

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»  
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ І ТЕХНОЛОГІЙ  
У ТВАРИННИЦТВІ

*Кафедра гігієни тварин та ветеринарного  
забезпечення кінологічної служби НПУ*

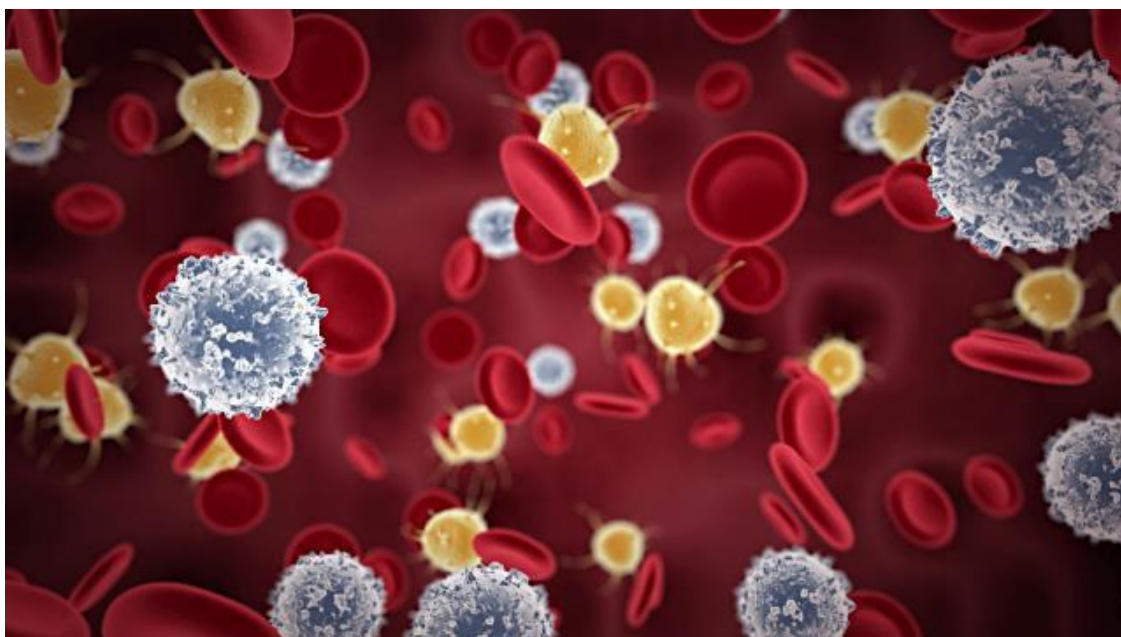
## **МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

до практичних занять з дисципліни

### **«СУЧАСНІ ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ»**

для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за  
спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина»

освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини



**м. Кам'янець-Подільський**

**2023**

**УДК 619:616.9**

**Укладач:**

**Тетяна СУПРОВИЧ,**

доктор сільськогосподарських наук, професор; завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби НПУ

*Рекомендовано до друку науково-методичною радою  
Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»  
(протокол № 9 від 21.11. 2023 р.)*

**Рецензенти:**

**Олег ВІЩУР,**

доктор ветеринарних наук, професор, завідувач лабораторії імунології Інституту біології тварин НААН, м. Львів.

**Юлія ГОРЮК,**

доктор ветеринарних наук, доцент, доцент кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Методичні рекомендації до практичних занять з дисципліни «Сучасні імунологічні методи досліджень у ветеринарній медицині» для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина». Освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини / Т.М. Супрович. Кам'янець-Подільський, ЗВО ПДУ. 2023. 36 с.

Методичні рекомендації розроблено з метою закріплення теоретичних знань і набуття практичних навичок при визначенні імунного статусу тварин.

© ЗВО ПДУ, 2023

## ЗМІСТ

Вступ .....	4
ТЕМА1. Дослідження популяційного складу Т- та В-лімфоцитів крові .....	5
ТЕМА2. Дослідження чинників природнього імунітету .....	17
ТЕМА3. Визначення концентрації сироваткових імуноглобулінів..	26
ТЕМА 4. Вивчення імунокомпетентних клітин які знаходяться у різноманітних тканинах .....	32
Список використаних джерел .....	36

## ВСТУП

Імунна система – це комплекс біологічних механізмів організму, який спрямований на збереження структурної і функціональної генетичної рівноваги. Імунна система – це сукупність органів, тканин і клітин, що забезпечують генетичну постійність організму. Вона утворює другу лінію захисту від усього чужорідного після факторів неспецифічного захисту. Імунна система є своєрідним «відділом технічного контролю», який слідкує за тим, щоб в організмі зберігалися тільки макромолекули і клітини, які відповідають заданій генетичній програмі.

Біологічна мета імунних реакцій – підтримання індивідуальності конкретного організму на рівні макромолекул, захист його від різних чужорідних агентів.

Розглянуті у методичній розробці лабораторні дослідження допоможуть здобувачам розкрити принципи та особливості гуморальних і клітинних факторів імунітету – основного механізму забезпечення захисту організму від інфекційних агентів, аутоантигенів, власних клітин із зміненою генетичною інформацією та провести інтерпретацію імунного статусу організму тварин.

Методичні рекомендації розроблено згідно робочої програми з дисципліни «Сучасні імунологічні методи досліджень у ветеринарній медицині» для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина», освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини

## ТЕМА1. ДОСЛІДЖЕННЯ ПОПУЛЯЦІЙНОГО СКЛАДУ Т- ТА В-ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ

*Мета:* Ознайомити здобувачів з клітинними чинниками захисної реакції організму: Т- і В-лімфоцитами.

**Імунокомпетентні клітини.** Всі клітини імунної системи утворюються зі стовбурової кровотворної клітини, яка локалізується в кістковому мозку. В подальшому їх розвиток може проходити або на шляху лімфопоезу, або мієлопоезу. По першому шляху розвиваються лімфоцити. Всі інші лейкоцити розвиваються по шляху мієлопоезу.

Всі відомі клітини імунітету можна об'єднати в декілька великих груп, в залежності від виконуваних ними функцій. Пропонують виділяти:

1) Фагоцити (макрофаги та нейтрофіли), здійснюють як правило функції фагоцитозу;

2) Гранулоцити (еозинофіли, тучні клітини, базофіли і тромбоцити), виконують функції позаклітинного цитолізу мішеней;

3) Антигенпрезентуючі клітини (різноманітні популяції дендритних клітин), які представляють антиген для лімфоцитів;

4) Ендотеліальні та інші клітини, що формують мікрооточення клітин імунітету;

5) Лімфоцити – які реалізують основні функції специфічної імунної відповіді.

Ці клітини мають на своїй поверхні спеціальні молекули, які допомагають здійснювати взаємодію між собою та виконувати притаманні їм функції.

*Фагоцитуючі клітини.* Не дивлячись на те, що фагоцитуючими властивостями можуть володіти майже всі клітини організму, в даному випадку мова йде тільки про «професійні» фагоцити. До цієї групи можна включити тільки два різновиди клітин:

- моноцити і локалізовані в органах макрофаги, які всі разом об'єднують в систему мононуклеарних фагоцитів;

- нейтрофіли (мікрофаги) – одна із самих багато численних популяцій клітин білої крові.

Ці клітини знаходяться в першому ряді розвитку захисних реакцій. Зазвичай вони першими контактують з мікроорганізмами та паразитами, які потрапляють в організм, і, як правило, забезпечують їх загибель. Коли самотійно не можуть їх знешкодити, вони ініціюють цілий каскад реакцій, які запускають механізм специфічної імунної відповіді, при якій їх киллерна властивість по відношенню до збудника зростає багаторазово.

*Моноцити* продукуються в дорослому організмі від стовбурових кровотворних клітин, а в ембріоні – із жовчного міхура та печінки.

Дозріваючи в кістковому мозку до стадії моноцита, ці клітини надходять в кров, де циркулюють на протязі 2-5 днів. Після чого вони мігрують в різноманітні органи із моноцитів перетворюються на макрофаги. Тривалість їхнього життя коливається від 20 діб до 6-7 місяців, в залежності від субпопуляції і локалізації в органі. Моноцити та локалізовані в органах макрофаги об'єднують

в систему мононуклеарних фагоцитів.

Моноцити представляють собою крупні клітини округлої форми, з характерним підковоподібним ядром. Тканинні макрофаги, як правило, крупніші моноцитів та мають неправильну форму.

Електронно-мікроскопічним аналізом ультраструктури моноцитів показано, що їх мембрана має виражену складчастість. Комплекс Гольджі добре розвинутий. В цитоплазмі є велика кількість гранул-лізосом, які містять різноманітні ферменти.

Локалізація мононуклеарних фагоцитів надзвичайно різноманітна. Як правило, вони вистилають та контролюють ті місця, які найбільш сприятливі для проникнення інфекції в організм. В залежності від локалізації виділяють наступні групи:

- клітини Купфера (зіркоподібні ретикулоендотеліоцити печінки);
- альвеолярні макрофаги (розміщені в порожнині між кровоносними судинами альвеол та повітряним шаром в легенях);
- перитонеальні макрофаги (локалізовані на серозних оболонках черевної порожнини);
- макрофаги лімфоїдних тканин;
- макрофаги нирок;
- мікроглія мозку.

Функціональна роль системи мононуклеарних фагоцитів також різноманітна. Але основними функціями є:

- Кіллерна функція – здійснюється за рахунок позаклітинного цитолізу та фагоцитозу.
- Антигенпрезентуюча функція – макрофаги можуть також виконувати процесінг та презентацію лімфоцитам антигенного матеріалу.
- Секреторно-регуляторна функція – макрофаги декретують цілий спектр різноманітних молекул, які виконують регуляторну роль, тобто здатні активувати або приглушувати інтенсивність імунної відповіді.
- Участь в репаративних процесах – приймають активну участь в процесах репарації тканин через систему фіброгенезу, а також сприяють прискореному росту кровоносних судин.

*Нейтрофіли* представляють собою одну з найчисленніших популяцій циркулюючих лейкоцитів. Їх процентний склад у різних видів ссавців коливається у межах 40-60%. Як і всі клітини білої крові, нейтрофіли продукуються стовбуровими клітинами кісткового мозку.

Це невеликі клітини поліморфної форми. Для них характерне багатодольчате сегментоване ядро, а також наявність в цитоплазмі великої кількості гранул. Крім циркулюючої крові нейтрофіли містяться в інших паренхіматозних органах, локалізуючись, як правило, навколо кровоносних судин.

Функції цих клітин надзвичайно різноманітні та відіграють важливу роль в розвитку бактерицидних та цитолітичних реакцій, в патогенезі запалення та фіброгенезі.

Характерною рисою діяльності нейтрофілів є швидкість та інтенсивність розвитку реакції. Вони першими вступають в контакт з патогеном та являються ініціаторами каскаду імунних реакцій. Цьому сприяє їх мобільність та багато

численність.

*Основні функції:*

1. Фагоцитарна функція (внутрішньоклітинний кілінг).
2. Внутрішньоклітинний цитоліз.
3. Секреторно-регуляторна функція.
4. Ініціація запальних реакцій.
5. Участь в процесах звертання крові

*Гранулоцити та тромбоцити.* Клітини цієї групи об'єднує не тільки споріднене походження, але і багато численні морфологічні та функціональні особливості. Їх цитоплазма заповнена великою кількістю гранул, які містять токсичні для бактерій та паразитів речовини. Тому їх основний кілерний ефект виникає в результаті звільнення таких речовин із гранул у позаклітинний простір. Ці процеси включаються після отримання клітиною відповідних сигналів і проходять досить інтенсивно. Клітини даної групи містяться в циркулюючій крові у досить незначній кількості. Локалізовані вони переважно у тканинах.

*Еозинофіли* – лейкоцити, яких серед білих клітин крові досить незначна кількість (2-5%). Це крупні клітини з двохдольчатим ядром. Цитоплазма містить велику кількість гранул, що являють собою клітинні органели з кристалоподібною серцевиною, оточеною ліпідними мембранами.

*Основні функції:*

1. Позаклітинний цитоліз.
2. Фагоцитарна функція.
3. Секреторно-регуляторна функція.

*Базофіли* – гранулоцити, яких містяться в циркулюючій крові ссавців менше 1% від загальної кількості лейкоцитів. Це середніх розмірів клітина, яка має сегментоване ядро. Цитоплазма заповнена гранулами, які оточені мембраною. Найбільш важливою функцією цих клітин вважають миттєве звільнення вмісту гранул у позаклітинний простір, що зумовлює розвиток алергічних реакцій. При цьому гранули спочатку зливаються між собою, після чого зливаються із зовнішньою мембраною та звільнюють її вміст. Базофіли рухливі, здатні до фагоцитозу, але не можуть ділитись та відновлювати гранули.

*Тучні клітини* – являються аналогами базофілів, локалізованих в тканинах. Вони практично відсутні в циркулюючій крові. Вони крупніші базофілів та мають неправильну форму. В цитоплазмі велика кількість гранул, склад яких аналогічний складу гранул базофілів, але вони багатше трипсиноподібними протеазами. Розрізняють дві субпопуляції тучних клітин:

- тучні клітини сполучної тканини
- тучні клітини слизової оболонки.

*Основні функції:*

1. Позаклітинний цитоліз.
2. Секреторно-регуляторна функція

*Тромбоцити* приймають участь у реакціях імунної відповіді. Вважають, що тромбоцити локалізуються в основному у складі циркулюючої крові. Крім функції зсідання крові, тромбоцити приймають участь в імунних процесах в основному в якості своєрідного депо активних субстанцій. Ці субстанції звільняються під впливом різноманітних факторів, які утворюються в результаті

запальних процесів: імунних комплексів, фактора активуючого тромбоцита.

### *Антигенпрезентуючі клітини.*

*Лімфоцити* – найбільш вивчені та важливі клітини крові, які приймають участь в процесі формування адаптивного антиген специфічної імунної відповіді.

Лімфоцити складають основну клітинну масу лімфоїдних органів, а у деяких ссавців більше 95% клітин лімфи. Морфологічно розрізняють три типи лімфоцитів:

1. Малі лімфоцити – ядро з глибами хроматину (іноді у вигляді спиць колеса), цитоплазма гомогенна, рибосом мало.
2. Середні лімфоцити – в ядрі щільний хроматин, рибосом мало.
3. Великі лімфоцити – світле велике ядро з зернятками хроматину і ядерцями, велика кількість рибосом.

*В-лімфоцити* є основною клітинною структурою, завдяки якому розвивається гуморальна імунна відповідь. Він характеризується продукуванням специфічних циркулюючих антитіл. В процесі дозрівання В-лімфоцити мігрують із кісткового мозку в периферичні лімфоїдні органи, де локалізується в основному в лімфоїдних фолікулах. Вважається, що період життя складає декілька місяців. В –лімфоцити мають рецептори, які дозволяють контактувати не тільки з антигенами, але і з іншими клітинами.

#### *Основні функції В-лімфоцитів:*

- 1.Продукування імуноглобулінів (антитіл).
- 2.Антигенпрезентуюча функція.
- 3.Секреторно-регуляторна функція

*Т –лімфоцити* – це велика група лімфоцитів, яка приймає участь у формуванні специфічного імунітету. Вони характеризуються високою активністю та гетерогенністю. Свою назву Т-лімфоцити отримали в зв'язку з особливостями свого розвитку. Основні етапи їх дозрівання відбуваються в тимусі. Інша назва – тимус-залежні лімфоцити, Т-клітини.

#### *Основні функції Т-лімфоцитів:*

- 1.Т-хелпери – приймають участь в індукції специфічної імунної відповіді, допомагаючи іншим клітинам розвивати або цитотоксичні реакції, або гуморальні реакції, пов'язані з виробленням антитіл.
- 2.Цитотоксичні Т-клітини (кілери) здійснюють безпосередній контактний Кіплінг клітини мішені.
3. Секреторно-регуляторна функція

Розподіл Т- і В-лімфоцитів у центральних та периферичних органах імунної системи значно різниться.

Наприклад: У периферичній крові людини Т-лімфоцити становлять 50-60%, В-лімфоцити – 25-30%. Останні 10-20% лімфоцитів не мають ознак Т- або В-лімфоцитів, не залежать від Тимусу чи еквівалента бурси Фабриціуса і утворюють третю популяцію так званих нульових клітин, або НК – клітин. Можливо, останні є попередниками Т-лімфоцитів.

Розроблено ряд методів, за допомогою яких розділяють популяції Т- і В-лімфоцитів: адгезії (прилипання) на склі, адгезії на нейлоновій ваті, фільтрації через спеціальні сефадекси в колонках, розеткоутворення (нагромадження



еритроцитів навколо лімфоцита), імунофлуоресценції, реакції бластранформації лімфоцитів, лізису лімфоцитів специфічними цитотоксичними сироватками.

В електронному мікроскопі можна виявити морфологічні відмінності між Т- та В-лімфоцитами: поверхня у Т-лімфоцитів гладенька, у В-лімфоцитів покрита численними волосинками.

*Природні кілери* (NK-клітини) - не несуть на своїй поверхні ні маркерів Т-, ні маркерів В-лімфоцитів і відносяться до групи так названих 0-клітин. Це великі гранулярні лімфоцити. Цитоплазма містить велику кількість гранул, які містять перфорин, а також гранзими.

Основні функції:

1. Кілтерна активність.

2. Секреторно-регуляторна функція.

*Плазматичні клітини* вперше описані Валдейером (1875), Каял (1890), Унна (1891) і Маршалко (1895). Клітини плазмоцитарного ряду диференціюються з В-клітин.

В процесі функціональної активності плазматична клітина проходить декілька стадій розвитку. Вони розміщуються за ступенем її зрілості: плазмобласт – юна плазматична клітина – зріла плазматична клітина. Цитоплазма плазматичних клітин переповнена ергастоплазматичними мішечками, стіни яких усіяні багато численними рибосомами, де, як відомо, відбувається синтез білка. Плазматичну клітину іноді називають одноклітинною білковою залозою. Плазматичні клітини основні продуценти гуморальних антитіл. Антитіла починають синтезуватися уже в плазмобластах.

Лімфоцити є функціонально неоднорідною групою клітинних елементів, основними з яких є популяції Т- і В-лімфоцитів. При нормальному клітинному зростанні здійснюється суворий контроль за інтенсивністю процесів проліферації і диференціювання різних субпопуляцій лімфоїдних клітин.

Ідентифікація лімфоцитів заснована на наявності у них диференційованих маркерів.

Одним з маркерів Т-лімфоцитів тварин, як і лімфоцитів людини, є наявність рецептора до еритроцитів барана і їх здатність зв'язувати ці еритроцити, на чому заснований тест спонтанного утворення розеток (Е-розеток) з еритроцитами барана (Weiden E. Z. et al., 1981; Higgins D. A. et al, 1981 і ін.), проте на відміну від Т-лімфоцитів людини Т-лімфоцити тварин утворюють нестійкі розетки, які легко розпадаються, що утрудняє їх тестування цим методом (Нагаєва Л.І. і ін., 1988).

У зв'язку з цим, за даними ряду публікацій (Nakanishi H. et al., 1983 і ін.) використання методу Е-розеткоутворення (Рис.1) дозволяє виявити популяцію Т-лімфоцитів в межах 8-61%, що свідчить про низьку відтворюваність методу, який до того ж ускладнений великим тимчасовим чинником і вимагає дотримання ряду певних умов при проведенні реакції.

Визначення рівня субпопуляцій лімфоцитів методом моноклональних антитіл (за CD-маркерами) надає лише кількісну інформацію, однак важливою є не тільки наявність тих чи інших клітин, але і якість виконання ними своїх функцій. При цьому в розеткоутворюючі реакції залучаються переважно активовані лімфоцити, тобто ця методика надає певну інформацію і про функціональний бік імунокомпетентних клітин. Зазначена особливість може пояснювати розходження в показниках субпопуляцій лімфоцитів, визначених за методикою моноклональних антитіл до CD і шляхом розеткоутворення.

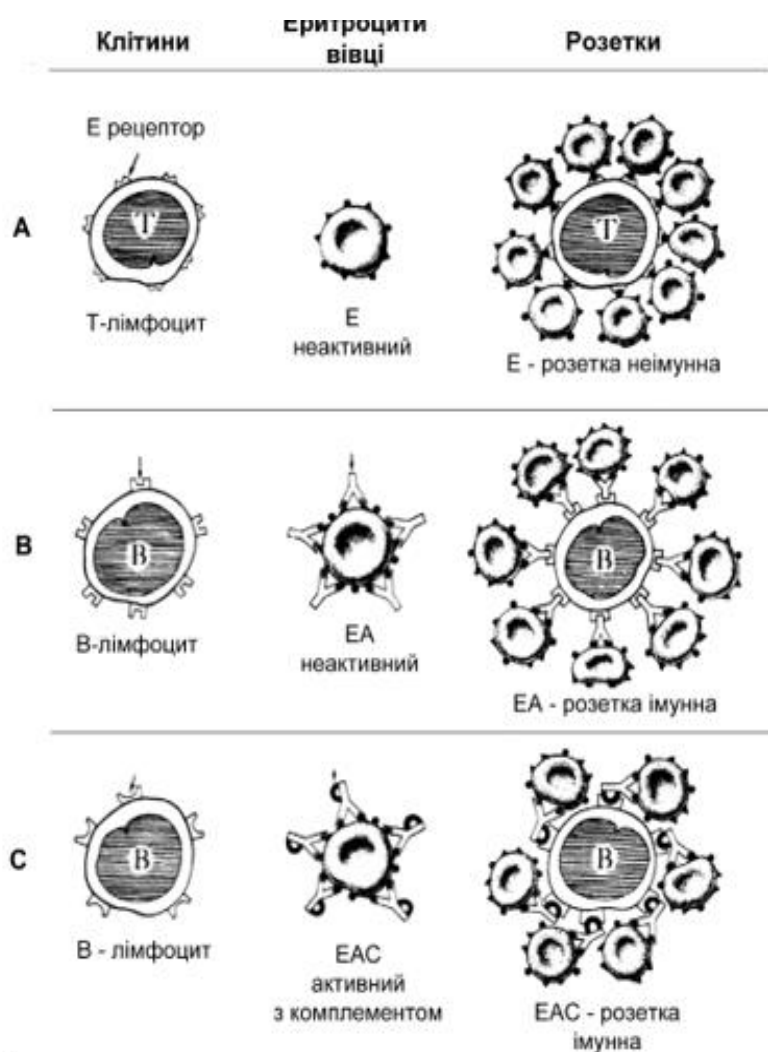


Рис. 1. Схематичне зображення різних типів розеткоутворюючих лімфоцитів (A — утворення E-неімунної розетки; B — утворення EA-імунної розетки; C — утворення EAC-імунної розетки)

При виділенні T- і B-лімфоцитів методом E-розеткоутворення необхідно заздалегідь провести наступну підготовчу роботу.

**Необхідні реактиви і прилади:**

1. Суха кроляча гемолітична сироватка.
2. Середовище 199.
3. Розчин Олсвера.

4. Комплемент (порошок).
5. Розчин глютаральдегіду.
6. Градієнт фікол-верографін щільністю 1,077.
7. Рідина Тюрка.
8. Фарба Романовського-Гімза.
9. Ареометр.
10. Камера Горяєва.
- 11.Центрифуга на 500-2000 об/хв.
- 12.Холодильник побутовий.
- 13.Термостат.
- 14.Мікроскоп біологічний біокулярний.
- 15.Пробірки пластикові об'ємом 10,0мл
- 16.Піпетки-дозатори.

### **Отримання еритроцитів барана**

1. Беруть кров з яремної вени барана в стерильну колбу з «бусами». Інтенсивним струшуванням видаляють фібрин, фільтруючи потім через марлю.
2. Отримані еритроцити центрифугують із забуференим фізіологічним розчином або з середовищем 199 5-10 хвилин при 1800-2000 тис. оборотах за хвилину.
3. До еритроцитів барана додають розчин Олсвера. В день дослідження еритроцити барана знову відмивають 1-2 рази.
4. Для постановки реакції Е-розеткоутворення з Т-лімфоцитами готують 0,5%-ву суспензію еритроцитів барана, для чого до 0,25 мл осаду еритроцитів барана додають 5,0 мл середовища 199 (готують в день дослідження).

### **Приготування комплексу ЕАС для реакції Е-розеткоутворення з В-лімфоцитами**

1. У ампулу з сухою кролячою гемолітичною сироваткою додають 1,0 мл забуференого фізіологічного розчину або середовища 199 і інактивують у водяній бані при 56<sup>0</sup>С протягом 30 хвилин.
2. Робочий розчин сироватки готують таким чином: до 0,01 мл сироватки додають 5 мл середовища 199 (1:50).
3. Для отримання 5%-вої суспензії еритроцитів барана беруть 5 мл робочого розчину сироватки і додають до неї 5 крапель суспензії еритроцитів барана, ретельно перемішують.
4. Отриману суміш інкубують при 37<sup>0</sup>С протягом 30 хвилин, помішуючи кожні 10 хвилин.

### **Приготування комплекменту**

1. Готують комплемент з сухого порошку згідно інструкції, що додається.
2. Робоче розведення комплекменту отримують шляхом узяття 0,2 мл початкового комплекменту і додаванням до нього 3 мл середовища 199 (1:15).

## Приготування комплексу

1. Проінкубовану в термостаті суміш сироватки з еритроцитами барана розливають в 2 пробірки по 2 мл в кожную.
2. Потім в кожную пробірку підливають по 0,1 мл робочого розчину комплементу.
3. Інкують в термостаті при 37°C протягом 30 хвилин, перемішуючи через кожних 10 хвилин.
4. Трикратно відмивають середовищем 199 при 1200-1500 оборотів за хвилину по 5-10 хвилин.
5. Отриманий осад доводять середовищем 199 до 5,0 мл і зберігають в холодильнику.

## Приготування розчину глутаральдегиду для фіксації розеток

У два флакони пеніциліну або до пробірок вносять 120 мкл основного 25%-ного розчину. Безпосередньо перед використанням додають по 4,88 мл забуференого фізіологічного розчину або середовища 199.

В день постановки реакції Е-розеткоутворення перед узяттям крові для дослідження необхідно зробити наступне:

1. Розлити фікол–верографін з градієнтом щільності 1,077 по 4,0 мл в пластикові пробірки об'ємом 10,0 мл
2. Розлити середовище 199 по 4-6 мл в пластикові 10,0 мілілітрові пробірки для перенесення кільця лімфоцитів.
3. Розлити рідину Тюрка по 200 мкл в 2 ряди 4-5 мілілітрові пластикові пробірки.
4. Розлити розчин метиленового синього в 4-5 мл пластикові пробірки для визначення відсотка живих і мертвих лейкоцитів. Пробірки з розчинами зберігають в холодильнику при 4°C.

## Виділення лімфоцитів

1. Вносять 5,0мл стабілізованої крові до пробірки з розлитим заздалегідь середовищем 199. Розведену кров обережно нашаровують на градієнт. Загальний об'єм складає 10,0мл

2. Центрифугують при 1800 об/хвилину протягом 40 хвилин. Супернатант видаляють.

3. Знімають кільце лімфоцитів і переносять в пробірку з середовищем 199, перемішують і доводять об'єм до 10,0 мл. Центрифугують 10 хвилин при 1800 об/хв.

4. До отриманого осаду додають 8,5-9,0мл холодної дистильованої води і доводять до 10,0мл 10 кратним розчином Хенкса.

5. Центрифугують 5-7 хвилин при 1800 об/хвилину тричі.

6. До осаду лімфоцитів додають 1-2 мл середовища 199, ретельно ресуспендують і визначають за допомогою камери Горяєва концентрацію, для чого до 200 мкл рідини Тюрка додають 10мкл лімфоконцентрату. Для постановки реакції необхідна концентрація 2-3 тис/мкл.

## Постановка реакції Е-РУЛ для визначення кількості Т-лімфоцитів

1. У пробірку з 0,25мл 0,5% суспензії еритроцитів барана, вносять 0,25мл готової суспензії лімфоцитів.
2. Інкують при кімнатній температурі 30-40 хвилин, перемішуючи обережним похитуванням пробірки кожні 10 хвилин, потім центрифугують 5 хвилин при 500-800 об/хв, після чого інкують в холодильнику 18-24 години.
3. Після інкубації в холодильнику додати в пробірку 2 краплі 0,6% глутаральдегіду, не перемішуючи залишити на 10-20 хвилин.
4. Холодною дистильованою водою трикратно відмивають протягом 5 хвилин при 700-100 об/хв.
5. Залишити в пробірці 0,2мл рідини, ресуспендувати осад і приготувати мазки, які потім висушити вентилятором.
6. Приготовані мазки фіксують метанолом 7-10 хвилин, після чого промивають дистильованою водою. Висушують під вентилятором і фарбують за Романовським-Гімзою 0,5-1,5хв., промивають дистильованою водою і висушують.

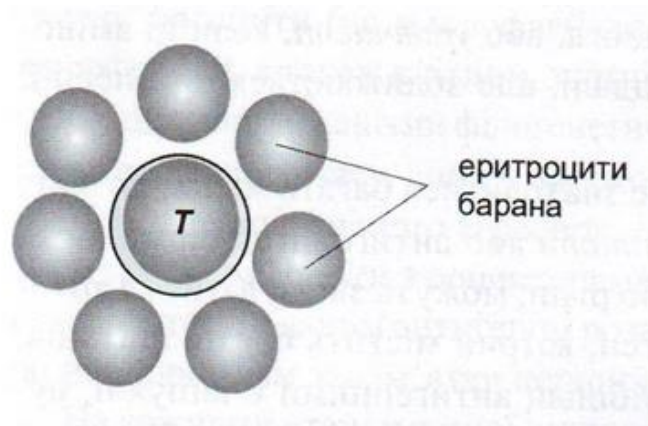


Рис. 2. Розеткоутворюючий лімфоцит (середня щільність рецепторів)

### Підготовка системи для визначення Т-хелперів (CD4<sup>+</sup> Т-лімфоцитів).

Метод визначення цієї субпопуляції Т-лімфоцитів ґрунтується на тому, що Т-хелперні клітини несуть на своїй поверхні рецептори до імуноглобулінів класу М, а Т-супресори – до імуноглобулінів G. Хелперними вважають лімфоцити, які здатні формувати розетки після їх інкубації з теофіліном – це теофілінрезистентні клітини. При цьому готують 0,09 % розчин теофіліну на забуференому фізрозчині (ЗФР).

У пробірки вносять 0,1 см<sup>3</sup> суспензії лімфоцитів, додають 0,1 см<sup>3</sup> 0,09 % розчину теофіліну, інкують протягом 30 хв при температурі 37°C, потім двічі відмивають ЗФР протягом 10 хв. Відбирають надосад, осад ресуспендують, додають 0,1 см<sup>3</sup> 0,5 % зависі ЕК, інкують 7 хв при температурі 37°C,

центрифугують 5 хв при 1000 об/хв. Пробірки ставлять у холодильник при температурі 4°C на 1 год, після чого фіксують протягом 10 хв 0,3 % розчином глютарового альдегіду, додаючи його у кількості 0,1 см<sup>3</sup>, зупиняють фіксацію додаванням 0,4 см<sup>3</sup> дистильованої води, потім центрифугують 5 хв при 1000 об/хв, відбирають надосад, осад ресуспендують і роблять мазок на предметному склі.

Приготування мазків. Для приготування мазків використовують чисте, знежирене метанолом (30 хв) предметне скло. Одержаний осад із пробірки переносять на предметне скло, роблять мазок, який висушують на повітрі. Фіксують мазок метанолом протягом 3 хв, висушують його на повітрі, після чого фарбують за Романовським-Гімзою протягом 7 хв, змивають струменем дистильованої води, висушують та проводять підрахунок кількості розеткоутворюючих клітин під мікроскопом. Для приготування фарби беруть 3 см<sup>3</sup> концентрованої фарби Романовського і 17 см<sup>3</sup> дистильованої води.

Мікроскопія мазків. Подальша процедура включає мікроскопію мазків під імерсією, з допомогою бінокулярного мікроскопу, при збільшенні 90 х 7.

Опрацювання результатів. У мазку підраховують кількість розеткоутворюючих лімфоцитів (рис.3). Лімфоцити, які приєднали 3-5 ЕК, вважають малодиференційованими, ті які приєднали 6-10 ЕК – лімфоцитами із середньою щільністю рецепторів, лімфоцити, що приєднали 11 і більше ЕК (морула), вважають високодиференційованими, а ті, що взагалі не приєднали жодного еритроциту – нульові клітини.

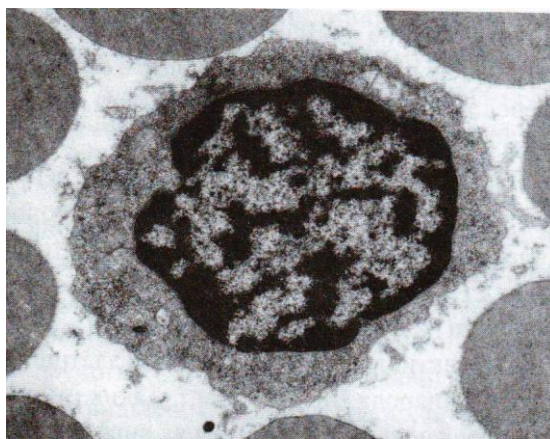


Рис. 3. Т-лімфоцит, який утворив розетку з еритроцитами

Кількість теофілінчутливих лімфоцитів-супресорів визначають за різницею, отриманою після віднімання від загальної кількості Е-РУЛ числа хелперів.

*Інтерпретація.* Тест розеткоутворення з еритроцитами дозволяє дослідити відносну кількість і співвідношення Т-лімфоцитів та їх популяцій у

периферичній крові з метою визначення порушень у системі Т-клітинного імунітету.

Підвищення вмісту Т-лімфоцитів спостерігається при лімфопроліферативних захворюваннях, реакції гіперчутливості сповільненого типу – ГСТ (різновидність алергічної реакції, яка здійснюється за рахунок Т-клітин, приклад – алергічний дерматит), реконвалесценції, туберкульозі.

Недостатність Т-клітинної ланки імунітету відмічають при рецидивуючих вірусних, грибкових інфекціях, інвазіях найпростіших, гельмінтозах, бактеріальних хронічних інфекціях, тяжких ускладненнях при вакцинації живими вакцинами; туберкульозі, пухлинних захворюваннях, стресах, імунодефіцитах, травмах, опіках, крововиливах, деяких формах алергії, інфарктах.

До причин підвищення вмісту Т-хелперів відносять інфекції, алергії, автоімунні захворювання (системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, васкуліти, гемолітична анемія, автоімунні гломерулонефрити та ін.).

Причини зниження вмісту Т-хелперів: імунодефіцитні стани, СНІД, цитомегаловірусна інфекція.

Відношення Т-хелперів до Т-супресорів (CD4+/CD8+) більш об'єктивно відображає напрямки імунорегуляторних процесів, ніж окремі показники обох субпопуляцій Т-клітин. Імунорегуляторний індекс використовується в якості одного з найбільш інформативних при оцінці ефекту імунокорекції.

Таблиця 1 – Відносна кількість Т-лімфоцитів у крові тварин, %

Показник	Вид тварин					
	ВРХ	Вівці	Свині	Коні	Собаки	Коти
CD3+	45–53	56–64	45–57	38–66	46–72	31–89
CD4+	8–31	8–22	23–43	56	27–33	19–49
CD8+	10–30	4–22	17–39	20–37	17–18	6–39
CD4/CD8	1,53	1,55	1,40	4,75	1,70	1,9

### **Постановка реакції ЕАС-РОК для визначення кількості В-лімфоцитів**

1. В пробірку з 0,25мл комплексу додають 0,25мл суспензії лімфоцитів, інкубують 30 хвилин при 37<sup>0</sup>С перемішуючи кожні 10 хвилин.

2. Додають по 2 краплі 0,6%-ного розчину глутаральдегіду, не перемішуючи витримують 10-20 хвилин.

3. Холодною дистильованою водою трикратно відмивають протягом 5 хвилин при 700-1000 об/хв.

4. Залишити в пробірці 0,2мл рідини, ресуспендувати осад і приготувати мазки, які потім висушити під вентилятором.

5. Фіксація і забарвлення мазка здійснюється так само, як і у випадку з Т-

лімфоцитами.

*Інтерпретація.* Недостатність В-клітинної ланки імунітету відмічають при рецидивуючих та тяжких бактеріальних інфекціях (отити, синуїти, пневмонії, бронхіти, кон'юнктивіти, сепсис, менінгіт) та при імунодефіцитних станах.

Таблиця 2 – Відносна кількість В-лімфоцитів у крові тварин, %

Велика рогата худоба	Вівці	Свині	Коні	Собаки	Коти
16–21	11–50	13–38	17–38	7–30	6–50

### Контрольні запитання

1. Назвіть функції Т-лімфоцитів.
2. Назвіть функції В-лімфоцитів.
3. Яка роль комплементу.
4. Як виділити суспензію лімфоцитів?
5. На чому ґрунтується реакція ЕАС-РОК?
6. Опишіть послідовність реакції розеткоутворення для визначення кількості Т-лімфоцитів.
7. Опишіть послідовність реакції розеткоутворення для визначення кількості В-лімфоцитів.



## ТЕМА 2. ДОСЛІДЖЕННЯ ЧИННИКІВ ПРИРОДНОГО ІМУНІТЕТУ

*Мета:* Ознайомити здобувачів з неспецифічними клітинними і гуморальними чинниками імунної системи.

Організм має в своєму розпорядженні ряд неспецифічних речовин, здатних самотійно або в поєднанні один з одним викликати нейтралізацію чужорідних чинників.

До найбільш важливих гуморальних неспецифічних чинників резистентності відносять лізоцим, систему комплементу, бактерицидну активність сироватки крові.

**Лізоцим** є основний білок, що складається з 129 амінокислотних залишків. За своєю природою він є ферментом з мурамидазною активністю, яка виявляється в гідролізі β-глікозидного зв'язку поліцукридів клітинної стінки переважно грампозитивних мікроорганізмів. В наслідок порушення цілісності мікробної оболонки відбувається зміна внутріклітинного осмотичного тиску, що приводить до лізису клітини. Грамнегативні мікроби в інтактному вигляді стійкі до дії лізоциму, у наслідок екранування поліцукридного шару ліпідної оболонки.

Окрім бактерицидної і бактеріостатичної дії на мікроорганізми, лізоцим оказує активуючу дію на фагоцитарну функцію клітин.

**Система комплементу.** Комплемент складається з дев'яти компонентів глобулінової природи, розглядується як комплекс проензимів, що вимагають активації. Комплемент виконує численні біологічні функції: імунний лізис мікробних клітин, сенсibiliзованих антитілами; участь у фагоцитозі (у хемотаксисі, аттракції і опсонізації; у розпізнаванні лімфоцитами антигенів; у анафілаксії).

**Бактерицидна активність сироватки крові.** Лізоцим, комплемент, природні антитіла (особливо імуноглобуліну класу М) і інші гуморальні чинники імунітету, беруть участь в механізмі забезпечення бактерицидної активності сироватки крові, тобто ці реакції є відображенням фінальних протимікробних процесів.

### Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів

**Принцип методу.** Фагоцитоз є головним механізмом природної резистентності, а також обов'язковою ланкою індукції і формування специфічної імунної відповіді. Фагоцитуючу роль виконують поліморфно-ядерні лейкоцити (ПМЯЛ). Нейтрофільні гранулоцити найчастіше фагоцитують збудників гострих інфекцій. У гранулах фагоцитів міститься набір неферментних катіонних білків,

лізоцим, мієлопероксидаза, за рахунок яких відбувається пригнічення активності фагоцитованих бактерій та їх перетравлення.

*Реактиви.* М'ясо-пептонний агар, фізіологічний розчин, дистильована вода, культура *St. aureus* або *E. coli*, фіксатор для мазків (метанол, етанол), фарба Романовського-Гімза, масло імерсійне для мікроскопії.

*Обладнання.* Мікроскоп, пробірки, піпетки, штативи, ФЕК, термостат.

*Хід визначення.* Гепаринізовану кров вносять у пробірки в кількості 0,2 мл і мікропіпеткою додають, стандартизований до 2 млрд/мл завис добової культури *E. coli*, штаму № 078. Вміст пробірок добре збовтують і ставлять на водяну баню при температурі 37 °С на 30 хв. Потім готують на предметних скельцях мазки, висушують, фіксують і фарбують за Романовським-Гімза. У кожному мазку підраховують 100 нейтрофілів. В якості показників фагоцитозу визначають фагоцитарну активність (ФА) за кількістю активних лейкоцитів з 100 підрахованих (%). Фагоцитарний індекс (ФІ) за кількістю фагоцитованих мікробних тіл, яка припадає на один активний нейтрофіл і характеризує поглинаючу здатність фагоцитів, фагоцитарне число (кількість фагоцитованих мікробних тіл на 100 підрахованих нейтрофілів).

Вираховують фагоцитарне число (ФЧ) і фагоцитарний індекс (ФІ) за формулами:

$$\text{ФІ} = \text{к-сть фагоцитованих мікроорганізмів} / \text{ФА};$$

$$\text{ФЧ} = \text{к-сть фагоцитованих мікроорганізмів} / 100.$$

*Інтерпретація.* Фагоцитарна активність у тварин змінюється з віком, при зміні фізіологічного стану організму, умов годівлі та утримання, а також при різних захворюваннях. Повне пригнічення фагоцитарного процесу зустрічається при імунодефіцитах, захворюваннях шлунково-кишкового тракту, суттєво знижується фагоцитарна активність у тварин з піогенними інфекціями, при токсичних формах пневмоній, інтоксикаціях, порушеннях обмінних процесів.

Таблиця 1– Показники фагоцитозу крові сільськогосподарських тварин

Показники	Вид тварин			
	Телята на відгодівлі	Лактуючі корови	Молодняк свиней на відгодівлі	Свиноматки супоросні
Фагоцитарна активність, %	36–84	30–59	44–65	35–68
Фагоцитарний індекс, од.	7–14	9–12	4–7	5–7

### Тест з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест)

*Принцип методу.* Існує два типи фагоцитозу бактерій (кілінгу) – кисень незалежний і кисень залежний. Спочатку в фагоцитозі задіяний кисень

незалежний механізм – це дія ферментів, катіонних білків і інших речовин. Якщо цього недостатньо фагоцит починає діяти за допомогою кисень залежного кілінгу, більш складного та енергозатратного – активується фермент НАДФ-оксидаза, в результаті дії якого в фагоциті утворюються активні форми кисню (супероксид-аніон радикал, перекис водню, радикал гідроперекису і ін.).

Викид у клітині цих токсичних речовин називається кисневим (респіраторним) вибухом, який можна виявити за допомогою НСТ-тесту. При постановці цього тесту до фагоцитів додають нітросиній тетразолій (блідо-жовтого кольору), який поглинається клітиною і, в присутності активних форм кисню, переходить у темно-синій диформазаан. Чим більше гранул диформазаану в клітині, тим сильнішим є кисеньзалежний кілінг.

Розрізняють два варіанти НСТ-тесту: спонтанний та активований. При постановці спонтанного НСТ-тесту фагоцити культивуються в присутності нітросинього тетразолію без попередньої активації клітин, при проведенні індукованого НСТ-тесту до середовища культивування додають активатор фагоцитарної реакції (орнітозний алерген, пірогенал, завись живого стафілококу 209–Р і ін.).

*Реактиви.* Гепарин (4–5 МО/мл), 0,2 % розчин НСТ в ізотонічному розчині NaCl, розчин пірогеналу 25–30 МПД/мл на 0,2 М фосфатному буфері (рН 7,2), фіксатор для мазків (метанол, етанол), фарба Романовського-Гімза.

*Обладнання.* Мікроскоп, стерильні пробірки, піпетки, предметні скельця, центрифуга.

*Хід визначення.* Кров центрифугують 10 хв при 1000 об/хв. Беруть із лейкоцитарної плівки, яка знаходиться в пробірці між плазмою і еритроцитами, по 0,1 мл зависі в дві пробірки.

У першу пробірку вносять 0,05 мл пірогеналу, в другу — еквівалентну кількість буферного розчину. Через 5 хв додають у пробірки по 0,1 мл 0,2 % розчину нітросинього тетразолію. Обережно перемішують вміст пробірок і інкубують їх у термостаті 30 хв при 37 °С.

Охолоджують пробірки протягом 10–15 хв при кімнатній температурі, перемішують вміст і готують мазки, які після висушування і 5 хв фіксації в метанолі фарбують за Романовським-Гімзою.

Реакцію оцінюють шляхом підрахунку 100–200 нейтрофілів і моноцитів на наявність у цитоплазмі гранул і зерен диформазаану. Необхідно вивести відсоток формазаанпозитивних клітин у спонтанному тесті та в активованому. Визначають також їх абсолютний вміст 1 мкл крові.

Для характеристики резервних можливостей кисеньзалежного метаболізму визначають показник резерву (ПР) і коефіцієнт метаболічної активації нейтрофілів або моноцитів (К).

$$ПР = АВ / СВ; К = АВ - СВ / АВ,$$

де:

АВ – % формазанпозитивних клітин в активованому тесті;

СВ – теж у спонтанному тесті.

*Інтерпретація.* Дослідження спонтанного НСТ-тесту дає інформацію про стан функціонально-метаболическої активності лейкоцитів і може слугувати критерієм порушення фагоцитарної функції, а також для оцінки прооксидантної системи організму. Спонтанний НСТ-тест дозволяє оцінити ступінь активації кисеньзалежних механізмів кілінгу неактивованих фагоцитів. Він відображає активність інтралейкоцитарної бактерицидної системи, як однієї з важливих ланок неспецифічної резистентності організму. Показник НСТ-тесту підвищується в початковий період гострих бактеріальних інфекцій, при гнійно-запальних процесах, тоді як при підгострому і хронічному перебігу інфекційного процесу він знижується, що свідчить про недостатність фагоцитозу.

Значення активованого НСТ-тесту характеризує активність фагоцитуючих клітин у присутності антигенного подразника і розглядається, як біологічний критерій їх готовності до завершеного фагоцитозу.

Постановка НСТ-тесту в двох варіантах дозволяє розрахувати функціональний резерв клітин, який представляє собою різницю між числом (інтенсивністю) активованих диформазанпозитивних клітин і кількістю (інтенсивністю) спонтанних диформазанпозитивних клітин.

Таблиця 2 – Показники НСТ-тесту, %, од.

Тварини	СВ	АВ	ПР	К
Телята до 3 місяців	10,2±4,5	56,7±4,3	5,6	0,84
Корови 3–5 лактації	5,3±1,5	49,6±9,2	9,4	0,89
Поросята до 2 місяців	11,6±4,8	62,5±2,3	5,4	0,83

### Визначення вмісту лізоциму

Метод заснований на здатності лізоциму розчиняти зважений в агарі ацетоновий порошок з клітинних оболонок *Micrococcus lysodeihiticus*.

Вміст ферменту визначається виміром діаметру зони лізису навколо лунки в агарі, при внесенні до неї досліджуваного матеріалу.

*Хід реакції.* 1. Готують 1%-вий агар «Діфко» на 1/15 М фосфатному буфері рН 6,2, нагріваючи його до повного розчинення на водяній бані.

2. При 56<sup>0</sup>С розплавлений агар змішують з ацетоновим порошком *Micrococcus lysodeihiticus*, що заздалегідь суспензує в буфері, з розрахунку 10-20

міліграм на 100 мл об'єму.

3. Отриману суміш розливають в кювети з органічного скла в такій кількості, щоби отримати товщину шару 4 мм.

4. У застиглому агарі пробійником з діаметром 5 мм по трафарету на відстані 2-3 см від краю кювети і один від одного вирізують лунки.

5. Досліджуваний матеріал розводять 1/15 М фосфатним буфером: сироватку крові – 1:5; молозиво – 1:10; молоко – 1:2 і в об'ємі 0,05 мл вносять до лунок.

6. Паралельно з досліджуваним матеріалом роблять розведення буфером стандартного кристалічного лізоциму так, щоби отримати концентрації його в розчині: 0,5 мкг/мл; 1, 2, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 80 і 100 мкг/міліграм і в об'єм 0,5 мл поміщають в агарові лунки.

7. Кювети з досліджуваним матеріалом і стандартним лізоцимом поміщають у вологу камеру при кімнатній температурі.

8. Після 48 годин інкубації проводять вимір діаметру зон лізису ацетонового порошку біомаси *Micrococcus lysodeihiticus*.

9. На напівлогарифмічному папері будують калібрувальну криву, використовуючи отримані виміри зон лізису навколо лунок з розчином стандартного лізоциму з різними його концентраціями. При цьому на осі абсцис відкладають значення діаметрів в мм зон лізису, на осі ординат – відповідні значення концентрацій стандартного лізоциму в мкг/мл і будують калібрувальну криву.

10. Для визначення концентрації лізоциму в досліджуваному матеріалі проводять пряму від набутого значення діаметру зони лізису до перетину з калібрувальною кривою, а від точки перетину проводять пряму на вісь ординат і таким чином визначають дослідну величину, яку множують на число розведень.

#### *Необхідні реактиви і прилади*

1. Фосфатний буфер 1/15 молярні рН 6,2:4,539 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  розчиняють в 500 мл дистильованої води, 2,375  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  розчиняють в 200 мл дистильованої води.

2. Агар «Діфко».

3. Ацетоновий порошок біомаси *Micrococcus lysodeihiticus*.

4. Лізоцим кристалічний.

5. Аналітична вага високої точності.

6. Кювети з органічного скла.

7. РН-метр.

8. Ексикатор (волога камера).

9. Водяна баня.

10. Термометр на 100°C.

11. Пробійник з діаметром 5 мм.

*Інтерпретація.* Ферментативна активність лізоциму обумовлена руйнуванням зв'язку між N-ацетилмураміновою кислотою та N-ацетилглюкозаміном у мукополісахаридах. Утворені глюкопептиди характеризуються ад'ювантною активністю (стимулюють синтез антитіл, підвищують цитотоксичну активність, індукують гіперчутливість сповільненого типу).

Таблиця 3 – Лізоцимна активність сироватки крові великої рогатої худоби, %

Телята, вік							Молодня к на дорощ.	Молодня к на відгод.	Корови лактую ч
1 дн.	10 дн	30 дн	60 дн	3 міс.	4 міс.	6 міс.			
0–11	0–15	8–24	10–25	12–29	18–35	11– 28	10–39	13–31	10–25

### Визначення бактерицидної активності сироватки крові (БАСК)

Принцип методу. БАСК є інтегральним показником природної резистентності гуморального типу, яка свідчить про здатність крові до самоочищення. Бактерицидна активність крові відносно до мікроорганізмів пов'язана з наявністю в сироватці неспецифічних захисних компонентів (нормальних антитіл, лізоциму, комплементу, пропердину, інтерферону, бактеріолізинів) та інших факторів.

У методиці використана властивість сироватки крові оказувати бактерицидну і бактериостатичну дію на мікроорганізми. Рівень бактерицидної активності характеризується ступенем затримки приросту біомаси тест-мікробу в рідкому поживному середовищі.

Найбільшого поширення в клінічній та лабораторній практиці отримав спрощений фотонейлометричний метод визначення БАСК за О.В. Смирновою та О.В. Кузьміною (1966).

*Хід реакції.* На фізіологічному розчині готують суміш із добової культури ешеріхій, визначають її щільність на ФЕК-у. Вона має бути в межах 0,48.

У пробірку наливають по 4,5 мл стерильного м'ясо-пептонного бульйону, в дослідну пробірку додають 1 мл досліджуваної сироватки крові (без гемолізу), в контрольну – 1 мл фізіологічного розчину. Потім у всі пробірки вносять за допомогою шприца або мікропіпетки по одній краплі 24-годинної культури ешеріхій.

Вміст пробірок перемішують і стерильною піпеткою відбирають по 2 мл для вимірювання на ФЕК-у оптичної щільності ( $D_1$ ).

Суміш, яка залишилася у пробірках, інкубують у термостаті при 37°C 3 год. Після цього знову вимірюють оптичну щільність вмісту пробірок ( $D_2$ ). БАСК вираховують за формулою:

$$\text{БАСК, \%} = 100 - \frac{D_2 - D_1 \text{ (досліда)}}{D_2 - D_1 \text{ (контроля)}}$$

У розрахунках використовуються середнє арифметичне значення  $D_2 - D_1$  (контроля).

#### Необхідні реактиви і прилади

1. ФЕК-М із зеленим світлофільтром,

2. Кювети №2,
3. Стерильні пробірки та піпетки,
4. Стерильний фізіологічний розчин,
5. М'ясо-пептонний бульйон,
6. Добова культура кишкової палички,
7. Досліджувана сироватка крові,
8. Мікроскоп.

*Інтерпретація.* БАСК характеризується значними коливаннями у тварин різних видів в нормі (табл. 2) і під дією факторів зовнішнього середовища. Зниження її рівня спостерігається частіше, ніж підвищення, і характерне для різних стресових ситуацій, порушень умов годівлі, утримання та при виникненні захворювань, які протікають у скритій і хронічній формі. Підвищення бактерицидності крові відмічається при гострому перебігу захворювань і при стимулюючій дії різних факторів.

Таблиця 4 – Бактерицидна активність сироватки крові великої рогатої худоби, %

Телята, вік							Молодняк на дорощ.	Молодняк на відгод.	Корови і лактуючі
1 дн.	10 дн	30 дн	60 дн	3 міс.	4 міс.	6 міс.			
24–42	30–54	35–80	36–72	39–53	34–49	37–57	32–81	36–87	35–77

### **Комплементарна активність сироватки крові (по 100 % гемолізу)**

*Принцип методу.* Метод ґрунтується на здатності комплекменту сироватки крові лізувати еритроцити барана сенсibiliзовані гемолітичною сироваткою.

*Реактиви.* Еритроцити барана (ЕБ), відмиті забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), гемолітична сироватка стандартизована (ГС), фізіологічний розчин.

*Обладнання.* Планшет для постановки імунологічних реакцій, термостат, стерильні пробірки і піпетки.

*Хід визначення.* Визначення активності комплекменту починається з підготовки гемолітичної системи. Для цього змішують рівні об'єми 3 % зависі ЕБ і ГС, розведеної до 3-кратного титру. Одержану суміш ставлять в термостат при 37 °С на 30 хв для сенсibiliзації еритроцитів.

Досліджувану сироватку розводять фізіологічним розчином (ФР) 1:10 і розливають у лунки планшетки у кількостях: 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1. Потім у тій же послідовності розливають ФР: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9. Відповідно отримуємо розведення сироватки: 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01.

Планшет злегка похитують для перемішування і додають в кожну лунку по 0,5 мл гемолітичної системи. Перемішують кожну лунку піпеткою, роблять вологу камеру і ставлять планшет у термостат при 37 °С на 45 хв, потім при кімнатній температурі залишають до наступного дня.

Результат реакції враховується за найменшим розведенням сироватки, де спостерігається повний (100 %) лізис еритроцитів.

*Інтерпретація.* Під терміном «комплемент» розуміють цитотоксичну систему із 11 білків сироватки крові, лімфи і тканинних рідин, які, крім прямої цитотоксичної дії (неспецифічна система захисту), є також прискорювачами, каталізаторами багатьох імунологічних реакцій.

Активація комплекменту відіграє важливу біологічну роль в організмі тварин, сприяє посиленню фагоцитозу, хемотаксису або цитолізу чужорідних клітин.

У клінічно здорових тварин титр комплекменту знаходиться в межах 0,01–0,05 од.

### **Визначення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК)**

*Принцип методу.* Метод ґрунтується на вибірковій преципітації імунних комплексів, що знаходяться в сироватці крові, високомолекулярним поліетиленгліколем з наступним обліком результатів прямим спектрофотометруванням  $\lambda=315$  нм.

*Реактиви.* Боратний буфер 0,1 М (рН 8,4), 4 % розчин поліетиленгліколю (ПЕГ) з молекулярною масою 6000 Да.

*Обладнання.* Центрифуга, спектрофотометр, пробірки центрифужні, туберкуліновий шприц.

*Хід визначення.* Готують дві пробірки: дослідну і контрольну. В контрольну вносять 0,3 мл боратного буферу і 0,15 мл досліджуваної сироватки крові, ретельно перемішують вміст пробірки і переносять 0,22 мл у дослідну пробірку з наступним додаванням 2 мл поліетиленгліколю. Ретельно перемішують, інкубують протягом 1 год при кімнатній температурі і фотометрують. Вираховують різницю показників оптичної густини (ОГ) і результат перемножують на 1000 та одержують вміст імунних комплексів у 100 мл сироватки крові (од. ОГ/100 мл сироватки).

*Інтерпретація.* Циркулюючі імунні комплекси — це фізіологічні продукти реакції антиген–антитіло, що є частиною захисних імунних механізмів при захворюваннях різної етіології. Утворення імунних комплексів — інтегральний показник гуморальної імунної відповіді. Певний рівень імунних комплексів повинен обов'язково бути присутнім у крові, реалізуючи фізіологічні процеси гомеостазу. Підвищення рівня ЦІК у сироватці крові вказує на розвиток синдрому імунотоксикозу при певній патології.



Таблиця 5 –Кількість циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові сільськогосподарських тварин, ммоль/л

Корови	Телята	Свиноматки	Поросята	Качки	Гуси	Кури
80–110	45–78	74–91	67–80	23–40	25–44	32–53

### Контрольні запитання

1. Яка роль лізоциму у імунному захисті організму?
2. Яка роль комплементу у імунному захисті організму?
3. Чим обумовлена бактерицидна активність сироватки крові?
4. Опишіть послідовність реакції визначення лізоцимної активності сироватки крові.
5. Опишіть послідовність реакції БАСК.
6. Принцип методу визначення фагоцитарної активності нейтрофілів.
7. Принцип методу визначення циркулюючих імунних комплексів.
8. Принцип методу тест з нітросинім тетразолієм.

### ТЕМА 3. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ СИРОВАТКОВИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

*Мета:* Ознайомити здобувачів з гуморальними чинниками захисної реакції організму.

Імуноглобуліни відіграють найважливішу роль в імунному захисті організму. Вони входять до структури одиниць розпізнавання антигену, локалізуючись на зовнішній мембрані лімфоцита, а також беручи участь в опсонізації, хемотаксисі і атракції антигену на мембрані фагоцитарних клітинах.

Імуноглобуліни відносяться до групи білків, що синтезуються клітинами лімфоїдної тканини у відповідь на антигени різноманітної природи. У цю групу входять імуноглобуліни сироватки, імуноглобулінові рецептори лімфоїдних клітин і білки, що є продуктами незакінченого синтезу або катаболізму імуноглобулінів. Усі ці типи імуноглобулінів мають загальний принцип будови і функціональну спорідненість, яка полягає в забезпеченні стійкості до захворювань та регуляції гомеостазу. Біологічні функції імуноглобулінів різноманітні. У якості антитіл вони здатні специфічно взаємодіяти з антигеном, який викликав їх утворення. Крім цього, виконувати різні ефекторні функції, такі як здатність зв'язувати комплемент, фіксуватись на клітинах, вибірково проникати через клітинні мембрани та ін.

Існує п'ять класів імуноглобулінів: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, які різняться своїми біологічними, фізико-хімічними та антигенними властивостями. Усі вони мають два типи поліпептидних ланцюгів: легкі з молекулярною масою 20000 і тяжкі, молекулярна маса яких коливається від 53000 до 75000 дальтон. Кількість легких і тяжких ланцюгів в імуноглобулінів різних класів неоднакова, але їх співвідношення завжди дорівнює 1.

Імуноглобуліни класу G становлять 70–80 % глобулінів сироватки у тварин. IgG мають декілька підкласів: IgG1, IgG2 у функціональному відношенні складають біля 90 % антитіл: антитоксинів, антибактеріальних і антивірусних. IgG1 проникають через епітелій молочної залози в молозиво і відіграють важливу роль у захисті новонароджених телят від інфекцій.

IgM становлять приблизно 10 % імуноглобулінів сироватки. До імуноглобулінів класу M відносяться такі види антитіл, як опсоніни, холодові аглютиніни, антистрептококові та антипеніцилінові, нормальні протибактеріальні, протівірусні і протиеритроцитарні. IgM — сильний активатор комплементарної системи. Вони утворюються першими після дії антигенних подразників, але незабаром замінюються антитілами класу IgG.

Імуноглобуліни класу A – це, так звані, секреторні антитіла. Вони містяться переважно в різних секретах: молозиві, молоці, слині, бронхіальному секреті, кишечнику. Основна маса їх синтезується клітинами слизових оболонок ротової

порожнини, дихальних і кишечникових шляхів, забезпечуючи, таким чином, місцевий імунітет.

### **Визначення концентрації сироваткових імуноглобулінів методом радіальної імунодифузії в гелі за Манчіні**

*Принцип методу* базується на взаємодії антигену, радіально дифундуючого із лунки в агаровий гель із гомологічними антитілами, які містяться в ньому, що приводить до утворення в місцях зустрічі реагентів специфічного преципітату у виді кільця. При цьому діаметр кільця преципітації, яке утворилось при внесенні досліджуваної сироватки в лунки, які вирізані в шарі агару, в який попередньо диспергована моноспецифічна сироватка, прямо пропорційний концентрації досліджуваного імуноглобуліну. Вміст імуноглобулінів визначають відносно стандартної сироватки крові тварин із відомою концентрацією імуноглобулінів.

*Реактиви.* 2,5 % агаровий гель, мединал-вероналовий буфер (рН 8,6), фізіологічний розчин, фарба амідно-чорний, гліцерин, моноспецифічні сироватки проти IgG, IgM, IgA.

*Обладнання.* Центрифуга на 1000 і 3000 об/хв, пробійник, пробірки, піпетки, скляні пластини (9x12 см), П-подібні рамки з пластика товщиною 1 мм, лінійка Behringwerke або штанген-циркуль.

*Хід визначення.* На скляні пластини поміщають П-подібну рамку, зверху поміщають другу скляну пластину змочену гідрофобною рідиною (гліцерином). Простір між пластинами заливають сумішшю агару і антисироватки (9 мл) приготованої наступним чином: 2,5 % агаровий гель змішують у співвідношенні 1:1 з антисироваткою, розведеною мединал-вероналовим буфером рН 8,6 відповідно до титру при температурі 56 °С. В якості антисироваток використовують моноспецифічні сироватки проти IgG, IgM, IgA. Після застигання агару з антисироваткою (20–30 хв) зсовують верхнє скло і знімають рамку — на нижньому склі залишається рівний шар агару товщиною 1 мм.

У шарі агар+моноспецифічна сироватка пробійником роблять лунки діаметром 2 мм на відстані 15 мм одна від одної, підкладаючи під скло спеціальний трафарет. У перші 5 лунок вносять за допомогою мікрошприца по 2 мкл стандартної сироватки нерозведеної і в розведенні 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 (для побудови калібрувальної кривої), в інші — досліджувані проби в кількості 2 мкл. Оскільки проводиться визначення трьох класів імуноглобулінів, то відповідно здійснюється заливка агару з кожною моноспецифічною сироваткою на трьох пластинах одночасно. Пластини інкубують у вологій камері при кімнатній температурі для IgG, IgA – 24 год, IgM – 48 год. Після інкубації пластини промивають фізіологічним розчином для припинення дифузії, висушують і

фарбують амідочорним. Після фарбування скло споліскують і підсушують на повітрі.

Аналіз результатів досліджень. Вимірюють діаметр кілець преципітації.

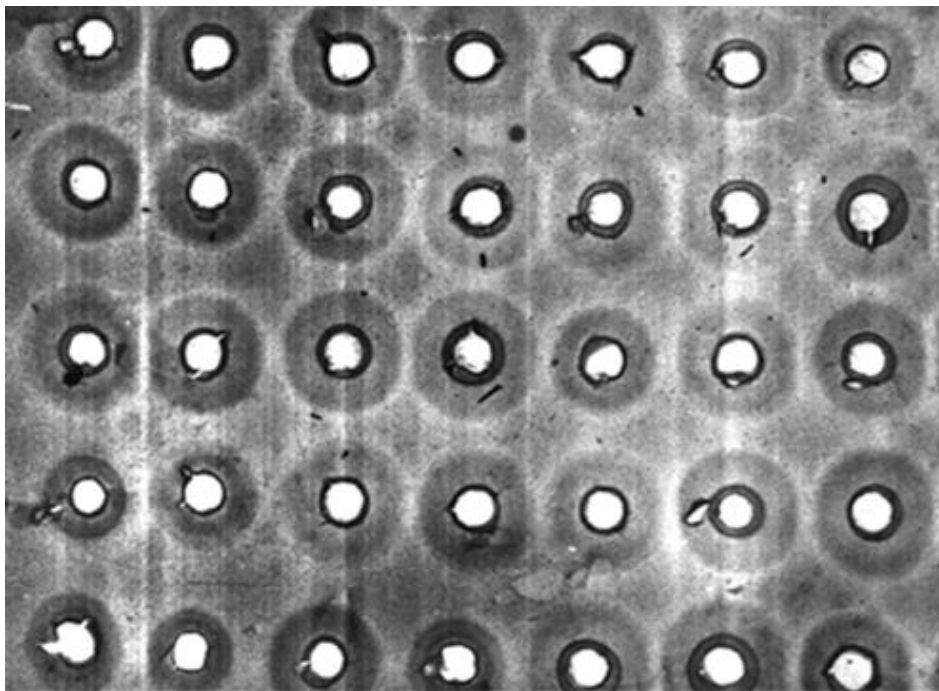


Рис.1. Кільця преципітації при дифузії в агар

Рівень імуноглобулінів визначають за калібрувальною кривою, яка виражає залежність між рівнем імуноглобулінів і діаметром кілець преципітації (табл.1). По перших 5 пробах будують калібрувальний графік на міліметровому папері, де по осі ординат відкладають логарифм концентрації мг/мл (МО), по осі абсцис — діаметр кілець кожного розведення стандартної сироватки. Графіки будують для кожного імуноглобуліну окремо. У тих випадках, коли діаметр кільця досліджуваних сироваток перевищує діаметр кільця нерозведеної стандартної сироватки, досліджувані зразки потрібно розводити. Діаметр кільця преципітації досліджуваної сироватки відкладають на осі абсцис калібрувального графіка і проводять перпендикуляр до калібрувальної кривої і цю точку проєктують на вісь ординат. Отримане значення відповідає рівню імуноглобулінів вираженому в мг/мл (МО).

Таблиця 1 – Калібрувальна таблиця для колориметричного визначення рівня імуноглобулінів в сироватці крові тварин

Оптична щільність	Кількість імуноглобулінів, мг/%	Оптична щільність	Кількість імуноглобулінів, мг/%	Оптична щільність	Кількість імуноглобулінів, мг/%
0,020	19	0,200	226	0,500	510
0,040	38	0,220	249	0,600	670
0,060	65	0,240	273	0,650	722
0,080	16	0,260	292	0,700	785
0,100	119	0,280	309	0,750	834
0,120	136	0,300	334	0,800	905
0,140	162	0,350	390	1,000	1135
0,160	184	0,400	455	1,200	1350
0,180	200	0,450	500	1,500	1700

*Інтерпретація.* Рівень сироваткових імуноглобулінів відображає функціональний стан В-системи імунітету, яка спонтанно стимулюється мікроорганізмами зовнішнього середовища, харчовими, лікарськими та іншими антигенами.

У нормі рівень імуноглобулінів (табл. 2) у тварин залежить від віку, статі, фізіологічного стану, умов зовнішнього середовища та ін. Тому параметри нормальних значень у тої чи іншої особини повинні визначатись у сироватці крові з врахуванням цих факторів.

Таблиця 2 – Концентрація імуноглобулінів у сироватці крові і молозиві свиней, мг/мл

Вік свиней	Концентрація імуноглобулінів		
	IgG	IgA	IgM
<i>у сироватці крові</i>			
Дорослі свині	17,85	0,97	2,33
<i>у молозиві</i>			
Дорослі свині	94,5	8,65	11,6
<i>у сироватці крові поросят</i>			
новонароджені	—	—	—
24 год після прийому молозива	29,8	5,54	2,5
5-денні	16,5	0,8	0,9
5–6-місячні	18,38	1,0	2,07

## **Визначення імуноглобулінів методом дискретного осадження**

Цей метод описаний М. Костиною (1983) і може бути використаний в будь-якій науково-практичній лабораторії біологічного профілю.

### **Визначення імуноглобулінів класу М**

У мірній колбі на 1 л розчиняють 0,28 г вероналу, 0,21 г медуналу та 0,024 г сірчаноокислого цинку в бідистильованій воді. Перед остаточним доведенням розчину до мітки, перевіряють рН, яке повинно бути 7,5. Розчин зберігають без доступу вуглекислоти.

*Хід визначення.* До 6 мл цинкового розчину додають 0,1 мл досліджуваної сироватки та нефелометрують. За величиною оптичної щільності визначають кількість імуноглобулінів класу М (макроглобулінів).

### **Визначення імуноглобулінів класу А**

Для цього готують реактив такого складу: у мірній колбі на 1 л розчиняють 189,0 г сірчаноокислого амонію та 29,3 г натрію хлориду. Реакція нейтральна, реактив зберігають в закритому посуді тривалий час.

*Хід визначення.* До 6 мл реактиву додають 0,1 мл досліджуваної сироватки крові та нефелометрують. За величиною оптичної щільності та за допомогою калібрувального графіка знаходять кількість імуноглобулінів класу А. Для побудови графіка використовують еталонну сироватку крові людини та тварин, із відомою концентрацією імуноглобуліну.

Наприклад: в одній ампулі (1 мл) еталонної сироватки міститься імуноглобулінів класу G - 11,94 мг/мл або 1194 мг/‰; М - 1,33 мг/мл або 133 мг/‰; А - 1,88 мг/мл або 188 мг/‰.

Беруть одну стандартну ампулу сироватки і розчиняють її в 1 мл дистильованої води. Відтак ставлять 9 пробірок, в які попередньо було налито по 1 мл фізіологічного розчину. Надалі проводять розведення: в першу пробірку доливають 1 мл розчину, ретельно перемішують, потім 1 мл цього розчину переносять у другу пробірку, перемішують, відтак 1 мл в третю і т.д. В дев'ятій пробірці після перемішування одержують 2 мл. Таким чином досягають потрібної кількості розведення стандартного розчину із заздалегідь відомим вмістом захисного білка. Оптичну щільність розчину вимірюють на ФЕКу при довжині хвилі  $400 \pm 5$  нм із використанням кювет на 10 мм. Контролем служить пробірка з цими ж розчинами, лише без сироватки.

### **Визначення імуноглобулінів класу G**

Визначення імуноглобулінів класу G проводять у двох пробірках. Для першої пробірки готують цинк-саліциловий реактив великої іонної сили, в 1 мл котрого міститься 1,875 г сульфату цинку та 57,14 г натрію саліцилату. Величина

pH такого розчину повинна бути 7,3. В реакції першої пробірки використовують сироватку, із якої вилучені бета-ліпопротеїди, оскільки вони також здатні осаджуватись в цинк-саліциловому розчині та підвищують показники. Для їх видалення потрібно налити в пробірку 2 мл 0,025М-го кальцію хлориду, додати до нього 0,2 мл досліджуваної сироватки та 0,04 мл 1%-го розчину гепарину. Суміш перемішують, при цьому розчин мутніє від осадження бета-ліпопротеїдів. Цю суміш кладуть на 30 хв. холодильника для посилення реакції флокуляції, а відтак осад відокремлюють центрифугуванням при 4000 об/хв. – 20 хв.

Одержаний супернатант в кількості 1,1 мл використовують для реакції, що відповідає 0,1 мл нативної сироватки крові. До 5 мл цинк-саліцилового реактиву додають 1,1 мл супернатанту, при цьому IgG інтенсивно випадає в осад. Відтак суміш нефелометрують і за оптичною щільністю визначають кількість імуноглобулінів класу G.

*Інтерпретація.* Імуноглобуліни — специфічні білки, які володіють фізико-хімічними властивостями білкових молекул і формують специфічний гуморальний імунітет у тварин.

Використання нефелометричного аналізу для визначення вмісту імуноглобулінів у біологічних рідинах є простим і доступним методом оцінки імунобіологічної реактивності організму тварин. У сироватці крові новонароджених телят, до випоювання молозива, міститься до 2 г/л імуноглобулінів, у дводенних телят має бути не менше 18 г/л. Оптимальною величиною у телят є 20–28 г/л імуноглобулінів сироватки крові (Левченко В. І. зі співавт., 2010).

### **Контрольні запитання**

1. Дайте визначення імуноглобулінам.
2. Яка будова імуноглобулінів?
3. Які функції виконують імуноглобуліни в організмі?
4. Принцип постановки реакції за Манчині.
5. Принцип постановки реакції осадження імуноглобулінів.

## ТЕМА 4. ВИВЧЕННЯ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН ЯКІ ЗНАХОДЯТЬСЯ У РІЗНОМАНІТНИХ ТКАНИНАХ

*Мета:* Ознайомитися та засвоїти гістологічні та імунологічні методи дослідження імунокомпетентних клітин.

Всі клітини імунної системи утворюються зі стовбурової кровотворної клітини, яка локалізується в кістковому мозку. В подальшому їх розвиток може проходити або на шляху лімфопоезу, або мієлопоезу.

По першому шляху розвиваються лімфоцити. Всі інші лейкоцити розвиваються по шляху мієлопоезу. Всі відомі клітини імунітету можна об'єднати в декілька великих груп, в залежності від виконуваних ними функцій.

Пропонують виділяти:

- 1) Фагоцити (макрофаги та нейтрофіли), здійснюють як правило функції фагоцитозу;
- 2) Гранулоцити (еозинофіли, тучні клітини, базофіли і тромбоцити), виконують функції позаклітинного цитолізу мішеней;
- 3) Антигенпрезентуючі клітини (різноманітні популяції дендритних клітин), які представляють антиген для лімфоцитів;
- 4) Ендотеліальні та інші клітини, що формують мікрооточення клітин імунітету;
- 5) Лімфоцити – які реалізують основні функції специфічної імунної відповіді.

Ці клітини мають на своїй поверхні спеціальні молекули, які допомагають здійснювати взаємодію між собою та виконувати притаманні їм функції

**Фагоцитуючі клітини.** Не дивлячись на те, що фагоцитуючими властивостями можуть володіти майже всі клітини організму, в даному випадку мова йде тільки про «професійні» фагоцити. До цієї групи можна включити тільки два різновиди клітин:

- моноцити і локалізовані в органах макрофаги, які всі разом об'єднують в систему мононуклеарних фагоцитів;
- нейтрофіли (мікрофаги) – одна із самих багато численних популяцій клітин білої крові.

Ці клітини знаходяться в першому ряді розвитку захисних реакцій. Зазвичай вони першими контактують з мікроорганізмами та паразитами, які потрапляють в організм, і, як правило, забезпечують їх загибель. Коли самотійно не можуть їх знешкодити, вони ініціюють цілий каскад реакцій, які запускають механізм специфічної імунної відповіді, при якій їх киллерна властивість по відношенню до збудника зростає багаторазово.

Моноцити продукуються в дорослому організмі від стовбурових кровотворних клітин, а в ембріоні – із жовчного міхура та печінки. Дозріваючи в кістковому мозку до стадії моноцита, ці клітини надходять в кров, де циркулюють на протязі 2-5 днів. Після чого вони мігрують в різноманітні органи



із моноцитів перетворюються на макрофаги. Тривалість їхнього життя коливається від 20 діб до 6-7 місяців, в залежності від субпопуляції і локалізації в органі. Моноцити та локалізовані в органах макрофаги об'єднують в систему моноклеарних фагоцитів. Моноцити представляють собою крупні клітини округлої форми, з характерним підковоподібним ядром. Тканинні макрофаги, як правило, крупніші моноцитів та мають неправильну форму. Електронно-мікроскопічним аналізом ультраструктури моноцитів показано, що їх мембрана має виражену складчастість. Комплекс Гольджі добре розвинутий. В цитоплазмі є велика кількість грануллізосом,, які містять різноманітні ферменти.

Локалізація моноклеарних фагоцитів надзвичайно різноманітна. Як правило, вони вистилають та контролюють ті місця, які найбільш сприятливі для проникнення інфекції в організм. В залежності від локалізації виділяють наступні групи:

- клітини Купфера (зіркоподібні ретикулоендотеліоцити печінки);
- альвеолярні макрофаги (розміщені в порожнині між кровоносними судинами альвеол та повітряним шаром в легенях);
- перитонеальні макрофаги (локалізовані на серозних оболонках черевної порожнини);
- макрофаги лімфоїдних тканин;
- макрофаги нирок;
- мікроглія мозку.

Функціональна роль системи моноклеарних фагоцитів також різноманітна. Але основними функціями є:

- кіллерна функція – здійснюється за рахунок позаклітинного цитолізу та фагоцитозу.

#### ***Матеріали та обладнання:***

- гістопрепарати різноманітних органів тварин та людини, які містять лімфоїдні клітини (Тимур, бурса Фабриціуса, селезінка, лімфовузол, мазки крові здорових та хворих на лейкоз тварин) ;
- предметні стекла;
- піпетки Пастера;
- мікроскопи;
- завись бактеріальних клітин стафілокока;
- термостат

#### **Виділення лімфоцитів із гепаринізованої крові**

Проводять методом фракціонування. 2-4 мл гепаринізованої крові розводять у 2 рази розчином Хенкса, забуференим трис-буфером до рН 7,3 і ретельно перемішують.

На 1,5 мл розчину обережно нашаровують 4 мл розведеної крові і центрифугують (400об, 30 хв). Потім стерильною піпеткою видаляють плазму, відбирають прошарок мононуклеарів і ресуспендують їх у 1 мл розчину Хенкса. Отриману суспензію двічі відмивають послідовним центрифугуванням у розчині Хенкса при 400 об по 10 хв. Ресуспендують у 1 мл середовища і у камері Горяєва підраховують кількість лімфоцитів, одночасно визначаючи вміст живих клітин при зафарбуванні три пановим синім. Робочу суспензію лімфоцитів для визначення Т- і В-клітин готують із розрахунку не менше  $1 \times 10^6$  кл/мл.

### **Виділення лімфоцитів із лімфоїдних органів**

У свиней, великої рогатої худоби, лабораторних тварин після забою відбирають лімфовузли і селезінку у стерильні флакони з живильним середовищем 199 з додаванням 100ОД/мл пеніциліну та 100мкг/мл стрептоміцину. Флакони ставлять на лід і транспортують для подальшої обробки. Максимальний термін зберігання крові і лімфоїдних органів до початку досліджень не повинен перевищувати 18-20 год при 40С.

Лімфатичні вузли звільняють від капсули та жиру, подрібнюють ножицями, охолоджують стакан з тканинним матеріалом за допомогою льоду і протирають через стерильну капронову сітку за допомогою пластикового шпателя. Отриману суспензію розводять розчином Хенкса у співвідношенні 1:10.

Селезінку звільняють від капсули, подрібнюють та гомогенізують так як і лімфатичні вузли. Отриману суспензію також розводять розчином Хенкса у співвідношенні 1:10.

Виділення лімфоцитів з клітинної суспензії лімфовузлів та селезінки здійснюють шляхом центрифугування на роздільному середовищі Фікол-Пак. Клітинну суспензію обережно нашаровують на роздільний розчин не допускаючи змішування. Співвідношення між розчином Фікол-Пак та клітинною суспензією має складати 1:4.

### **Визначення кількості виділених лімфоцитів та відсотка живих клітин**

До 0,1 мл суспензії лімфоцитів додають 0,9 мг свіже приготованої суміші 0,2% розчину три панового синього і 1,7% розчину натрію хлориду 1:1. Лімфоцити в розчині фарби витримують 1-3 хв при кімнатній температурі, а потім поміщають у камеру Горяєва, де підраховують кількість забарвлених (мертвих) та незабарвлених (живих) клітин. Підраховуючи кількість клітин у 100 великих квадратах, одночасно визначають концентрацію лімфоцитів у суспензії за формулою

$$A = N \times 25 \times 100$$

Клітини молозива осаджають центрифугуванням 20 хвилин при 400 обертах. Після центрифугування обережно знімають верхній жировий шар, відбирають над осадову рідину. Необхідно провести декілька циклів центрифугування для збільшення виходу клітин молозива. Осаджені клітини ресуспендують у розчині Хенкса з антибіотиками та здійснюють виділення лімфоїдних клітин на середовищі Філол -Пак. Отриману суспензію клітин двічі відмивають центрифугуванням протягом 10 хвилин при 400 обертах.

Вміст лімфоцитів підраховують у мазках (при дотриманні даної методики процентний вміст лімфоцитів становить 90 – 95%).

### **Контрольні запитання.**

1. Види імунітету.
2. Характеристика набутого імунітету.
3. Розповсюдження і роль лімфоїдних клітин в організмі тварин та людини.
4. Клітини пам'яті.
5. Відмінності центральної та периферичної імунної системи ссавців та птахів.

## Список використаних джерел

1. Ветеринарна імунологія [Навчальний підручник] / А.Й. Мазуркевич, Ю.О. Харкевич, В.Б. Данілов, М.О. Малюк, В.В. Ковпак. К.: "НУБіП України". 2018. 334 с.
2. Імунологія: Підручник / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В.Колибо та ін.; за заг. ред. Є.У. Пастер. - К.: Вища шк. 2005. 599 с.
3. Вершигора А.Ю., Пастер Э.У., Колибо Д.В., Віхоть М.Є., Моложава О.С., Михальський Л.О., Позур В.К., Сківка Л.М., Холодна Л.С., Швець Ю.В. Імунологія. ВПЦ «Київський університет», 2011.
4. Іонов І.А. Сучасна імунологія (курс лекцій) / І.А. Іонов, Т.Є. Комісова, О.М. Сукач, О.О. Катеринич О Х.: ЧП Петров В.В., 2017. О 107 с.
5. Імунологія: підручник / Л.В.Кузнецова, В.Д.Бабаджан, Н.В.Харченко та ін.; за ред. Л.В.Кузнецова, В.Д.Бабаджан, Н.В.Харченко. Вінниця: ТОВ «Меркьюрі Поділля». 2013. 565 с.
6. *Влізло В. В.* Лабораторна діагностика у ветеринарній медицині : довідник / В. В. Влізло, І. А. Максимович, В. Л. Галяс, М. І. Леньо. Львів, 2008. 242 с.
7. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині/ В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін. ; За ред. В. В. Влізла. Львів: 2012. 759 с.

