-ному лизису 0,5 мл сенсibilизированных эритроцитов. Для расчета 50 %-ных гемолитических единиц комплемента в 1 мл исследуемой сыворотки (X) используется формула

$$X = 1/V_i,$$

где V_i – объем сыворотки (1:10), соответствующий 1 СН50.

Процент гемолиза можно рассчитать также с помощью *калибровочной кривой*. Для каждого ФЭК необходимо построить свою калибровочную кривую и использовать ее при последующих титрованиях комплемента.

Для приготовления шкалы гемолиза необходимо приготовить 4 мл стандартизированной 5 %-ной взвеси эритроцитов.

Смешать этот раствор с 12 мл дистиллированной H_2O . В результате лизиса эритроцитов весь содержащийся в них гемоглобин выходит в раствор (100 % гемолиз). Из полученного раствора гемоглобина готовится шкала гемолиза.

Полученные разведения измеряются на ФЭК при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 0,5 см и строится график зависимости показателя оптической плотности от «процента гемолиза».

Контрольные вопросы

1. Система комплемента. Пути активации.
2. Контроль качества РИД. Критерии надежности метода.
3. Постановка РИД для определения СЗ, контрольные материалы.

Лабораторная работа № 8-9

Т-СИСТЕМА ЛИМФОЦИТОВ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ. ЛИМФОЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ТЕСТ

План занятия

1. Клинический анализ крови. Характеристика параметров.
2. Принцип метода и вариант реакций цитотоксичности. ЦТТ с анти-Т-сывороткой.
3. Характеристика компонентов реакции. Подготовка к проведению ЦТТ.
4. Подготовка биоматериала к исследованию.
5. Антикоагулянты. Характеристика.

Практические навыки:

- использование необходимого антикоагулянта для исследования крови в ЦТТ;
- подсчет содержания лейкоцитов в мазке крови в камере Горяева по общепринятым лабораторным методам;
- приготовление рабочего раствора краски по Романовскому – Гимзе;
- выделение лимфоцитов в градиенте плотности;
- подсчет абсолютного и относительного содержания лимфоцитов в выделенной популяции;
- оценка жизнеспособности лимфоцитов;
- приготовление разведения комплемента;
- техника постановки ЦТТ с анти-Т-сывороткой.

Методические указания к выполнению практических заданий

Проведение исследований требует знаний параметров и нормативных значений клинического анализа крови, умения рассчитать количество лейкоцитов и лимфоцитов на единицу объема по общепринятым лабораторным методам.

Лимфоцитотоксический тест – иммунологическая реакция, являющаяся суммой всех мембранных антигенов Т-лимфоцитов. Среди многочисленных методов изучения клеточного иммунитета наибольший интерес представляет лимфоцитотоксический тест, используемый в клинике для изучения клеточной гиперчувствительности.

Принцип метода

Т-антитела к мембранным антигенам Т-лимфоцитов связываются с мембранными антигенами и в присутствии комплемента образующийся мембранно-атакующий комплекс (МАК) нарушает целостность клеточной мембраны. Происходит цитолиз лимфоцитов в присутствии МАК и комплемента. Краситель трипановый синий проникает внутрь клетки и окрашивает ее в голубой цвет. Клетки, не несущие на поверхности Т-антигены, остаются с неповрежденной мембраной (жизнеспособны) и не окрашиваются красителем. Вся работа с клетками проводится в стерильной посуде.

Реактивы и оборудование:

- забуференный физиологический раствор;
- раствор градиента плотности или готовый раствор (гистопак и др.);
- раствор Хенкса (готовый);
- среда 199 (готовая);
- раствор трипанового синего (краситель);
- анти-Т-сыворотка (готовая);
- цитратный гемостабилизатор;
- микроскоп с бинокулярной лупой;
- камера Горяева;
- предметные стекла.

Приготовление реактивов для иммунологических исследований

клеточного звена иммунитета:

- 1) забуференный физиологический раствор (ЗФР) 0,15 моль/л; pH 7,2 – 7,4: взвесить 8,2 г хлористого натрия (NaCl), 1,15 г натрия фосфорнокислого двухзамещенного (Na_2HPO_4), 0,2 г калия фосфорнокислого двухзамещенного (K_2HPO_4); довести до 1 л дистиллированной водой, измерить pH на ионометре, хранить при комнатной температуре
- 2) раствор градиента плотности 1,077 – 1,078: использовать готовый (гистопак и др.) или приготовить:
- 3) – раствор А – 9 %-ный раствор фиколла 400 мм: взвесить 9 г фиколла, растворить в 1 л ЗФР;
- 4) – раствор Б – 34 %-ный раствор верографина: развести в 2,2 раза исходный 76 %-ный верографин стерильной дистиллированной водой

- 5) смешать 24 ч . раствора А и 10 ч . раствора Б, измерить плотность полученного раствора ареометром, хранить в холодильнике при + 4 °С .
- 6) Возможно использование визотраста для приготовления раствора градиента плотности . К 6 ч . визотраста добавить 6 ч . бидистиллированной воды плотностью 1,077.
- 7) раствор трипанового синего 0,2 %-ного (краситель): взвесить 200 мг трипанового синего, растворить в 100 мл горячего (80 – 90°) раствора хлорида натрия , перемешивать 10 мин на магнитной мешалке, профильтровать через фильтровальную бумагу, хранить в плотно закрытой, темной посуде при комнатной температуре . Перед употреблением раствор необходимо вновь профильтровать через тон- кий слой ваты .
- 8) Приготовление антикоагулянта – смеси гепарина и ЭДТА
- 9) Смешать 1 ч . гепарина с содержанием 200 ЕД/мл с 2 объемами 6 % ЭДТА . Хранить при + 4 °С . Используют в соотношении 1:10 с кровью (1 мл антикоагулянта + 10 мл крови).
- 10) Приготовление цитратного гемостабилизатора (для предотвращения агрегации тромбоцитов)
- 11) Взвесить 13,2 г тринатрий-цитрата (хч), 4,8 г лимонной кислоты (хч), 25г глюкозы (хч); довести до 1 л стерильной дистиллированной водой . Оптимальное значение рН 6,5. Хранить при + 4 °С .
- 12) Используют в соотношении к лейкоцитарной взвеси 1:7.
- 13) Техника постановки анализа включает два этапа:
- 1) выделение популяции лимфоцитов ;
 - 2) постановка ЦТТ .
- 1-й этап – выделение популяции лимфоцитов : кровь с антикоагулянтом развести в 2 раза 3ФР, осторожно перемешать; осторожно наслоить кровь на раствор градиента плотности 1,077 – 1,080 в соотношении 1:1 или 1:2; центрифугировать при 400 g/мин (1500 об/мин) 15 – 30 мин на горизонтальном роторе ; определить расположение слоя моноцитов; осторожно отобрать дозатором или стерильной пастеровской пипеткой белесоватое кольцо мононуклеаров (лимфоцитов) на границе градиента плотности и разведенной крови, перенести в другую пробирку; трижды отмыть взвесь мононуклеаров средой 199 или раствором Хенкса (по 3 мл) при центрифугировании 1000 об/ мин .

После центрифугирования оставить 1 мл осадка, остальное (2 мл) вылить; плазму отобрать для оценки гуморального звена (при необходимости); добавить к выделенным клеткам цитратный гемо-стабилизатор в соотношении 1 ч. стабилизатора и 7 ч. лейкоцитарной взвеси; подсчитать количество выделенных клеток в камере Горяева по общепринятым лабораторным методам; клеток должно быть не менее 80 %.

Определить жизнеспособность лимфоцитов добавлением 0,2 – 0,5%-ного раствора трипанового синего к взвеси лимфоцитов в соотношении 1:1 (100 мкл лимфоцитов + 100 мкл красителя); развести комплемент (кролика или морской свинки) в соответствии с титром, указанным в инструкции; развести готовую (коммерческую) анти-Т- сыворотку средой 199 до рабочей концентрации, указанной на этикетке. 2-й этап – постановка ЦТТ : в лунки панели полистиролового планшета (или в центрифужной пробирке), смешать 60 мкл анти-Т- сыворотки в рабочем разведении, 20 мкл взвеси лимфоцитов, выделенной из исследуемых образцов и 20 мкл комплемента в рабочем разведении (опытные образцы); в контрольную лунку (пробирку) внести 20 мкл взвеси лимфоцитов, 20 мкл комплемента и 60 мкл среды 199 (контрольные образцы). Затем в каждую пробирку внести по 100 мкл трипанового синего и выдержать при комнатной температуре 30 – 60 с.

Учет результатов

Подсчитать в камере Горяева количество погибших клеток в опытных («ОП») и контрольных («К») образцах; высчитать их процент от общего количества клеток в препарате; высчитать процент погибших клеток в контроле; высчитать цитотоксический индекс (ЦТИ) по формуле

$$\text{ЦТИ} = \frac{\% \text{ погибших клеток "ОП"} - \% \text{ погибших клеток "К"}}{100 - \% \text{ погибших клеток "К"}}$$

ЦТИ указывает на процент клеток, несущих Т-антигены, т.е. относительное количество Т-клеток. У здоровых лиц ЦТИ составляет $70,6 \pm 0,9 \%$.

Контрольные вопросы

1. Определение лимфоцитов в градиенте плотности.
2. Приготовление ЗФР.
3. Система комплемента в определении мембранных антигенов Т-лимфоцитов.

Лабораторная работа № 10-11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАГОЦИТАРНОЙ РЕАКЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ

План занятия

1. Приготовление среды для культивирования стафилококка.
2. Взятие крови и приготовление мазков.
3. Подсчет фагоцитирующих клеток в окрашенных мазках.

Принцип метода основан на количественном определении поглощенных и переваренных нейтрофилами микроорганизмов при совместной инкубации исследуемой крови с микробной тест культурой.

Реактивы:

- 2 %-ный цитрат натрия;
- суточная микробная культура *Staphylococcus aureus* (штамм 209) или *E coli* (штамм Гусев), можно клетки дрожжей;
- смесь Никифорова (1 ч 96 ° этилового спирта + 1 ч. этилового эфира);
- краска Романовского – Гимзе;
- стандарт мутности для приготовления 2 млрд взвеси.

Оборудование:

- термостат;
- центрифуга;
- микроскоп;
- лабораторная посуда;
- иммерсионное масло;
- предметные стекла.

Ход определения

В центрифужную пробирку с 0,25 мл 2 %-ного цитрата натрия вносят 0,5 мл исследуемой цельной капиллярной или венозной крови, взятой натощак, добавляют 0,25 мл 2 млрд взвеси суточной микробной культуры, предварительно подогретой до 37 °С в соотношении 1:2:1.

Лейкоцитарно-микробную взвесь перемешивают и выдерживают в термостате в течение суток. Далее пробирки центрифугируют при 1500 об/мин 5 – 7 мин. Надосадочную жидкость сливают.

Из полученной взвеси готовят 2 тонких мазка, высушивают при комнатной температуре, фиксируют в смеси Никифорова 5 – 10 мин. и окрашивают по Романовскому – Гимзе.

Оценка результатов

Учитывают в 100 – 200 нейтрофилах:

- 1) количество микробов;
- 2) количество клеток с признаками фагоцитоза;
- 3) количество поглощенных фагоцитами микробов;

Поглотительную способность фагоцитов оценивают по фагоцитарному показателю и фагоцитарному числу.

Фагоцитарный показатель – процент фагоцитов из числа сосчитанных нейтрофилов. В норме у здоровых людей составляет 40 – 80 %.

Фагоцитарное число (ФЧ) (фагоцитарный индекс) – среднее число микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом.

ФЧ = общее число посчитанных микробов / % фагоцитоза. В норме 4 – 10.

Контрольные вопросы

1. Приготовление суточной микробной взвеси.
2. Приготовление стандарта мутности 2 млрд взвеси.
3. Окраска мазков по Романовскому – Гимзе.
4. Учет фагоцитирующих нейтрофилов.

Лабораторная работа № 12-13

ИММУНОРЕГУЛЯЦИЯ. CD4, CD8, Т-ЛИМФОЦИТЫ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

План занятия

1. Механизмы иммунорегуляции.
2. Т-система лимфоцитов. Дифференцировка клеток.
3. Методы определения (метод магнитного сепарирования и иммуноферментный метод).
4. Определение CD 4, CD 8, Т-лимфоцитов.
5. Компоненты реакции.

Практические навыки:

- уметь приготовить:
 - . реактивы для анализа;
 - . краску для окрашивания мазков;
- уметь подсчитать окрашенные ядра в камере Горяева;
- уметь пользоваться:
 - . магнитным сепаратором MPS-S при определении $CD4^{+}$, $CD8^{+}$, Т-лимфоцитов методом магнитного сепарирования;
 - . световым или флуоресцентным микроскопом;
- уметь правильно внести в лунки планшета стандарты и образцы при определении CD4 и CD 8 методом ИФА.

Методические указания к выполнению практических заданий

На поверхности Т-лимфоцитов находятся дифференцировочные антигены, обозначаемые CD (кластерами детерминант):

- CD3 – на поверхности зрелых Т-лимфоцитов;
- CD4 – на поверхности Т-хелперов;
- CD3 – на поверхности Т-киллеров;
- CD6 – маркеры NK-клеток, Т-киллеров;
- CD4 и CD8 характеризуют главные субпопуляции Т-лимфоцитов.

CD4 участвуют в регуляторных функциях (хелперы, помощь) иммунного ответа. Хелперы включают Т- и В-лимфоциты, участвуют в запуске реакций клеточного и

гуморального иммунитета (40 – 45 %). CD8 обладают супрессивной и цитотоксической активностью. Супрессоры тормозят реакцию клеточного и гуморального иммунитета (30 %).

Определение Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций играет важную роль для диагностики иммунодефицитных состояний и контроля за их лечением, диагностики лимфопролиферативных заболеваний, тяжелой инфекции, состояния после пересадки органов, контроля иммуносупрессивной терапии и других заболеваний.

Существуют различные методы определения субпопуляций Т-лимфоцитов. Ниже будут представлены следующие два метода:

- количественное определение CD4 и CD8 методом магнитного сепарирования с использованием светового микроскопа «БиоХимМак»;

- определение CD4 и CD8 методом иммунозахвата (ИФА) «БИО-РАД»

Определение абсолютного количества CD4 и CD8 методом магнитного сепарирования (с использованием реактивов фирмы Dynal, Норвегия)

Принцип метода

Выделение CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов из цельной крови основано на применении Dynalbeads CD4 и Dynalbeads CD8 – парамагнитных полистироловых микрочастиц, конъюгированных с антителами к специфическим клеточным маркерам CD4 и CD8. Использование од-нородных по размеру и форме микросфер диаметром 4,5 мкм обеспечивает быстрое и эффективное связывание клеток, минимизирует неспецифическое связывание.

Использование данной методики позволяет быстро и при минимальных затратах осуществить выделение целевых CD4 и CD8 Т-клеток.

Экономичность и эффективность данной методики определяется следующим:

- исключаются стадии центрифугирования в градиенте плотности;
- выделение целевых клеток из цельной крови составляет более 95%
- элиминирование влияния CD4⁺ моноцитов;
- чистота выделенной фракции составляет 99 %;
- высокая воспроизводимость результатов;
- коэффициент корреляции с методом проточной цитометрии более 90 %;
- широкий динамический диапазон 1010 – 1500 клеток/мкл;
- время анализа – один час;
- не требуется дорогостоящего оборудования;

– низкая себестоимость анализа.

Реактивы и оборудование:

– тест-системы для определения абсолютного количества CD4 и CD8 методом магнитного сепарирования, содержащие все необходимые для анализа компоненты;

– магнит Dynal MPC-S;

– прибор для перемешивания;

– микроскоп лабораторный;

– пробирки круглодонные типа «эппендорф» на 2 мл;

– пробирки для забора крови с антикоагулянтом (ЭДТА);

– камера Горяева с покровными стеклами;

– пипетки автоматические с переменным объемом до 40, 200 и 1000 мкл.

Приготовление реактивов:

1) рабочий раствор – 10 мл концентрированного фосфатно-солевого буфера: 90 мл дистиллированной воды и 0,5 г цитрата натрия перемешать до полного растворения;

2) лизирующий раствор: к 1000 мл стерильного 0,9 %-ного раствора NaCl добавить 20 мл раствора цитримида, 10 мл формальдегида; 5 мл концентрированной уксусной кислоты;

3) окрашивающий раствор: 0,025 г генцианвиолета, 2 мл концентрированной уксусной кислоты, 100 мл дистиллированной воды.

Техника постановки анализа:

– 1-й этап пробоподготовки: разбавить цельную кровь фосфатным буфером (125 мкл крови + 350 мкл буфера);

– 2-й этап – удаление моноцитов: 25 мкл разбавленных в 2 раза Dynalbeads CD4 добавить к разбавленному образцу крови; инкубировать 10 мин при перемешивании при комнатной температуре; сепарировать 2 мин в магните Dynal MPC-S; отобрать в две промаркированные пробирки супернатант, не содержащий моноциты;

– 3-й этап – выделение CD4 и CD8 Т-лимфоцитов: в соответствующие пробирки добавить по 25 мкл Dynalbeads CD4 и Dynalbeads CD8; инкубировать, перемешивая, 10 мин при комнатной температуре; сепарировать 2 мин в магните; промыть выделенные клетки в фосфатном буфере;

– 4-й этап – подсчет выделенных клеток на микроскопе: ресуспендировать выделенные клетки в лизирующем растворе уксусной кислоты; инкубировать 5 мин при комнатной температуре; добавить окрашивающий раствор генцианвиолетта или

акридинового оранжевого; подсчитать окрашенные ядра в камере Горяева на световом или флуоресцентном микроскопе.

Учет результатов анализа

Подсчет окрашенных ядер производится в 20 больших квадратах (в объеме 0,4 мкл) камеры Горяева. Большой квадрат камеры Горяева – это 4 квадрата площадью $1/25 \text{ мм}^2$.

Абсолютное количество лимфоцитов субпопуляции выражается в клетках на 1 мкл цельной крови при умножении числа подсчитанных ядер на фактор 7,7.

2. Определение количества CD4^+ и CD8^+ методом ИФА

Принцип метода ИФА

Метод основан на специфическом захвате CD4 и CD8 -Т-лимфоцитов с помощью парамагнитных частиц, покрытых захватывающими антителами.

Реактивы и оборудование:

- тест-система для определения CD4 и CD8 лимфоцитов методом ИФА (готовая, коммерческая), содержащая все необходимые для анализа компоненты;
- анти- CD2 , моноклональные АТ (мышинные, покрытые парамагнитными частицами);
- парамагнитные частицы с четырьмя стандартами определенной концентрации: CD4 (КАСД4, КВСД4, КССД4, КДСД4) и четырьмя стандартами CD8 (КАСД8, КВСД8, КССД8, КДСД8);
- человеческая плазма;
- концентрированный раствор анти- CD4 и анти- CD8 конъюгата, мышинные анти- CD4 и CD8 моноклональные АТ, меченные пероксидазой;
- концентрат моющего раствора;
- субстратный буфер и концентрат хромогенного раствора;
- плашка с 12 стрипами, магнитная рамка.

Приготовление реактивов:

- 1) приготовление промывочного раствора (титр разведения указан на флаконе и в инструкции);
- 2) разведение стандартов: в каждый флакон со стандартом CD4 и CD8 внести по 0,9 мл разведенного промывочного раствора, затем в каждый флакон внести по 100

мкл человеческой плазмы. Осторожно перемешать. Стандарты готовы к использованию;

3) разведение конъюгатов промывочным раствором (в зависимости от количества исследуемых образцов), например, для анализа 7 образцов: 1080 мкл промывочного раствора + 120 мкл концентрата конъюгата = 1,2 мл; для анализа 11 образцов: 1530 мкл промывочного раствора + 170 мкл концентрата конъюгата = 1,7 мл;

4) разведение раствора для внесения в лунку бланка: в пробирке смешать 500 мкл раствора анти-СД4, моноклональные АТ, покрытые парамагнитными частицами, и 100 мкл человеческой плазмы. Перемешивать 10 с. Перед внесением в лунки повторить перемешивание;

5) разведение исследуемых образцов цельной крови пациентов: в пробирке смешать 500 мкл раствора анти-СД4, моноклональные АТ, покрытые парамагнитными частицами, и 100 мкл образца цельной крови. Перемешивать 2 мин. Образцы готовы к исследованию;

6) разведение субстрата (для проведения реакции). Концентрат хромогена развести субстратным буфером (в зависимости от количества образцов): например, для 7 образцов: 2450 мкл субстратного буфера + 50 мкл хромогена = 2500 мкл. Для 11 образцов: 3430 мкл субстратного буфера + 70 мкл хромогена = 3500 мкл.

Техника постановки анализа

Вставить планшет в магнитную рамку; внести в соответствующие лунки стрипов стандарты, бланк и образцы крови пациентов для СД4 и СД8. Количество вводимых растворов и схема их введения указаны в инструкции к тест-системе (на одной и той же планшете ставятся образцы СД4 и СД8).

После 2-минутного интервала отсосать содержимое всех лунок в контейнер с дезраствором и дважды промыть планшет с образцами промывочным раствором, вынуть планшет из магнитной рамки и быстро ввести в соответствующие лунки по 100 мкл конъюгата, разведенного (1:10) анти-СД4 и анти-СД8. Накрыть планшет пленкой, инкубировать 20 мин $\pm$ 2 мин при комнатной температуре, вставить планшет в магнитную рамку и только после этого снять пленку; через 2 мин ввести 200 мкл промывочного раствора и промыть планшет с образцами еще 4 раза (всего 5 циклов промывки).

Отсосать содержимое лунок и вынуть магнитную рамку, быстро внести в каждую лунку по 100 мкл субстрата, инкубировать в темноте 20 мин $\pm$ 2 мин при комнатной температуре (планшет пленкой не накрывать), после инкубации вставить магнитную рамку, спустя 2 мин добавить во все лунки по 50 мкл стоп-реагента.

Учет результатов и контроль качества

Измерить оптическую плотность на вертикальном фотометре. В норме при оценке методом ИФА с использованием МкАТ относительное содержание CD4 – 30 – 60 %; CD8 – 15 – 38 %; абсолютное содержание клеток в 1 мкл CD4 – 600 – 1900; CD8 – 300 – 800; отношение CD4 / CD8 (расчетный показатель) $1,02 \pm 0,1\%$.

Контрольные вопросы

1. Структура IgE. Основные области, участвующие в эффектор-ных функциях.
2. Классы антител, проникающие через плацентарный барьер.
3. Характеристика поликлональных антител.
4. Характеристика моноклональных антител.

Лабораторная работа № 14-15

ИММУНОРЕГУЛЯЦИЯ. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

План занятия

1. Принцип метода.
2. Подготовка реактивов и оборудования.
3. Подготовка лейкоцитарной взвеси.
4. Техника постановки анализа.

Практические навыки:

умение приготовить:

реактивы;

лейкоцитарную взвесь;

умение работать:

с центрифугой;

люминесцентным микроскопом или проточным флюориметром.

Методические указания к выполнению практических заданий

Изменение количества иммунокомпетентных клеток и нарушение соотношения различных популяций встречается при многих заболеваниях.

Принцип метода

На поверхности Т-лимфоцитов имеются дифференцировочные антигены (СД): СД4 – на поверхности Т-хелперов; СД8 – на поверхности Т-киллеров; СД16 – на поверхности НК-клеток, Т-киллеров; СД20, СД22 – на поверхности В-лимфоцитов.

При добавлении к лимфоцитам, выделенным в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077), моноклональных антител против соответствующих детерминант, на поверхности клеток образуется «иммунный комплекс», который выявляется добавлением конъюгата (антитела против Ig мыши, меченные ФИТЦ).

Реакция непрямой иммунофлуоресценции с моноклональными антителами – определение на люминесцентном микроскопе количества той или иной субстанции путем подсчета процента светящихся клеток в микроскопированном препарате.

Реактивы и оборудование:

- люминесцентный микроскоп или проточный флюориметр;
- предметные и покровные стекла;
- центрифуга;
- раствор фосфатно-солевого буфера pH 7,2 – 7,4;
- раствор фиколла-верографина, плотность 1,077;
- моноклональные антитела.

Приготовление реактивов

Приготовить фиколла-верографин с плотностью 1,077: взвесить 9 г фиколла, высыпать в мерный стакан. Залить кипяченой горячей водой (70 °C) до 100 мл. После растворения фиколла вылить его в цилиндр объемом 150 мл. Осторожно помешивая стеклянной палочкой, вылить из ампулы верографин любой имеющейся в наличии концентрации до тех пор, пока не установится плотность 1,077.

Плотность контролировать денситометром. Раствор хранить до использования в чистой посуде в холодильнике при + 4 °C; при длительном хранении в морозильнике при –20 °C. Взятую из вены кровь в шприц с гепарином (200 ЕД на 10 мл крови) оставить в пробирке при комнатной температуре. Через 30 – 40 мин собрать лейкоцель, растворить моноклональные антитела в соответствии с инструкцией (хранить в холодильнике при + 4 °C).

Техника постановки анализа

В чистые центрифужные пробирки внести по 1,5 мл фиколла-верографина, аккуратно наслоить на фиколла-верографин по 2 – 2,5 мл лейкоцель или разведенную

фосфатно-солевым буфером в 2 раза цельную кровь, центрифугировать пробирки в течение 30 мин.

После центрифугирования на границе раздела фаз (крови и фиколл-верографина) образуется белое кольцо (обогащенная суспензия лимфоцитов); аккуратно собрать лимфоциты (кольца) в чистую пробирку, объединяя пробы одного и того же пациента; отмыть лимфоциты от фиколл-верографина фосфатно-солевым буфером.

Для этого довести объем в пробирке с лимфоцитами до 7 – 10 мл раствором ФСБ и центрифугировать 10 мин при 1000 об/мин (при большей скорости клетки свариваются); супернатант удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором, повторить отмывку лимфоцитов: в маленькие, пластиковые, круглодонные пробирки внести по 20 мкл моноклональных антител с соответствующими детерминантами.

После последнего отмывания лимфоцитов супернатант слить, а осадок лимфоцитов ресуспендировать в 0,25 – 0,3 мл. Добавить в пробирки с моноклональными антителами по 50 мкл суспензии лимфоцитов. Инкубировать пробирки 20 – 30 мин в холодильнике при + 4 °С. При этом на поверхности лимфоцитов образуется иммунный комплекс (моноклональные АТ и соответствующие СД).

После инкубации лимфоциты отмыть дважды ФСБ; для этого в пробирки добавить 1,5 – 2 мл ФСБ и центрифугировать 3 мин при 1500 об/мин. Супернатант слить. Осадок ресуспендировать в оставшихся каплях супернатанта, добавить к суспензии лимфоцитов по 50 мкл конъюгата – ФИТЦ для проявления образовавшихся на поверхности лимфоцитов иммунных комплексов, инкубировать в холодильнике при + 4 °С 20 – 30 мин, после инкубации отмыть лимфоциты от несвязавшегося конъюгата (добавить 1,5 – 2 мл ФСБ и центрифугировать 3 мин при 1500 об/мин).

После отмывания супернатант не удалять, а оставить в пробирке; приготовить препараты: взять две пробирки с лимфоцитами, слить супернатант. Осадок лимфоцитов ресуспендировать, затем по 20 мкл внести на предметное стекло (1 стекло – 2 препарата). Каплю суспензии накрыть покровным стеклом, на которое нанести каплю иммерсионного масла для люминесценции.

Учет результатов

На люминесцентном микроскопе в свете лампы накаливания подсчитать в поле зрения количество лимфоцитов. После этого перекрыть свет лампы накаливания и подсчитать в этом же поле количество светящихся клеток

(светится только поверхностная мембрана в виде шапочек, полулуний, тонкой полоски мембраны). Подсчитать процент светящихся клеток на 200 – 300 лимфоцитов. Пересчитать процент субпопуляции клеток на абсолютное содержание лимфоцитов.

Контрольные вопросы

1. Основные дифференцировочные антигены Т-лимфоцитов.
2. Методы идентификации популяций и субпопуляций Т- и В-лимфоцитов.
3. Функция CD8-лимфоцитов.
4. Функция CD4-лимфоцитов.

Лабораторная работа № 16
ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ.
АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ . МЕТОД ИФА.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО IgE

План занятия:

1. Основные механизмы синтеза IgE.
2. Принцип метода ИФА .
3. Приготовление реактивов и оборудования для проведения анализа .
4. Техника постановки ИФА .
5. Учет результатов .

Практические навыки:

- умение приготовить реактивы;
- программировать в соответствии с заданиями;
- при ручном расчете результатов уметь построить калибровочную кривую определения концентрации общего IgE.

Методические указания к выполнению практических заданий

Количественное определение уровня общего IgE (МЕ/мл) в сыворотке , плазме крови или других биологических жидкостях человека важно при исследовании гуморального иммунитета, диагностике иммунодефицитов, паразитарных заболеваний, парапротеинемий и особенно при аллергических заболеваниях .

Клетки , «вооруженные» IgE-антителом , – тучные клетки тканей и базофилы крови реагируют на «свой» антиген сильнее и быстрее , чем макрофаги и гранулоциты, несущие аналогичные IgE-антитела .

Система IgE имеет особую регуляцию , мало связанную с регуляцией синтеза остальных иммуноглобулинов . Это позволяет использовать определение общего IgE для дифференциального диагноза, прогноза и контроля терапии в тех случаях, когда определение других иммуноглобулинов мало или неинформативно .

Известны несколько методов определения общего IgE: конкурентный, радиоиммунный , иммунорадиометрический с последовательным связыванием двух антител (сэндвич-тест), сэндвич-тесты на основе моно и поликлональных антител к IgE, упрощенная модификация ИФА (латекс-тест , иммунохроматография). Наибольшее распространение получил метод ИФА .

Принцип метода: сэндвич-вариант твердофазного ИФА на основе моноклональных антител . Используется полистироловый планшет , сенсibilизированный МкАТ к IgE. Все образцы вносятся в лунки планшета, в которые затем добавляется конъюгат моноклональных антител против IgE с пероксидазой хрена. Количество связавшегося

конъюгата выявляется после отмывания и добавления субстратного раствора . Интенсивность окрашивания пропорциональна уровню IgE в исследуемых образцах .

Реактивы и оборудование :

- готовая коммерческая тест-система для количественного определения общего IgE, в состав которой входят: контрольная сыворотка , калибраторы с известным содержанием IgE МЕ/мл , МкАТ , меченные ферментом (конъюгат), субстратная смесь , стоп-реагент , промывочный раствор;
- термостат на 37 °С;
- вертикальный фотометр ;
- пипеточные дозаторы с переменным объемом , одноразовые наконечники;
- шейкер (встряхиватель).

Приготовление реактивов

Перед использованием тест -набор выдержать 30 мин при комнатной температуре . Проявляющий раствор готовить по инструкции за 8 – 10 мин до использования . Развести концентрат соли дистиллированной водой в соответствии с инструкцией для промывки планшет.

Техника постановки анализа

В соответствующие лунки планшета внести в дублях калибраторы , контрольную сыворотку и исследуемые пробы по 20 мкл . В лунки А1 и В1 внести калибратор «О» – эти лунки являются бланком. Внести сразу во все лунки по 100 мкл конъюгата , перемешать на шейкере в течение 20 – 30 с , закрыть планшет пленкой и инкубировать в термостате при 37 °С 1,5 ч .

После инкубации промыть планшет четыре раза промывающим раствором по 200 мкл . Промокнуть остатки раствора на фильтровальную бумагу , внести во все лунки по 150 мкл проявляющего раствора и инкубировать в термостате при 37 °С 15 мин .

Внести в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента , измерить на фотометре при 450 нм оптической плотности .

Учет результатов анализа

При наличии в наборе стандартов и фотометра можно получить автоматически вычисленные значения концентрации IgE общ . (МЕ/мл) в образцах методом линейной интерполяции . При отсутствии возможности определения количественного содержания IgE необходимо построить калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации IgE в калибраторах , откладывая на оси абсцисс концентрацию IgE в МЕ/мл , а на оси ординат – соответствующие им значения величин оптической плотности. Используя калибровочный график, находят значения содержания общего IgE в исследуемых образцах .

У взрослого в норме уровень общего IgE до 150 МЕ/мл .

Контрольные вопросы:

1. Понятие «аллергия». Классификация .
2. Типы реакций гиперчувствительности .
3. Основные признаки гиперчувствительности немедленного типа .
4. Основные медиаторы аллергической реакции немедленного типа .

Лабораторная работа № 17

ИММУНОПАТОЛОГИИ. АУТОИММУННЫЕ СОСТОЯНИЯ. МЕТОД ИФА.
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ

План занятия:

1. Основные механизмы аутоиммунных заболеваний .
2. Количественное определение антител к тиреоглобулину (ТГ) или к тиреопероксидазе (ТПО).
3. Приготовление реактивов .
4. Техника постановки ИФА .
5. Учет результатов .

Практические навыки:

– умение приготовить:

- . реактивы (конъюгат , промывочный раствор, субстратная смесь, 10 % раствор серной кислоты);
- . калибраторы ;

– умение работать :

с вихревым смесителем;
на спектрофотометре .

Методические указания к выполнению практических заданий

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы характеризуются присутствием в сыворотке крови антител к одному или более тиреоидным антигенам . Присутствие аутоантител к тиреоглобулину важно для этиологии острых и подострых нарушений функции щитовидной железы . Нормальное содержание антител у здорового человека – менее 100 МЕ/мл .

Принцип метода

Используется метод иммуноферментного анализа . Лунки планшетов покрыты тиреоглобулином . При внесении в лунки образцов пациентов происходит образование комплекса «АТ + АГ». Антиген , сорбированный на плашке , связывается с содержащимися в пациентах антителами . Комплекс «АГ + АТ» выявляется конъюгатом

мышинных моноклональных антител с пероксидазой к иммуноглобулину G человека .

Реактивы и оборудование :

– набор для определения АТ к тиреоглобулину (готовый коммерческий), содержащий все необходимые компоненты для анализа;

– термостат;

– одно- и многоканальные пипетки;

– вихревой смеситель;

– спектрофотометр;

– серная кислота.

Приготовление реактивов:

1) конъюгат: развести конъюгат промывочным раствором (титр разведения указан в инструкции). Тщательно перемешать. Срок хранения при + 2 – 8 °С не более одного месяца;

2) отмывающий раствор: к 420 мл дистиллированной воды добавить 30 мл концентрата отмывающего раствора. Перемешать. Хранить при + 2 – 8 °С не более одного месяца;

3) 10 %-ный раствор серной кислоты: к 22,5 мл дистиллированной воды добавить 2,5 мл концентрированной серной кислоты. Медленно влить кислоту в воду. Хранить при комнатной температуре не более двух месяцев;

4) субстратная смесь 6 калибровочных проб: 2000, 1000, 500, 250, 100, 0 МЕ/мл. Развести калибраторы раствором для разведения образцов (титр разведения указан на флаконах и в инструкции). Хранить не более 30 мин при комнатной температуре.

Техника постановки анализа

Перед исследованием набор и образцы выдержать при комнатной температуре не менее 30 мин, образцы вносить в дубле . Внести в первые 12 лунок по 100 мкл 6 калибраторов в дублях , затем внести в лунки для образцов по 90 мкл раствора для разведения образцов и по 10 мкл анализируемых сывороток. Инкубировать планшет 60 мин при 37 °С. Промыть лунки не менее четырех раз промывочным раствором , просушить на фильтровальной бумаге и быстро внести в лунки по 100 мкл раствора конъюгата. Инкубировать 30 мин при 37 °С, затем промыть планшет не менее четырех раз . Быстро внести в лунки по 100 мкл свежеприготовленной субстратной смеси , инкубировать 10 мин при комнатной температуре без перемешивания . После чего внести в лунки по 100 мкл 10 %-ной H₂ SO₄ (для остановки реакции), инкубировать 20 – 30 с на динамическом шейкере при комнатной температуре .

Учет результатов

На спектрофотометре измерить оптическую плотность при 492 нм. При использовании программы измерения на спектрофотометре можно получить количественное содержание антител к тиреоглобулину.

Контрольные вопросы

1. Структура иммуноглобулина Е. Особенности строения секрета иммунного глобулина.
2. Понятие «аллергия». Классификация.
3. Стадии развития аллергических реакций.
4. Аутоантигены человека.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 18

ИММУНОПАТОЛОГИЯ . АУТОИММУННЫЕ СОСТОЯНИЯ . РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РПГА). ЛАТЕКС-ТЕСТ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА

План занятия

1. Принцип метода пассивной агглютинации .
2. Подготовка реактивов .
3. Техника постановки анализа .
4. Учет результатов.

Практические навыки:

умение: залить латексный реагент и сыворотку пациентов на слайд-стекло;
приготовить необходимые разведения сывороток; учитывать реакцию агглютинации.

Методические указания к выполнению практических заданий

Исследование латекс-теста позволяет сделать полуколичественное определение ряда иммунопатологических показателей (РФ, АСЛО и др.) в неразбавленной сыворотке методом агглютинации латексных частиц. Метод удобен в исполнении, экономически выгоден, время анализа – 2 – 3 мин. В наборе имеются положительный и

отрицательный контроль. Определение ревматоидного фактора играет важную роль в диагностике ревматоидного артрита, при котором наблюдаются значительные нарушения иммунной системы. Они обусловлены неполноценным иммунным ответом с образованием иммунных комплексов. В формировании иммунных комплексов основную роль играет РФ, который представляет собой в основном АТ IgM, направленный против IgG.

Принцип метода основан на реакции агглютинации между РФ образца пациента или контрольной сывороткой и человеческим IgG, находящимся на полистироловых латексных частицах: IgG + АТ к IgG + АГ.

Реактивы и оборудование:

- готовый коммерческий набор для определения РФ, содержащий: раствор полистироловых латексных частиц, покрытых IgG человека;
- раствор положительного контроля, содержащий антитела к IgG человека;
- раствор отрицательного контроля, не содержащий антител;
- слайд-стекло, на котором проходит реакция агглютинации.

Техника постановки анализа

Перед постановкой реакции сыворотку пациента и набор выдержать в течение 30 мин при комнатной температуре.

Пипетировать на слайд-стекло в отдельные лунки:

- сыворотку пациентов – 40 мкл;
- положительный контроль – 40 мкл;
- отрицательный контроль – 40 мкл.

Добавить в каждую лунку по 40 мкл латексного реагента, осторожно перемешать содержимое лунок стеклянной палочкой. Результаты учесть через 2 – 3 мин.

Учет результатов

Анализ образцов пациентов проводить после получения результатов отрицательного и положительного контролей. Отсутствие агглютинации в сыворотке указывает на отсутствие РФ, при положительной реакции (четкая агглютинация) следует провести титрование сывороток буферным раствором в различных соотношениях: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 и т. д. (см. таблицу).

Отрицательным будет результат, содержащий в образце РФ менее 20 МЕ/мл; положительный результат (четкая агглютинация) указывает на количественное

содержание РФ в сыворотке пациента.

Таблица

Титр разведения	РФ в МЕ/мл (условно)
1+1(1:1)	24
1+3(1:4)	48
1+7(1:8)	96
1+15(1:16)	192
1+31(1:32)	384

Примечание. 1 + 1 = 40 мкл сыворотки + 40 мкл буферного раствора.

Стандартизация метода:

- использование чистых слайд-стекол для проведения латексреакции;
- использование чистых стеклянных палочек для смешивания реагентов;
- использование точных дозированных пипеток;
- строгое соблюдение времени проведения реакции, указанного в инструкции;
- использование правильного освещения для учета результатов агглютинации;
- правильное разведение используемых реагентов;
- обязательное использование отрицательных и положительных контролей при постановке реакции;
- строгое соблюдение условий хранения реагентов .

Контрольные вопросы

1. Понятие аутореактивности .
2. Аутоантигены человека . Пример .
3. Классификация аутоиммунных заболеваний .
4. Иммунологические механизмы развития аутоиммунных заболеваний.

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины

Перечень основной литературы

1. 1.Просекова, Е. В. Иммунологические методы исследования в клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / Е. В. Просекова, Н. Р. Забелина, В. А. Сабыныч. — Владивосток: ТГМУ, 2016. — 120 с. — ISBN 978-5-98301-070-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/3095>

2. Дроздов, А. А. Заболевания крови. Полный справочник [Электронный ресурс] / А. А. Дроздов, М. В. Дроздова. — Электрон. текстовые данные. — Саратов : Научная книга, 2019. — 370 с. — 978-5-9758-1847-8. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/80202.html>
3. Иммунология : учебное пособие для вузов / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, Р. Х. Равилов [и др.]. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2026. — 188 с. — ISBN 978-5-507-50520-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/443303>

Перечень дополнительной литературы:

1. Анохина, Н. В. Общая и клиническая иммунология [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н. В. Анохина. — 2-е изд. — Электрон. текстовые данные. — Саратов : Научная книга, 2019. — 159 с. — 978-5-9758-1755-6. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/81032.html>
2. Александрова Т.П. Физико-химические методы анализа [Электронный ресурс]: учебное пособие / Т.П. Александрова, А.И. Апарнев, А.А. Казакова. — Электрон. текстовые данные. — Новосибирск: Новосибирский государственный технический университет, 2014. — 90 с. — 978-5-7782-2394-3.—Режим доступа:<http://www.iprbookshop.ru/44699.html>
3. Тугуз, А. Р. Иммунология : учебное пособие / А. Р. Тугуз ; составитель А. Р. Тугуз. — Майкоп : АГУ, 2018. — 176 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/146134>
4. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия: учебное пособие / С. В. Лелевич. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>
5. Клиническая биохимия: учебное пособие / Т. П. Бондарь, К. С. Светлицкий, Н. И. Ковалевич [и др.]. — Ставрополь: СтГМУ, 2020. — 204 с. — ISBN 978-5-89822-635-0. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/216803>
6. Шабалдин, А. В. Иммунология: учебное пособие / А. В. Шабалдин. — практикум. — Кемерово: КемГУ, 2023. — 84 с. — ISBN 978-5-8353-3070-6. — Текст: электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/392204>
7. Дьячкова, С. Я. Иммунология : учебное пособие для вузов / С. Я. Дьячкова. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 168 с. — ISBN 978-5-8114-9986-1. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/208682>
8. Левкова, Е. А. Иммунология и клиническая иммунология. Аутоиммунные заболевания : учебное пособие для вузов / Е. А. Левкова, О. Г. Елисютина, О. В. Аплевич. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 44 с. — ISBN 978-5-507-48425-6. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/380675>
9. Левкова, Е. А. Клиническая иммунология: первичные иммунодефициты : учебное пособие для вузов / Е. А. Левкова, О. В. Аплевич, Н. С. Татаурщикова. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 68 с. — ISBN 978-5-507-49370-8. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/417734>
10. Иммунология: курс лекций с практическими заданиями : учебное пособие / Н. И. Потатуркина-Нестерова, И. С. Немова, М. Н. Артамонова, А. С. Хитрова. — Ульяновск : УлГУ, 2022. — 114 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/314507> бное пособие для студентов медицинских вузов / Л.В. Ганковская [и др.]. — Электрон. текстовые данные. — М. : ПедиатрЪ, 2014. — 124 с. — 978-5-906332-39-4. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/70802.html>

