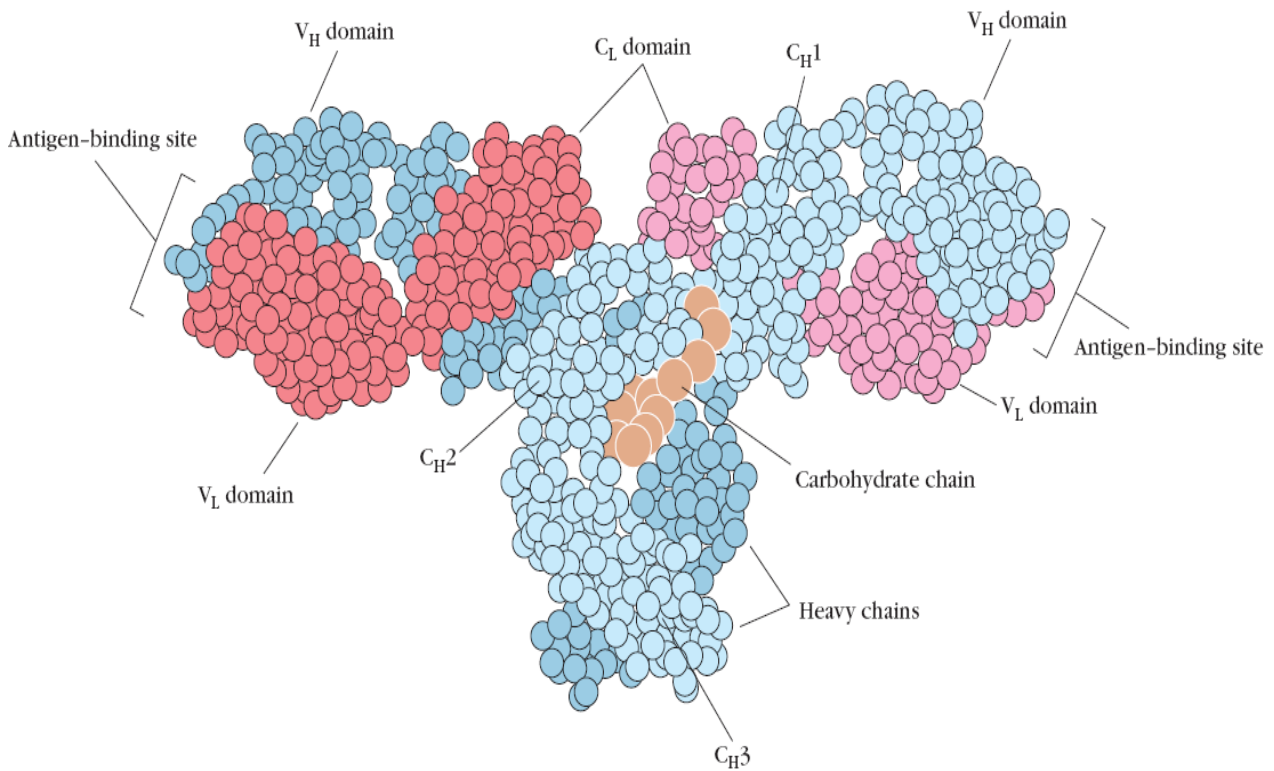


# ІМУНОЛОГІЯ

## *Методичні рекомендації до практичних робіт*



Волинський національний університет  
імені Лесі Українки  
Кафедра фізіології людини і тварин

**Укладач: Т. Ф. Поручинська**

**Імунологія**

**Методичні рекомендації до практичних робіт**

**Луцьк – 2021**

УДК 612.017 (075.8)

П 60

Рекомендований до друку методичною радою  
Волинського національного університету імені Лесі Українки  
(протокол №\_\_ від \_\_\_\_\_ 2021 року)

Рецензенти:

Міщенко І. В., к. б. н., проректор з навчально-наукової роботи КЗВО «Волинський медичний інститут»;

Степанюк Я. В., доц., к. б. н., завідувач кафедри гістології та медичної біології навчально-наукового медичного інституту ВНУ імені Лесі Українки.

П 60 **Імунологія**: методичні рекомендації до практичних робіт / укладач: Поручинська Т. Ф. – Луцьк, 2021. – 103 с.

Методичні рекомендації містять матеріали, що допоможуть студентам здобути практичний досвід та навички з курсу «Імунологія». Посібник може бути корисним студентам-біологам, освітянам та всім, хто цікавиться імунологією.

УДК 612.017 (075.8)

© Поручинська Т. Ф., 2021

© Волинський національний

університет імені Лесі Українки, 2021

## ЗМІСТ

Вступ .....	5
Практична робота 1. Центральні (первинні) органи імунної системи .....	6
Практична робота 2. Периферичні (вторинні) органи імунної системи .....	16
Практична робота 3. Групові антигени еритроцитів людини. Визначення групи крові (системи АВ0) за допомогою моноклональних антитіл та стандартних сироваток .....	23
Практична робота 4. Визначення групи крові за допомогою перехресного методу.....	31
Практична робота 5. Визначення Резус-належності крові .....	33
Практична робота 6. Механізми розвитку, діагностика та профілактика ізонесумісності матері й плоду .....	45
Практична робота 7. Методи імунологічних досліджень. Імуноферментний аналіз .....	56
Практична робота 8. Реакція аглютинації .....	66
Практична робота 9. Реакція преципітації .....	71
Практична робота 10. Визначення окремих субпопуляцій лімфоцитів .....	75
Практична робота 11. Визначення основних класів імуноглобулінів .....	83
Практична робота 12. Вакцинація. Організація підтримки імунопрофілактики в суспільстві (підготовка позаурочних заходів для педагогів, школярів та їх батьків).....	85
Практична робота 13. Механізми анафілаксії. Екстрена допомога при анафілаксії .....	96
Перелік використаних джерел .....	101



## Вступ

Сьогодні не викликає сумнівів актуальність вивчення проблем імунології. А клінічна імунологія розглядається як самостійна медична дисципліна. Досягнення імунології відкрили людству широкі перспективи в боротьбі з інфекційними, онкологічними, алергічними та аутоімунними захворюваннями, імунодефіцитними станами, у поліпшенні наслідків пересадки органів, лікування безпліддя та ін.

Завдання імунології полягає у вивченні загальних закономірностей діяльності імунної системи в нормі та при патології; визначенні ролі імунної системи у виникненні й протіканні конкретних захворювань; розробці та використанні методів імунодіагностики, імунотерапії, імунокорекції та імунопрофілактики.

Імунологічні методи широко застосовуються у діагностиці, лікуванні та профілактиці інфекційних та неінфекційних захворювань.

Залежно від об'єкта дослідження виділяють загальну, медичну, ветеринарну, інфекційну, клінічну, екологічну імунологію, імуногенетику, алергологію, імунопатологію, імуногематологію, імунологію репродукції або імунологію ембріогенезу; залежно від методу – імунодіагностику, імунотерапію, імунопрофілактику, імуноморфологію, імунохімію.

## Практична робота 1

### Тема: ЦЕНТРАЛЬНІ (ПЕРВИННІ) ОРГАНИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

**Мета:** Дослідити структуру центральних органів імунної системи (кісткового мозку та тимусу).

**Обладнання і матеріали:** світловий мікроскоп, фіксовані мікропрепарати, гістологічний атлас.

#### Теоретичні відомості

До центральних імунних органів належать червоний кістковий мозок і тимус.

Червоний кістковий мозок — головний орган кровотворення. У новонароджених він заповнює всі кістковомозкові порожнини, а з 4–5 років заміщається жировою тканиною та перетворюється на жовтий кістковий мозок. У дорослої людини червоний кістковий мозок зберігається лише в епіфізах довгих трубчастих кісток, у губчастих кістках і в губчастій речовині плоских кісток.

Червоний кістковий мозок має вигляд ніжної червоної маси і складається з мієлоїдної тканини, що містить ретикулярні волокна і стовбурові кровотворні клітини, які є родоначальниками всіх формених елементів крові. Ретикулярна тканина пронизана великою кількістю кровоносних судин, переважно капілярів, розширених у вигляді синусоїдів.

Процес гемопоезу (кровотворення) полягає в диференціюванні стовбурових клітин кісткового мозку за кількома напрямками: еритропоез — утворення еритроцитів; тромбоцитопоез — тромбоцитів; гранулоцитопоез — гранулярних лейкоцитів; лімфоцитопоез — клітин імунної системи — лімфоцитів, які потім потрапляють у тимус, селезінку і лімфатичні вузли, де проходять подальшу диференціацію на Т- і В-лімфоцити.

Жовтий кістковий мозок міститься в діяфізах трубчастих кісток і представлений переродженою ретикулярною тканиною, клітини якої містять ліпідні включення. На відміну від червоного кісткового мозку, не здійснює кровотворної функції, але при крововтратах і токсичних отруєннях у ньому з'являються стовбурові клітини з периферичної крові. На їх основі виникають вогнища гемопоезу. Отже, жовтий кістковий мозок — важливий резерв для червоного кісткового мозку. При крововтратах у нього заселяються

гемопоетичні елементи, і він перетворюється на червоний кістковий мозок. Таким чином, жовтий і червоний кістковий мозок можна розглядати як два функціональних стани одного кровотворного органу.

Унікальною особливістю мікрооточення кісткового мозку є присутність там поліпотентних стовбурових клітин. Вихідною клітиною для всіх паростків кровотворення є стовбура кровотворна клітина.

У розвитку клітин крові умовно виділяють класи клітин.

I – клас поліпотентних клітин-попередниць, включає стовбурові кровотворні клітини.

II – клас частково детермінованих поліпотентних клітин-попередниць.

III – клас уніпотентних клітин-попередниць, здатних до обмеженої самопідтримки (можуть існувати протягом 10–15 мітозів, потім гинуть).

IV – клас морфологічно проліферуючих клітин, які морфологічно відрізняються від попереднього класу, представлений бластними формами, що дають початок окремим рядам кровотворення – гранулоцитам, еритроцитам, моноцитам, мегакаріоцитам і лімфоцитам. Форма ядра бластних клітин, як правило, округла, рідше овальна або овально-витягнута. Ядро розташоване в центрі клітини або зміщене до одного з полюсів. Характерною особливістю клітин це переважання площі ядра над площею цитоплазми;

V – клас дозріваючих клітин;

VI – клас зрілих клітин з обмеженим життєвим циклом.

Стромою кісткового мозку є ретикулярна сполучна тканина, що утворює мікрооточення для кровотворних клітин. В даний час до елементів мікрооточення відносять також остеогенні, жирові, адвентиційні, ендотеліальні клітини і макрофаги.

Ретикулярні клітини завдяки своїм відросткам виконують механічну функцію, секретують компоненти основної речовини – преколаген, глікозаміноглікани, проеластин, мікрофібрилярний білок і беруть участь у створенні кровотворного мікрооточення, специфічного для певних напрямків розвитку гемопоетичних клітин, виділяючи ростові фактори.

Остеогенні клітини також здатні виробляти ростові фактори, ініціювати родоначальні гемопоетичні клітини в місцях свого розташування до



проліферації і диференціювання. Найбільш інтенсивно кровотворення відбувається поблизу ендоста, де концентрація стовбурових клітин приблизно втричі вища, ніж у центрі кістковомозкової порожнини. Адипоцити є постійними елементами кісткового мозку.

Адвентиційні клітини супроводжують кровоносні судини і покривають більше 50% зовнішньої поверхні синусоїдних капілярів. Під впливом гемопоетинів (еритропоетин) та інших факторів вони здатні скорочуватися, що сприяє міграції клітин в кровотік.

Ендотеліальні клітини судин кісткового мозку беруть участь в організації стромі і процесів кровотворення, синтезують колаген IV типу, гемопоетини.

Макрофаги в кістковому мозку представлені неоднорідними за структурою і функціональними властивостями клітинами, але завжди багатими на лізосоми і фагосоми. Деякі з популяцій макрофагів секретують ряд біологічно активних речовин (еритропоетин, колонієстимулюючий фактор, інтерлейкіни, простагландини, інтерферон та ін.). Макрофаги за допомогою своїх відростків, що проникають через стінки синусів, вловлюють з кровотоку залізовмісні з'єднання (трансферин) і далі передають його еритробластним клітинам, що розвиваються для побудови гемінової частини гемоглобіну.

Основні властивості та характеристики стовбурової кровотворної клітини:

1. Поліпотентність – здатність диференціюватися в різних напрямках і утворювати всі типи клітин крові і лімфи.

2. Самопідтримка – здатність зберігати в процесі ділення пул стовбурової кровотворної клітини.

3. Рециркуляція – здатність стовбурової кровотворної клітини виходить в кровоплин, потім після циркуляції в крові повертатися у різні кровотворні органи.

4. Стовбурові кровотворні клітини знаходяться поза мітотичним циклом, вкрай рідко діляться, не відповідають на чинники диференціювання, тому кровотворення підтримується за рахунок їх нащадків.

5. Низька концентрація стовбурових кровотворних клітин в кровотворних органах (1:10<sup>3</sup>) і крові (1:10<sup>4</sup>).

У загально-біологічному сенсі стовбура клітина має здатність до самопідтримання популяції і одночасного диференціювання у бік того чи іншого клону. У червоному кістковому мозку під час поділу материнської стовбурової клітини крові утворюється одна клітина за всіма властивостями тотожна материнській і одна уніпотентна напівстовбура, що дає початок певному виду формених елементів крові.

\*\*\*

Тимус – центральний орган імуногенезу, в якому відбувається розмноження та дозрівання (антигеннезалежна диференціація) Т-лімфоцитів. У тимусі виробляються тимозин, тимулін, тимопоетин та інші регуляторні пептиди, які забезпечують дозрівання та проліферацію Т-лімфоцитів у центральних та периферійних органах імуногенезу, а також низку інших біологічно-активних речовин: інсуліноподібний фактор (знижує рівень цукру в крові), кальцитоніноподібний фактор (знижує рівень кальцію в крові), фактор росту (забезпечує ріст тіла).

Тимус людини складається із двох частин. Основу становить видозмінена епітеліальна тканина, представлена епітеліоретикулоцитами. Від сполучнотканинної капсули всередину відходять перегородки, що розділяють залозу на часточки. У кожній часточці розрізняють коркову і мозкову речовини. Коркова речовина містить велику кількість Т-лімфоцитів. Нові генерації лімфоцитів з'являються в тимусі кожних 6–9 год.

У корковій частині часточки тимуса компактно розміщені малі й середні лімфоцити в оточенні макрофагів та епітеліоретикулоцитів, а також Т-лімфобласти, останні локалізуються переважно в субкапсулярній зоні. Епітеліоретикулоцити, макрофаги та дендритні клітини часто називають клітинами-няньками, оскільки вони створюють мікрооточення і необхідні умови для дозрівання Т-лімфоцитів. У коркову частину тимуса з червоного кісткового мозку переносяться попередники Т-лімфоцитів. Тут відбувається їх проліферація, дозрівання під впливом тимозину, який продукують епітеліоретикулоцити, і вибіркового фагоцитозу частини новоутворених клітин макрофагами.

Тільки 3-5 % клітин виходять з тимусу. Інші гинуть шляхом апоптозу. Селекція лімфоцитів відбувається за участю епітеліоретикулоцитів.

Вживають клітини, які не реагують на власні білки головного комплексу гістосумісності МНС, а клітини, що мають рецептори до власних антигенів організму, гинуть. Відібрані Т-лімфоцити мігрують у мозкову речовину, звідки можуть надходити у периферійний кровотік.

Мозкова речовина тимуса утворена диференційованими Т-лімфоцитами. Тут лімфоцити розміщені менш компактно, порівняно з корковою зоною. Лімфоцити з мозкової частини потрапляють у кровотік по венулах та виносних лімфатичних судинах.

Характерною морфологічною ознакою тимуса є наявність у мозковій речовині особливих концентричних нашарувань епітеліальних клітин (тілець Гассаля).

Лімфоцити коркової частини тимуса відмежовані від просвіту гемокапілярів так званім гематотимусним бар'єром, утвореним суцільним шаром епітеліоретикулоцитів. Цей бар'єр закриває доступ антигенам з судинного русла до лімфоцитів, що дозрівають в корковій речовині, які мають циторецептори до власних антигенів організму, що запобігає розвитку автоімунних реакцій. У мозковій речовині тимуса такий бар'єр відсутній, що створює передумови для рециркуляції Т-лімфоцитів.

Протягом усього життя людини у тимусі відбуваються зміни, які отримали назву вікової інволюції. Остання полягає у поступовому заміщенні паренхіматозних елементів тимуса жировою та пухкою сполучною тканиною, збагаченні тільцями Гассаля при майже незмінній загальній масі органа. У віковій інволюції тимуса розрізняють чотири фази: швидку (до 10-річного віку), повільну (у проміжку з 10 до 25 років), прискорену (від 25 до 40 років) і сповільнену (після 40 років). Швидкість вікової інволюції тимуса значною мірою визначається гормональним статусом організму.

## **Хід роботи**

### **Робота 1. Дослідження структури та функцій кісткового мозку**

**Завдання 1.** Розгляньте мікрофотографії кісткового мозку (рис. 1–3). Розгляньте зразок тканин кісткового мозку під мікроскопом. Складіть схему фрагменту кісткового мозку.

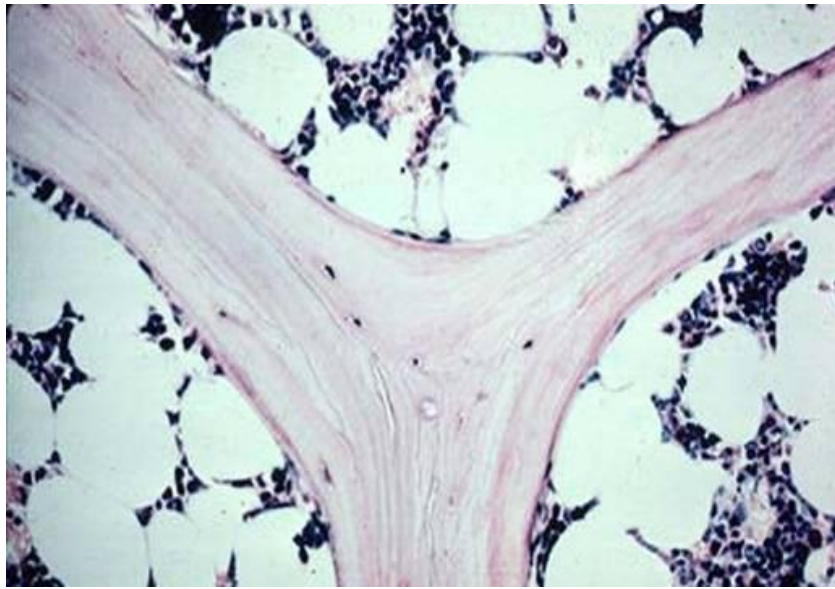


Рис. 1. Світлова мікрофотографія червоного кісткового мозку. В центрі поля зору оксифільна кісткова трабекула, що утворює грубу строму органу. Міжтрабекулярний простір заповнений ретикулярною тканиною (ніжна строма) та мієлоїдною і лімфоїдною тканиною (паренхіма органу). Найінтенсивніше гемопоєз відбувається саме біля ендосту кісткових трабекул, так як остеобласти здатні активувати гемопоєз, виділяючи різні класи гемопоєтинів.

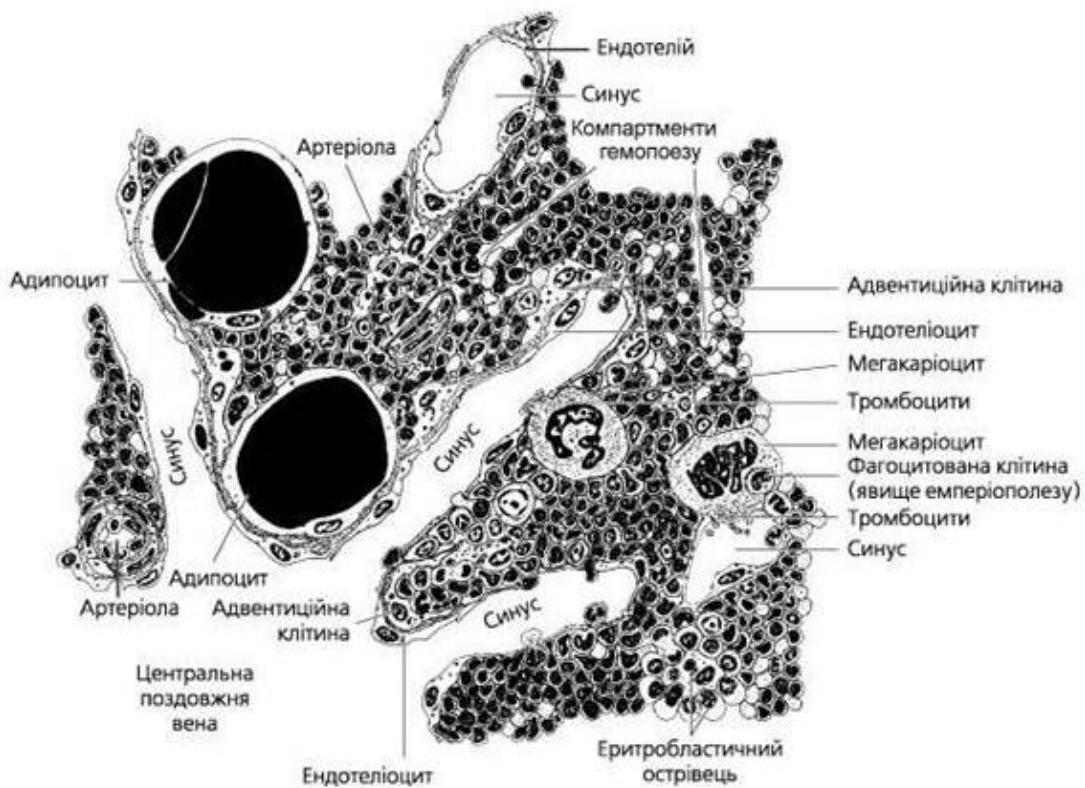


Рис. 2. Схематичне відтворення фрагменту червоного кісткового мозку.

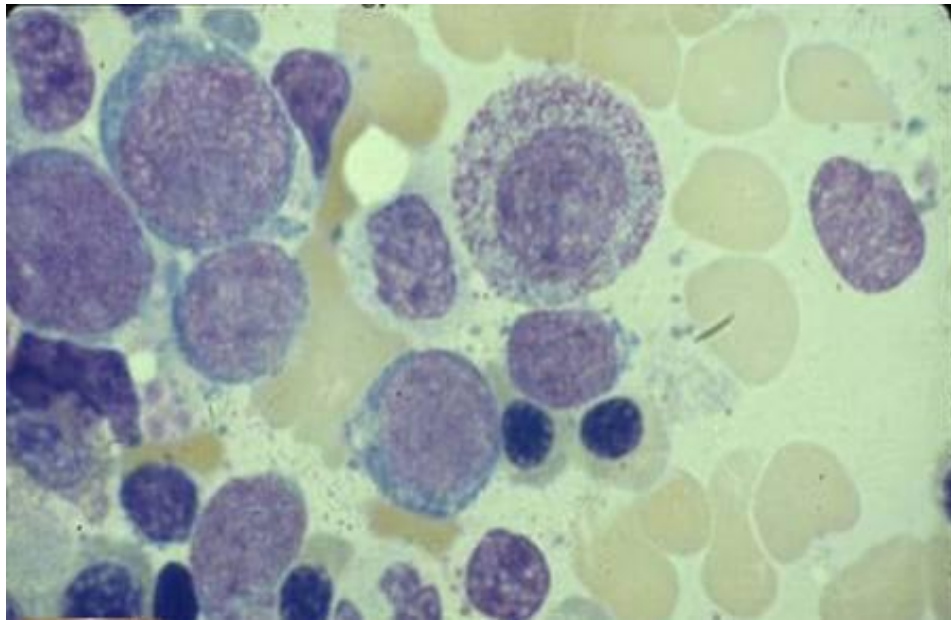


Рис. 3. Світлова мікрофотографія фрагмента червоного кісткового мозку. Забарвлення згідно Романовського-Гімзи. У верхньому лівому кутку – група промієлоцитів. Вгорі в центрі зображення – нейтрофільний мієлоцит. Під ним – група клітин еритробластичного ряду.

**Завдання 2.** Розв'яжіть ситуаційну задачу: на препараті є зріз трубчастої кістки дитини 3–5 років, юнака 12–18 років і літньої людини. Як з віком змінюється стан і топографія червоного кісткового мозку?

## **Робота 2. Дослідження структури та функцій тимусу**

**Завдання 1.** Розгляньте мікрофотографії тимусу (рис. 4–8). Розгляньте зразок тканин тимусу під мікроскопом. Визначте часточки тимусу, сполучнотканинні перегородки, коркову та мозкову зони тимусу.

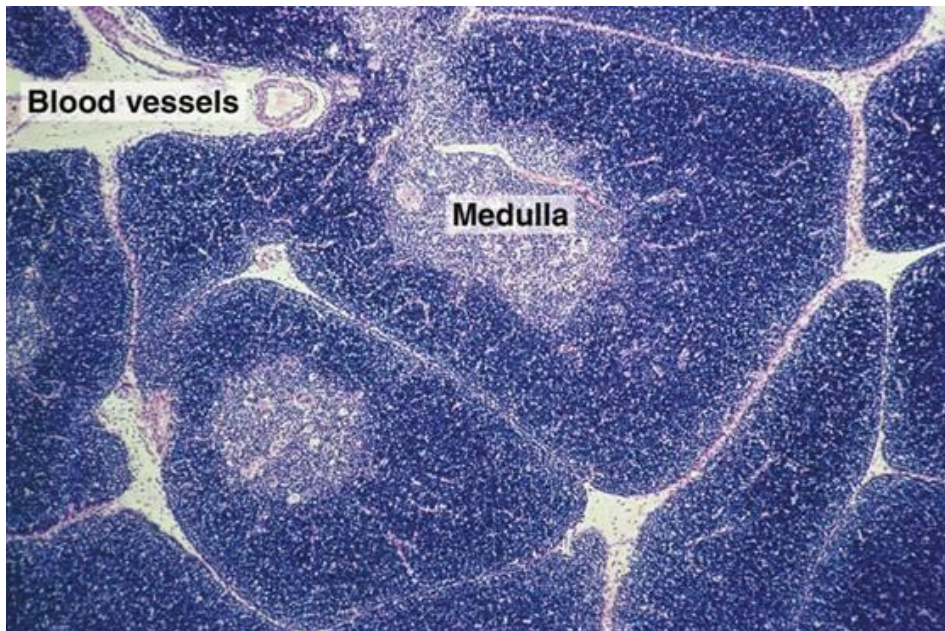


Рис. 4. Мікрофотографія фрагменту тимуса. В кожній часточці видно центральну світлу зону – мозкову речовину і периферійну темну, інтенсивно базофільну – кіркову речовину. Між часточками знаходяться септи – сполучнотканинні перегородки. Збарвлення гематоксиліном-еозином.

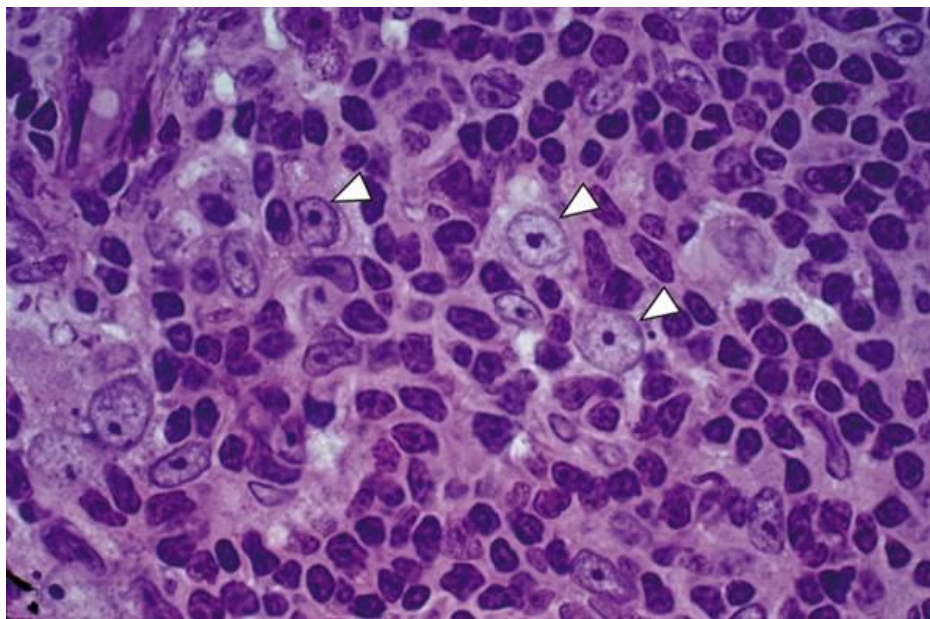


Рис. 5. Мікрофотографія кіркової речовини тимуса. Стрілками показані ядра стромальних клітин – епітеліоретикулоцитів. Збарвлення гематоксиліном-еозином.

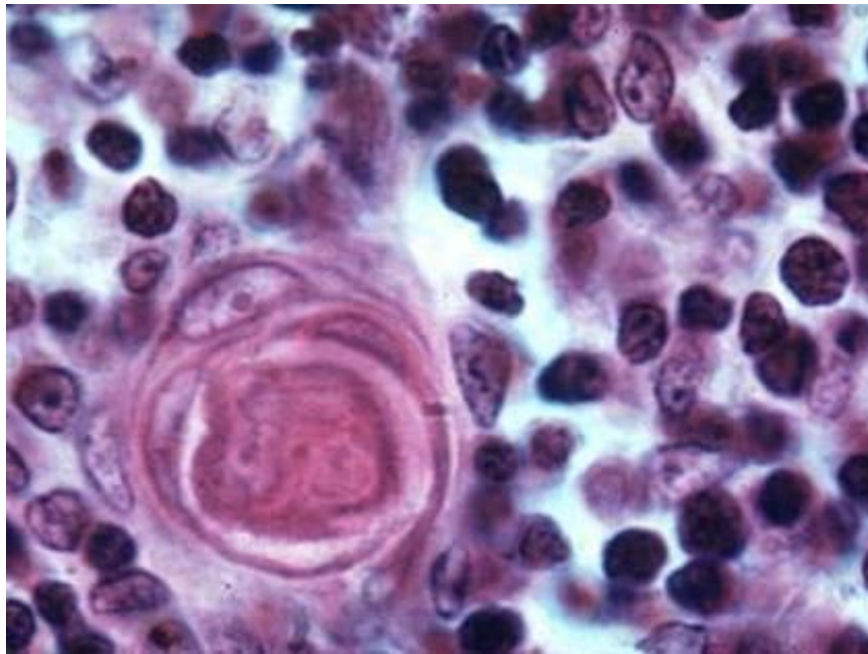


Рис. 6. Світлова мікрофотографія мозкової речовини часточки тимуса із сформованим тільцем Гассаля. В центрі епітеліального тільця видно клітинний детрит, оточений концентрично нашарованими епітеліо-ретикулярними клітинами. Зabarвлення гематоксиліном-еозином.

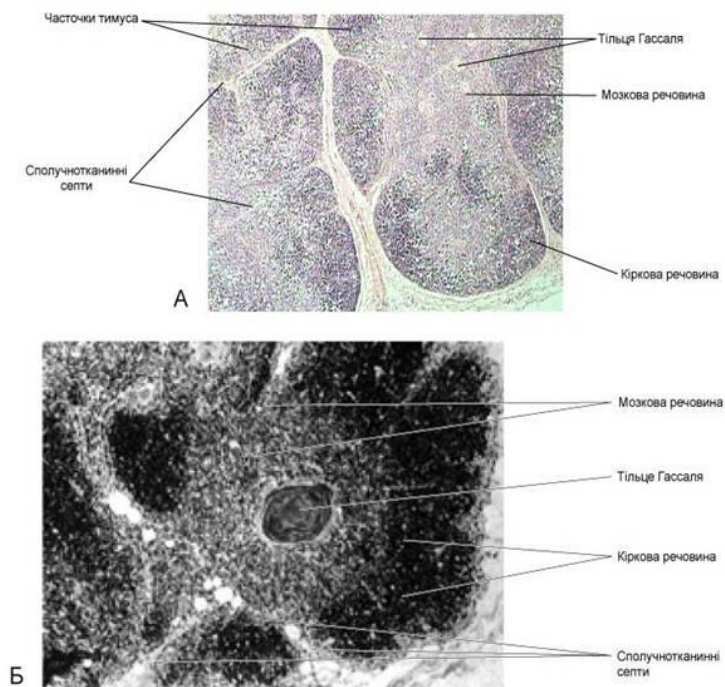


Рис. 7. Світлова мікроскопія тимуса: А – загальний план будови часточок; Б – фрагмент часточки тимуса дитини із сформованим тільцем Гассаля в мозковій речовині.

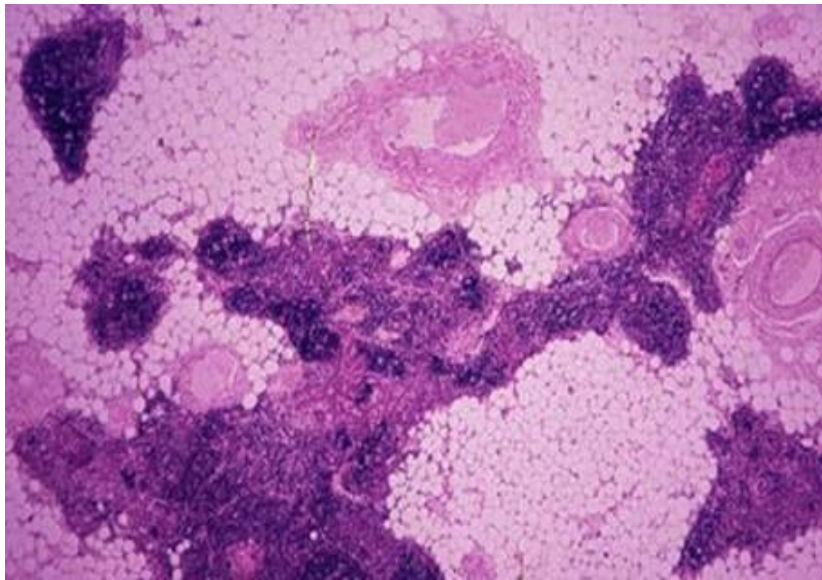


Рис. 8. Світлова мікрофотографія тимуса чоловіка 40 років. Забарвлення гематоксиліном-еозином. Внаслідок вікової інволюції відбулось заміщення паренхіматозних та стромальних елементів органу білою жировою тканиною.

**Завдання 2:** розв'яжіть ситуаційну задачу. У новонародженої дитини видалили тимус. В результаті цієї операції у неї різко знизилась здатність до продукції антитіл. Поясніть причину цього явища.

**Зробіть висновки до виконаної роботи.**



## Практична робота 2

### Тема: ПЕРИФЕРИЧНІ (ВТОРИННІ) ОРГАНИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

**Мета:** ознайомитись зі структурою і функціями периферичних імунних органів.

**Обладнання і матеріали:** світловий мікроскоп, фіксовані мікропрепарати, гістологічний атлас.

#### Теоретичні відомості

Периферичними імунними органами вважають селезінку та лімфатичні вузли. До периферичної частини імунного захисту відносять також лімфоїдну тканину слизових оболонок (MALT) та лімфоїдну систему шкіри (SALT). Лімфоцити розміщуються дифузно у пухкій сполучній тканині або формують лімфатичні вузлики. До лімфоїдної тканини шкіри належать внутрішньоепідермальні лімфоцити та дендритні клітини, що формують імунний захисний бар'єр.

У вторинних лімфоїдних органах відбувається антигензалежна диференціація і проліферація субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів, які формують конкретну імунну відповідь організму.

Селезінка – непарний орган, розміщений у черевній порожнині. У селезінці кровоносна система тісно взаємодіє з лімфоїдною тканиною, завдяки чому кров тут збагачується свіжим запасом лейкоцитів, які розвиваються в селезінці. Кров, що проходить через селезінку, звільняється завдяки фагоцитарній діяльності макрофагів селезінки від віджилих червоних кров'яних тілець («цвинтар» еритроцитів) і від хвороботворних мікробів, які потрапили в кров'яне русло, сторонніх часток і т. ін.

Розміри селезінки можуть досить значно змінюватися в однієї й тієї ж людини, залежно від більшого чи меншого наповнення судин кров'ю. В середньому довжина селезінки дорівнює 12 см, ширина 8 см, товщина 3–4 см, маса близько 170 г (100–200 г). Під час травлення спостерігається збільшення селезінки. Колір селезінки на поверхні темно-червоний з фіолетовим відтінком. За формою селезінку порівнюють з кавовим зерном. На вісцеральній увігнутій поверхні, на ділянці, що прилягає до шлунку, є поздовжня борозна – ворота, через які в селезінку входять судини і нерви.

Позаду від увігнутої ділянки знаходиться поздовжньо розташована плоска ділянка, так як тут селезінка стикається з лівими наднирником і ниркою (рис. 1).

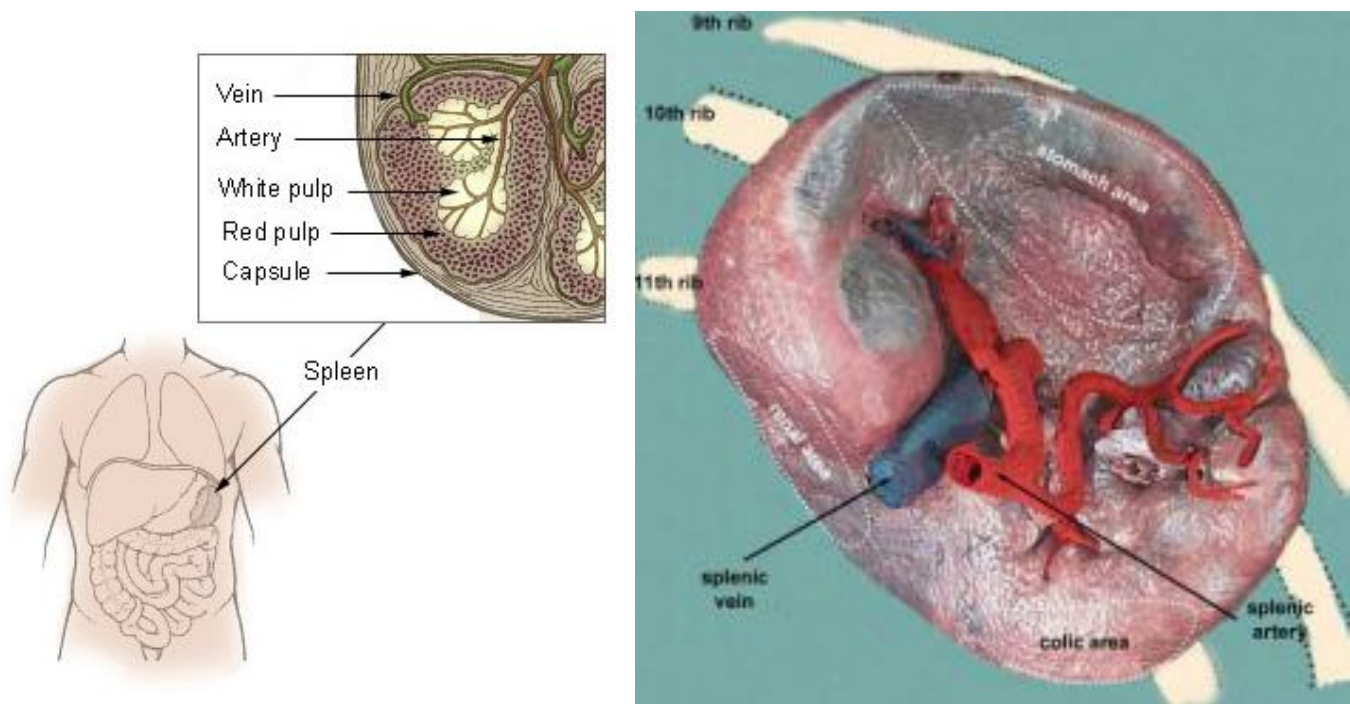


Рис. 1. Топографія селезінки

Селезінка зовні вкрита серозною оболонкою, що складається з одного шару мезотеліальних клітин, під нею розташовується фіброзна оболонка від якої відходять сполучнотканинні перетинки – трабекули. Між трабекулами знаходиться паренхіма – пульпа селезінки.

Пульпа має темно-червоний колір. На свіжозробленому розрізі в пульпі видно більш ясно пофарбовані вузлики. Вони представляють собою лімфоїдні утворення круглої або овальної форми, що сидять на стінках артеріальних гілочок. Розрізняють білу і червону пульпу.

Біла пульпа складається в основному з лімфоцитів, на неї припадає від 6 до 20% ваги селезінки. Між вільними клітинами білої пульпи (лімфоцити, моноцити, макрофаги і незначна кількість гранулоцитів) розташовуються ретикулярні волокна, які виконують опорну функцію.

Червона пульпа складається з ретикулярного остова, артеріол, капілярів, синусового типу венул і вільних клітин (еритроцитів, тромбоцитів, лімфоцитів, плазматичних клітин), а також нервових сплетень, на неї припадає від 70 до 80% ваги селезінки.

У лімфоїдній тканині селезінки містяться лімфоцити, що беруть участь в імунологічних реакціях. У пульпі здійснюється загибель частини формених елементів крові, термін діяльності яких минув. Залізо гемоглобіну із зруйнованих еритроцитів направляється по венах в печінку, де служить матеріалом для синтезу жовчних пігментів.

\*\*\*

Лімфатичні вузли розташовані на шляхах протікання лімфи від органів і тканин організму до лімфатичних стовбурів і проток. Вони є біологічними фільтрами, в яких знешкоджуються антигени, відбувається антигензалежна проліферація і диференціація Т- і В-лімфоцитів і формується конкретна імунна відповідь на їхню дію.

Лімфатичні вузли найчастіше мають бобоподібну форму. Вони розташовані в пухкій сполучній тканині, найчастіше групами, у яких налічується до кількох десятків вузлів (рис. 2). Вузли, які приймають лімфу від певної ділянки організму, називаються ділянковими лімфатичними вузлами. Вони поділяються на пристінкові, нутрощеві та змішані. Відповідно у пристінкові лімфатичні вузли впадають приносні лімфатичні судини від шкіри, підшкірної клітковини і опорно-рухового апарату, в нутрощеві – від внутрішніх органів, а в змішані вузли – від тіла і внутрішніх органів.

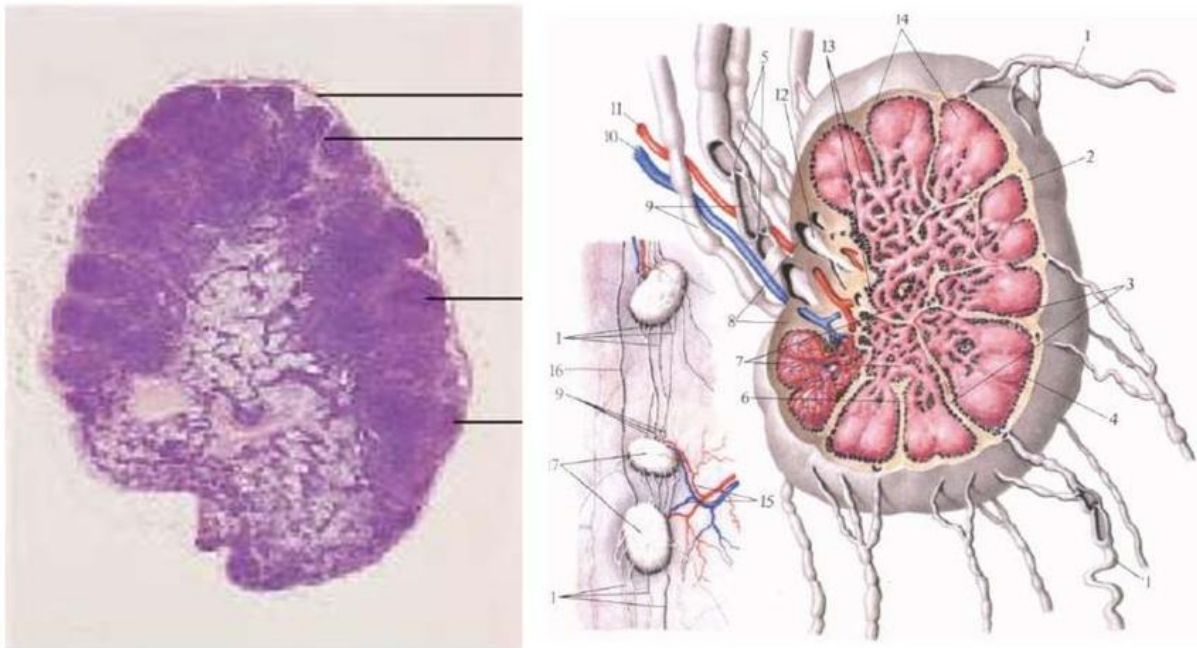


Рис. 2. Лімфатичний вузол (гістологічний препарат та схема будови)

Лімфатичний вузол вкритий сполучнотканинною капсулою, від якої вглиб органа відходять трабекули. Трабекули утворюють своєрідний

сполучнотканинний каркас. У трабекулах проходять судини і нерви. Простір між трабекулами заповнений строною, що утворена ретикулярними клітинами і ретикулярними волокнами. У цій сітці зі строми розташована лімфоїдна паренхіма, що складається з клітин лімфоїдного ряду, макрофагів тощо.

У найопуклішу частину лімфатичного вузла впадає 4–8, а інколи й більше приносних лімфатичних судин. З протилежного боку вузол має невелике втиснення – ворота лімфатичного вузла, через які проходять кровоносні судини і нерви, а також виходять 2–4 виносні лімфатичні судини, що прямують до наступного лімфатичного вузла або лімфатичного колектора.

Паренхіма лімфатичного вузла складається з коркової і з мозкової речовин. Вона пронизана численними вузькими каналами – лімфатичними проміжними пазухами, по яких лімфа протікає від крайової пазухи до ворітної пазухи. Між ендотеліоцитами, що вистеляють лімфатичні пазухи, можуть проникати з паренхіми лімфатичного вузла в лімфу і навпаки лімфоцити, макрофаги та інші клітини. У просвіті пазух міститься дрібнопетлиста сітка, утворена з ретикулярних волокон і клітин. У петлях цієї сітки можуть затримуватись сторонні частинки (вугільний і тютюновий пил), мікроби, злоякісні клітини тощо, які потрапили в лімфатичний вузол разом з лімфою. Часточки пилу переносяться макрофагами в паренхіму лімфатичного вузла і там відкладаються. Залишки зруйнованих клітин, що потрапили в лімфу, знищуються, а із злоякісних клітин можуть виникати вторинні пухлини – метастази.

У периферійній частині кори розташовані численні лімфоїдні вузлики діаметром 0,5–1 мм – це скупчення лімфоїдних клітин, в основному В-лімфоцитів, тому ці структури називають В-залежними зонами. Розрізняють первинні лімфоїдні вузлики, які не мають зародкового центру, або центру розмноження, бо щільність лімфоцитів у них однакова і вторинних лімфоїдних вузликів із зародковим центром, або центром розмноження. У центрах розмноження відбувається антигензалежна проліферація і диференціація різноманітних субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів. Там є багато лімфобластів і клітин, що мітотично поділяються, а також середніх лімфоцитів, тому на гістологічних препаратах ці центри видаються світлішими. Периферійна

частина лімфоїдних вузликів називається крайовою зоною, або плащовою зоною. На гістологічних зрізах крайова зона забарвлена інтенсивніше (темніше), бо щільно заповнена малими і середніми лімфоцитами. Через крайову зону постійно мігрують лімфоїдні клітини, макрофаги та інші клітини. Зокрема, «молоді» плазматичні клітини виходять із центра розмноження і мігрують через паракортикальну зону у мозкові тяжі, де вони контактують з іншими лімфоцитами, макрофагами і ретикулярними клітинами, обмінюючись з ними відповідною інформацією. Кількість вторинних лімфоїдних вузликів із центром розмноження збільшується після дії антигенів.

Частина периферійної кори, що розміщена між лімфоїдними вузликами і крайовою пазухою, називається підкапсульною частиною, або крайовою частиною. Дифузна лімфоїдна тканина, яка розміщена між лімфоїдними вузликами, утворює міжвузликову частину. Тут розташовані в основному малі і середні лімфоцити. Глибокі відділи кіркової речовини, що межують з мозковою речовиною, називаються прикірковою ділянкою, раніше її називали паракортикальною зоною. Це Т-залежна зона, бо там містяться переважно малі субпопуляції Т-лімфоцитів. У Т-залежній зоні здійснюються трансформації Т-лімфоцитів, їх проліферація і перетворення у спеціалізовані клітини системи імунітету. Тут багато дендритних клітин. На своїй поверхні вони несуть антигени і представляють їх Т-лімфоцитам (хелперам). Характерною морфологічною особливістю цієї зони є наявність в ній численних венул з високим ендотелієм, через які здійснюється рециркуляція лімфоцитів у паренхімі лімфатичного вузла із крові.

Паренхіма мозкової речовини представлена мозковими тяжами, які мають різноманітну форму і напрямок, а на гістологічному зрізі утворюють складні переплетення і острівці. У мозкових тяжах переважають В-лімфоцити. Зокрема, там розташовані «зрілі» плазмоцити, які виконують свою основну функцію – синтезують антитіла, обов'язковою є також присутність макрофагів.

У структурних компонентах лімфатичних вузлів постійно відбуваються процеси міграції, диференціації та проліферації субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів. Значна частина лімфоцитів з лімфою через виносні лімфатичні судини потрапляє у наступний лімфатичний вузол або у лімфатичні стовбури і

протоки, що впадають у венозні судини. У подальшому лімфоцити рециркулюють із крові у вторинні лімфоїдні органи і тканини.

Розрізняють неспецифічну захисну функцію лімфатичних вузлів за рахунок елімінації мікробів з лімфи і специфічну, що виражається в імунній відповіді на антигени. Ці органи виконують і кровотворну функцію. Хоча стовбурові клітини в них практично відсутні, але проліферація лімфобластів, диференціювання В-лімфоцитів у плазмоцити відбувається. Лімфа, протікаючи через лімфатичні вузли, збагачується лімфоцитами.

Лімфа протікає через лімфатичні вузли по синусах – порожнинах, що містять ретикулярну тканину, обмежені капсулою і трабекулами з одного боку і вузликами і мозковими тяжами – з іншого. У просвіті синусів виявляються ретикулярні клітини, макрофаги, лімфоцити, плазматичні клітини.

**Завдання 1.** Розгляньте мікрофотографії та під мікроскопом – мікропрепарати тканин селезінки. Визначте локалізацію червоної та білої пульпи, фолікулів (рис. 3).

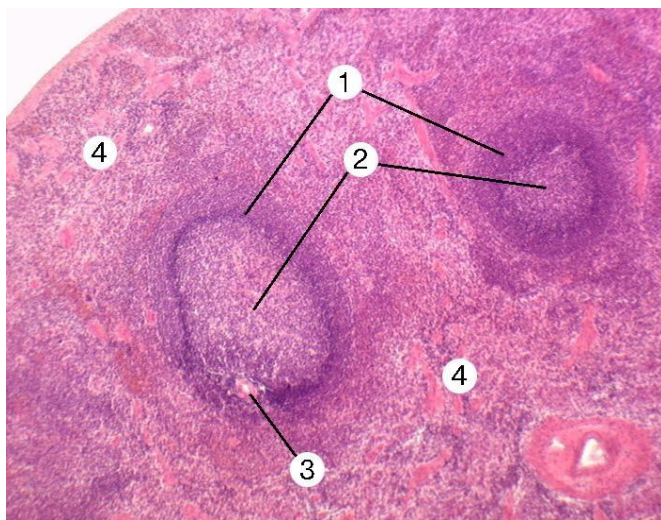


Рис. 3. Селезінка

**Завдання 2.** Розгляньте мікрофотографії лімфатичних вузлів та під мікроскопом – лімфатичний вузол кішки, пацюка. Позначте відповідні структури (капсулу, трабекули, В-залежну зону, Т-залежну зону, центри розмноження, медулярну зону) на знімках, зроблених за допомогою мікроскопа (рис. 4).

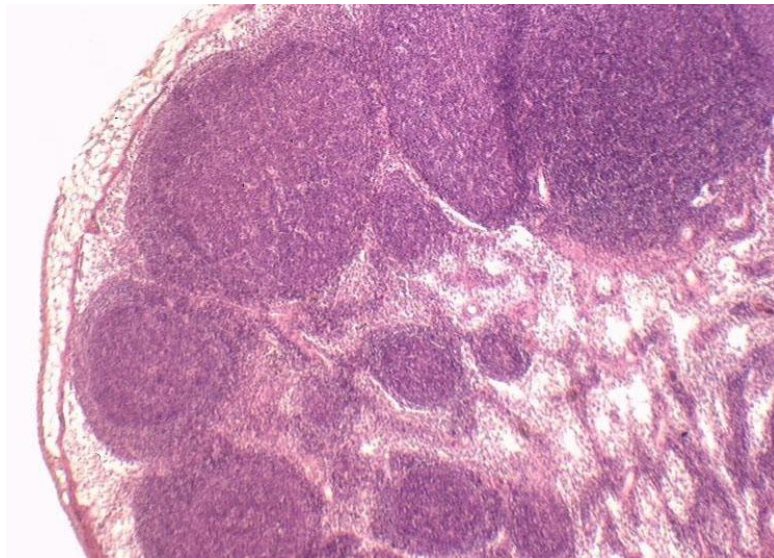


Рис. 4. Лімфатичний вузол

**Сформуйте висновки до роботи.**

**Тема: ГРУПОВІ АНТИГЕНИ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ. ВИЗНАЧЕННЯ ГРУПИ КРОВІ (СИСТЕМИ АВ0) ЗА ДОПОМОГОЮ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ТА СТАНДАРТНИХ СИРОВАТОК**

**Мета:** вивчити групові системи еритроцитів людини; навчитись визначати групи крові системи АВ0 за допомогою моноклональних антитіл та стандартних сироваток.

**Обладнання і матеріали:** пластини або планшети білі плоскі для аглютинації, секундомір, палички скляні або пластикові, ізотонічний фізіологічний розчин, рукавички нітрилові, нирковидні лотки, моноклональні реагенти анти-А, анти-В, анти-АВ, стандартні сироватки I, II, III, IV груп двох серій, капілярна або венозна кров, або еритроцити.

**Теоретичні відомості**

Визначення групи крові за допомогою різних лабораторних реагентів – стандартний метод досліджень. Інформація про групу крові вкрай важлива, особливо в тих випадках, коли людині потрібна екстрена допомога. Перед хірургічним втручанням обов'язково визначається тип індивідуальних антигенних характеристик людини. Та ж процедура є обов'язковою для військовослужбовців (інформація вказується на формі), для жінок перед пологами і т.ін.

Групи крові у людини – це система антигенів еритроцитів, яка представлена олігосахаридними структурами, зв'язаними з білками оболонки еритроцитів, котрі здатні викликати утворення специфічних антитіл і вступати з ними в реакцію. Антигенна структура еритроцитів (фенотип) є генетично визначеною (генотип). Характерною властивістю групових антигенів є їх здатність до стимуляції продукції відповідних до них антитіл у людей, які не мають цього антигену. В трансфузіологічній серології відрізняються два типи групових антитіл: природні та імунні.

Відомо багато систем еритроцитарних антигенів. Однак практичне значення мають система АВ0 та система Rh, оскільки вони найчастіше є причиною важких посттрансфузійних ускладнень і їх необхідно, в першу чергу, враховувати при гемотрансфузіях.



Система АВО представлена двома груповими антигенами А і В (аглютиногенами) та груповим олігосахаридом Н, останній знаходиться на еритроцитах групи 0 і не має антигенної детермінанти. У межах антигену А спостерігається антигенна диференціація на підгрупи А1, А2 та інші. Різновиди антигену В з'являються дуже рідко. У сироватці крові людей без відповідного антигену наявні природні (постійні, регулярні) антитіла класу IgM до групових антигенів А і В: анти-А ( $\alpha$  (альфа)) та анти-В ( $\beta$  (бета)). Таким чином, різні співвідношення групових антигенів еритроцитів та алоантитіл (ізоаглютинінів) сироватки крові дають чотири групи крові:  $O\alpha\beta$ , (II)A $\beta$  з підгрупами А1 $\beta$  та А2 $\beta$ , (III)B $\alpha$ , (IV)ABO з підгрупами А1B0 та А2B0.

Імунні антитіла анти-А чи анти-В, найчастіше класу IgG з'являються в результаті переливань груповонесумісної крові або внаслідок імунізації матері груповими антигенами плода. Природні та імунні групові антитіла відрізняються рядом фізико-хімічних і біологічних властивостей, з яких найбільше значення мають здатність проходити через плаценту, оптимальна температура та оптимальне середовище реакції з антигенами, теплова чутливість.

Визначення груп крові за системою АВО ґрунтується на феномені аглютинації з використанням двох методичних підходів:

1. На еритроцитах визначають наявність антигенів А, В за допомогою:
  - а) стандартних сироваток із специфічними ізоаглютинінами;
  - б) моноклональних антитіл (МКА);
2. У сироватці визначають наявність ізоаглютинінів  $\alpha$ (альфа) та  $\beta$ (бета) за допомогою стандартних еритроцитів відомої групи крові.

### **Хід роботи**

#### **Робота 1. Визначення групи крові за допомогою цоліклонів (моноклональних антитіл)**

Визначення груп крові цоліклонами – порівняно новий метод дослідження. Для здійснення лабораторного дослідження не потрібно багато часу, достатня наявність всіх необхідних хімічних речовин (цоліклони) і простого обладнання (рис. 1).



Рис. 1. Підготовка реагентів для виконання дослідження

Цоліклони по суті є одним з видів імуноглобулінів (IgM). Це моноклональні антитіла, які були утворені за допомогою генної інженерії. Цоліклони отримані в результаті впливу сироватки на стерильних лабораторних мишей. Утворюється скупчення рідини в черевній порожнині гризуна, яка містить ці антитіла.

Визначення груп крові за допомогою цоліклонів вимагає попередньої підготовки і дій відповідно до встановленого алгоритму. Температура повітря у приміщенні повинна бути не нижчою від 18 і не вищою від 25 градусів, інакше результат дослідження не може вважатися достовірним. У приміщенні не повинно бути пилу, тварин, комах та інших факторів, які можуть фізично вплинути на процес проведення дослідження. Також проведення лабораторного аналізу вимагає хорошого освітлення приміщення. Під час використання цоліклонів важливо тримати флакони щільно закритими і не допускати пересихання реагентів, інакше здатність антитіл до активних дій помітно знижується.

У сучасній лабораторній діагностиці використовується три види стандартних цоліклонів для визначення групи крові і резус фактора. Реагент типу «Анти-А» забарвлений в червоний колір, також пофарбований і флакон, ковпачок або етикетка флакона. Тип «Анти-В» забарвлюється синім, а «Анти-АВ» не позначається кольоровим маркером.

Моноклональні реагенти містить моноклональні антитіла класу IgM в титрі  $\geq 1:32$ .

Реагенти потрібно дістати з холодильника і витримати за кімнатної температури 15 хв.

Для визначення групи крові на планшкетку наносяться по одній великій краплі (100 мкл) моноклональних реагентів різних типів (А, В і АВ). Кожен з них має бути підписаний. Кожен тип цоліклонів має наноситись окремою стерильною піпеткою.

Поруч з реагентами поміщається по 1 краплі (50 мкл) крові пацієнта або еритроцитів.

Стерильною паличкою реагенти змішують з біологічним зразком.

Спостерігати за ходом реакції з моноклональними реагентами візуально при легкому погойдуванні пластини або планшету протягом 3–5 хв. Аглютинація еритроцитів зазвичай настає у перші 3–5 сек, але спостереження слід вести протягом 5 хв, бо можливий більш повільний початок аглютинації з еритроцитами, що містять слабкі різновиди антигенів.

### **Як зрозуміти результат**

Результат реакції в кожній краплі може бути позитивним або негативним. Позитивний результат виражається в аглютинації (склеюванні) еритроцитів. Аглютинацію видно неозброєним оком у вигляді дрібних червоних агрегатів, що швидко зливаються у великі пластівці або в один великий аглютинат (рис. 2–4).

- Відсутність будь-якої реакції склеювання у всіх зразках означає, що в клітинах еритроцитів пацієнта немає аглютиногена досліджуваного типу. Зразок крові зараховується до I групи (тип 0).

- Якщо еритроцитарні клітини пацієнта вступили в реакцію з реагентами типу «Анти-А» і «Анти-АВ», то у пацієнта II група крові (тип А).

- Помітна аглютинація зразка досліджуваної крові з реагентами типу «Анти-АВ» і «Анти-В» означає, що пацієнт має III групу крові (тип В).

- Якщо кров пацієнта вступила в реакцію з усіма реагентами, то досліджуваний зразок належить до IV групі (тип АВ).

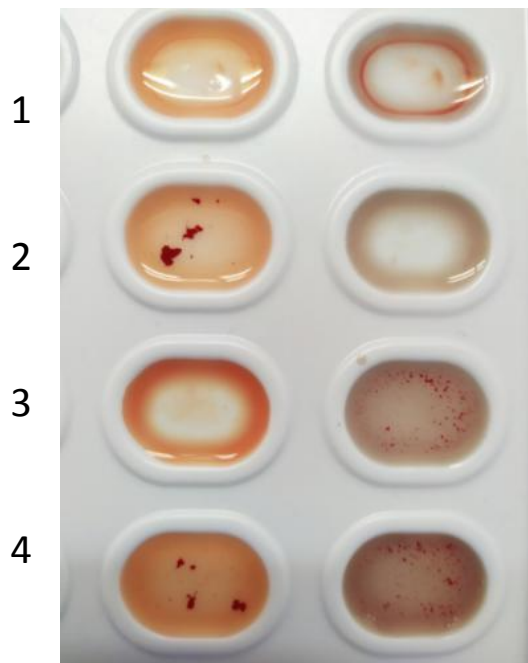


Рис. 2. Аглютинація еритроцитів різних груп крові за допомогою моноклональних реагентів анти-А та анти-В.

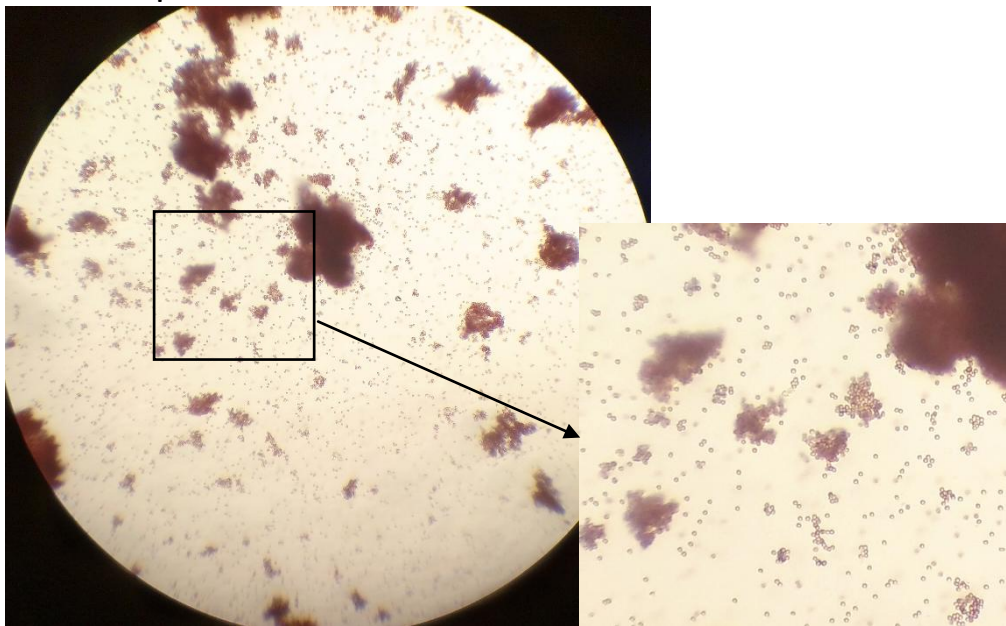


Рис. 3. Аглютинація еритроцитів моноклональним реагентом анти-А. Світлова мікроскопія, мале збільшення.

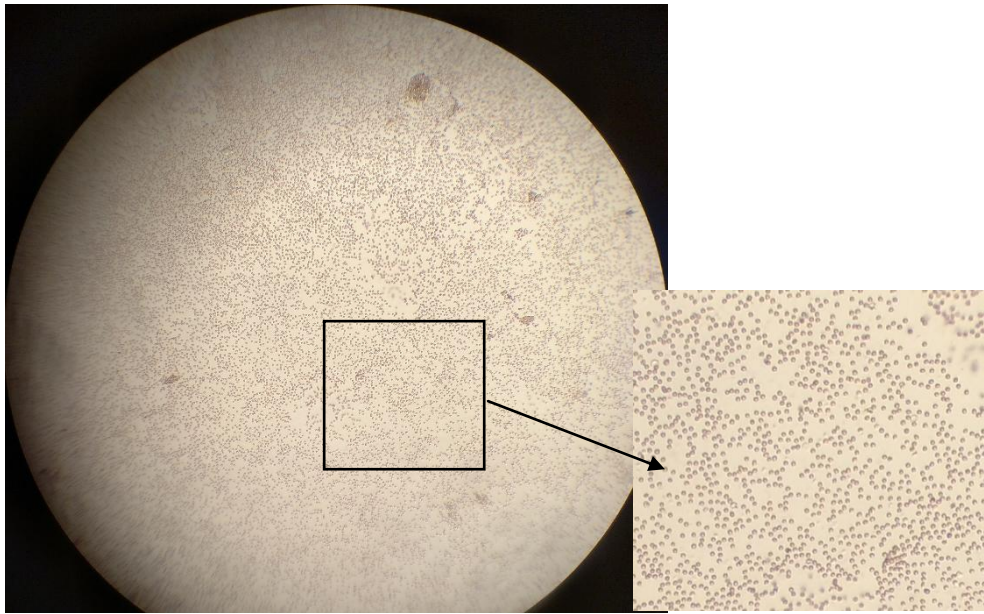


Рис. 4. Відсутність аглютинації еритроцитів при невідповідності антигенів еритроцитів та моноклонального реагента анти-А. Світлова мікроскопія, мале збільшення.

При позитивному результаті реакції аглютинації з усіма моноклональними реагентами необхідно виключити спонтанну неспецифічну аглютинацію досліджуваних еритроцитів. Для цього необхідно змішати на площині 1 краплю досліджуваної крові (еритроцитів) з 1 краплею фізіологічного розчину. Кров можна віднести до IV групи тільки за відсутності аглютинації еритроцитів у фізіологічному розчині.

Остаточно групова належність крові досліджуваного зразка за системою АВО встановлюється за результатами перехресного визначення антигенів А і В на еритроцитах і ізогемаглютининів в сироватці крові за допомогою стандартних еритроцитів.

**Завдання.** Виконайте дослідження групи крові за допомогою моноклональних реагентів анти-А, анти-В, анти-АВ.

## **Робота 2. Визначення групи крові за допомогою стандартних сироваток**

Визначення групи крові проводять у добре освітленому приміщенні при температурі від +15 до +20 °С (рис. 5).



Рис. 5. Підготовка реагентів для виконання дослідження

Сироватку наносять на пластину повздовжніми рядами: I крапля - 0 (I), II крапля - A (II), III крапля – B (III). У кожену краплю додають еритроцити досліджуваної крові. Так поступають з двома серіями сироваток. Краплини перемішують скляною паличкою, погойдуючи, спостерігають 5 хвилин (рис. 6).



Рис. 6. Аглютинація еритроцитів різних груп крові за допомогою стандартних сироваток. Примітка: у правому нижньому кутку – контрольне дослідження зі стандартною сироваткою АВ (IV) групи крові.

### Як зрозуміти результат

1. Якщо у всіх трьох краплях аглютинація не наступила - досліджувана кров 0 (I) групи.

2. Якщо сироватки 0 (I) і B (III) дали аглютинацію, то досліджувана кров A (II) групи.
3. Якщо дали аглютинацію сироватки групи 0 (I) і A (II), то досліджувана кров B (III) групи.
4. Якщо сироватки всіх трьох груп дали аглютинацію, то проводимо додаткове контрольне дослідження зі стандартною сироваткою AB (IV).
5. Якщо через 10 хвилин у четвертій краплі не настала аглютинація, то досліджувана кров належить до AB (IV) групи.

Наявність аглютинації у четвертій краплі свідчить про неспецифічну аглютинацію і дану кров необхідно досліджувати з відмитими еритроцитами.

**Завдання.** Виконайте визначення групи досліджуваної крові/еритроцитів. Використовуючи отримані відомості, заповніть таблицю.

№ з/п	Результат реакції зі стандартними сироватками групи			Досліджувана кров належить до групи
	0 (I)	A (II)	B (III)	
1				0 (I)
2				A (II)
3				B (III)
4				AB (IV)

*Примітка: знаком «плюс» позначте наявність аглютинації, знаком «мінус» - відсутність.*

**Сформуйте висновки до роботи**

## Практична робота 4

### **Тема: ВИЗНАЧЕННЯ ГРУПИ КРОВІ ЗА ДОПОМОГОЮ ПЕРЕХРЕСНОГО МЕТОДУ**

**Мета:** навчитись визначати групи крові за системами ABO та Rh.

**Обладнання і матеріали:** пластини або планшети бівлі плоскі для аглютинації, секундомір, палички скляні або пластикові, ізотонічний фізіологічний розчин, рукавички нітрилові, нирковидні лотки, стандартні еритроцити підгруп O(I), A(II), B(III), стандартні сироватки I, II, III, IV груп двох серій, капілярна або венозна кров, або еритроцити.

#### **Теоретичні відомості**

Стандартні еритроцити готують із крові донорів. Кров від донорів беруть у кількості 2-4 мл у пробірку, що містить 0,25-0,50 мл 3,8 % або 5,0 % розчину натрію цитрату, або гепарин, або консервант крові. Далі в пробірку (на 10,0 мл) до верху доливають 0,9 % розчин натрію хлориду, перемішують її вміст і центрифугують протягом 5 хв. при швидкості обертання ротора 1500 об./хв., або відстоюють до повного осадження еритроцитів. Надосад зливають, додають 0,9 % розчин натрію хлориду до початкового об'єму крові і використовують як стандарт при визначенні групи крові перехресним методом. Стандартні еритроцити зберігають у холодильнику при температурі  $+6 \pm 2$  °C. Термін зберігання - до 3 діб.

Стандартні тест-еритроцити можна одержати в готовому вигляді в закладах служби крові, які виготовляють ці стандарти.

#### **Хід роботи**

Визначення групи крові перехресним методом базується на паралельному визначенні наявності або відсутності групових антигенів на еритроцитах і наявності або відсутності групових ізоаглютининів у сироватці обстежуваної крові. Паралельне визначення ізоаглютининів у сироватці з стандартними еритроцитами А та В обов'язкове у донорів і реципієнтів.

Для визначення групи крові використовують стандартні сироватки груп O(I), A(II) і B(III) двох серій кожної групи, сироватку групи ABO(IV) і стандартні еритроцити груп O(I), A(II) і B(III).



Під відповідними позначками груп крові на пластинку наносять по одній великій краплі (0,1 мл) стандартних сироваток груп O(I), A(II) і B(III) послідовно зліва направо.

На нижню частину пластинки (третій ряд) під відповідними написами наносять по одній маленькій (0,01 мл) краплі стандартних еритроцитів у такій послідовності зліва направо: O(I), A(II) і B(III). З пробірки, що містить кров досліджуваного, піпеткою знімають сироватку і наносять її по одній великій краплі (0,1 мл) на підготовлені стандартні еритроцити (третій ряд). Після цього тією ж піпеткою набирають з дна пробірки еритроцити обстежуваної крові і наносять їх по маленькій краплі (0,01 мл) в 6 точок (другий і перший ряд) - по одній краплі поряд з кожною краплею підготовленої стандартної сироватки.

У всіх краплях сироватку старанно перемішують з еритроцитами чистою скляною паличкою. Пластинку періодично погойдують, проводячи спостереження за ходом реакції протягом 5 хв. У процесі аглютинації, але не раніше ніж через 3 хв., в ті краплі, в яких вона з'явилася, додають по одній краплі (0,05 мл) 0,9 % розчину натрію хлориду і продовжують спостереження при погойдуванні пластинки до 5 хв.

### **Як зрозуміти результат**

Трактування результатів реакцій проводять за оцінкою і співставленням результатів, отриманих за допомогою стандартних сироваток (два верхні ряди) і за допомогою стандартних еритроцитів (нижній ряд).

Результати реакцій, отриманих за допомогою стандартних сироваток і стандартних еритроцитів, повинні співпадати, тобто вказувати на наявність аглютиногенів та аглютинінів відповідно до однієї й тієї ж групи крові.

При встановленні групи крові AB(IV) необхідно провести контрольне дослідження цих еритроцитів з сироваткою групи AB(IV). Підтвердженням належності до цієї групи є відсутність аглютинації.

**Завдання.** Визначте групи двох зразків крові за допомогою перехресного методу. Встановіть, чи може один із досліджуваних бути донором для іншого? Відповідь обґрунтуйте.

### **Сформуйте висновки до роботи**

## Практична робота 5

### Тема: ВИЗНАЧЕННЯ РЕЗУС-НАЛЕЖНОСТІ КРОВІ

**Мета:** навчитись визначати Резус-належність крові за допомогою різних методів.

**Обладнання і матеріали:** пластини або планшети білі плоскі для аглютинації, секундомір, палички скляні або пластикові, ізотонічний фізіологічний розчин, рукавички нітрилові, нирковидні лотки, центрифужні або будь-які інші тонкостінні пробірки ємністю 10–15 мл; пробірки висотою 2–2,5 см і діаметром 0,5–0,6 см з гладким дном заокругленої форми або планшети з заглибинами такої ж конфігурації; водяна баня при температурі від 46 до 48 °С; лупа з 6–8-кратним збільшенням; термостат (37° С); 10% розчин желатину (желатин можна зберігати з консервантами: натрію сульфацилом (альбуцидом) з розрахунку 100 мг альбуциду на 10 мл 10% розчину желатину або з натрію азидом з розрахунку 10 мг на 10 мл 10% розчину желатину); стандартні сироватки груп двох серій з неповними антитілами; стандартні сироватки антирезус з повними антитілами; контрольні еритроцити + і – фенотипу; моноклональні реагенти анти-D Супер, анти-E, анти-C Супер; капілярна або венозна кров, або еритроцити.

#### Теоретичні відомості

Система резус включає 3 пари антигенів еритроцитів: D і d, C і c, E і e, які генетично зумовлені і представлені трьома парами алеломорфних генів на парі хромосом. Різні комбінації антигенів системи Rh на поверхні еритроцитів створюють 18 теоретично можливих фенотипів, тобто груп крові за системою Rh.

У трансфузіологічній практиці підлягають обліку, в першу чергу, три антигени – D, C і E. Особливе значення має антиген D, який є сильним імуногеном. Ці антигени можуть знаходитися на еритроцитах людей разом або окремо, утворюючи сім різних співвідношень, а також можуть бути взагалі відсутніми (генотип ccddee). Ці відмінності дозволяють умовно розділити еритроцити людей на 8 груп. З них 4 групи, в яких знаходиться антиген D, є резус-позитивними (Rh<sup>+</sup>), а 4 групи, які не мають антигену D, – резус-негативними (Rh<sup>-</sup>).

На відміну від системи АВ0, у сироватці крові людей практично не буває природних антитіл до антигенів системи Rh. Антитіла системи Rh мають виключно імунний характер і утворюються в результаті Rh-несумісної трансфузії чи вагітності.

Врахування груп крові за системою Rh є важливим для практики трансфузійної медицини.

Визначення резус-належності проводять у реакції аглютинації за допомогою алоімунних сироваток або моноклональних реагентів.

Визначення резус-належності крові донорів проводять у два етапи: спочатку кров донорів досліджують стандартною сироваткою анти-D або моноклональними реагентами анти-D-супер, а потім кров тих донорів, які дали негативну реакцію з сироваткою анти-D, досліджують додатково із стандартними сироватками антирезус, що містять, крім анти-D, антитіла анти-С і анти-Е. Антитіла анти-С і анти-Е можуть знаходитись у сироватці як у чистому вигляді, так і в суміші з антитілами D, наприклад: анти-D + С, анти-D + Е або анти-D + С + Е.

Таблиця 1

Найбільш поширені групи крові за системою резус серед європейського населення

Резус-позитивні (Rh+) 86 %	Резус-негативні (Rh-) 14 %
CDE	cde
CDe	Cde
cDE	cdE
cDe	CdE

Дослідження фенотипу резус необхідно проводити у жінок з підозрою на ізосенсибілізацію та у вагітних жінок з підозрою на резус-конфліктну вагітність.

Сироватки антирезус виготовляють звичайно у вигляді універсальних, тобто позбавлених групових антитіл. Такі сироватки придатні для визначення резус-належності крові людей будь-якої групи за системою АВ0. Однак за певних обставин сироватки антирезус виготовляють з крові різних груп за системою АВ0. У цих випадках у разі визначення резус-фактора необхідно враховувати групову специфічність сироватки. Сироваткою антирезус групи

O(I) визначається резус-фактор тільки в еритроцитах групи O(I); сироваткою антирезус групи A(II) визначається резус-фактор тільки в еритроцитах O(I) і A(II); сироваткою антирезус групи B(III) визначається резус фактор тільки в еритроцитах груп O(I) і B(III); сироваткою антирезус групи AB(IV) і спеціально виготовленою – універсальною, визначається резус-фактор в еритроцитах групи AB(IV) і будь-якої іншої групи крові.

Під час кожного дослідження для перевірки специфічності і активності сироватки антирезус необхідно ставити контроль.

Для контролю застосовують стандартні резус-позитивні еритроцити групи O(I) або тієї ж групи, що і досліджувана кров, і стандартні резус-негативні еритроцити обов'язково тієї ж групи, що і досліджувана кров.

Стандартні сироватки для визначення резус-належності можуть мати різні за формою резус-антитіла – повні і неповні. Кожні з цих антитіл активні тільки в особливих умовах, тому методика визначення резус-фактора залежить від того, які резус-антитіла знаходяться в стандартній сироватці.

Визначення резус-фактора обов'язково треба проводити двома серіями стандартних сироваток антирезус. Якщо стандартні сироватки активні в різних умовах (наприклад, одна з них містить повні антитіла і тому активна в сольовому середовищі, а друга містить неповні антитіла і активна в колоїдному середовищі – в желатині або поліглюкіні), то визначення резус-належності слід проводити різними методами, як вказано в супровідній інструкції для кожної серії сироватки.

Таким чином, метод визначення резус-фактора залежить від форми резус-антитіл у стандартній сироватці та способу її виготовлення. Видаючи сироватку антирезус, до неї прикладають коротку супровідну інструкцію з описом того методу, для якого призначена ця сироватка.

Під час визначення резус-належності двома серіями стандартних сироваток у тих випадках, коли вони використовуються різними методами, результат враховують як вірогідний за умови співпадання його в обох серіях досліджень після перевірки контрольних зразків, які підтверджують специфічність і активність кожної серії сироватки антирезус, тобто за відсутності аглютинації зі стандартними резус-негативними еритроцитами однойменної групи і наявності аглютинації зі стандартними резус-

позитивними еритроцитами однойменної або групи O(I) і в контрольних пробах без сироватки (реагенту) антирезус.

Якщо під час визначення резус-належності спостерігається слабка або сумнівна реакція, то слід повторно досліджувати кров даної особи тими ж та іншими серіями сироватки антирезус або моноклональними реагентами, а також використовувати сироватку, що вміщує повні антитіла.

Якщо за таких умов усі серії сироваток, що містять неповні антитіла, дадуть також слабку або сумнівну реакцію, а з повними антитілами реакція буде негативною, це означає, що еритроцити мають слабку різновидність антигену резус, так званий фактор  $D^U$ , який зустрічається в популяції з частотою близько 1%. У цих випадках резус-належність крові хворого або вагітної жінки оцінюють, як резус-негативну ( $Rh^-$ ), а резус-належність крові донора – як резус-позитивну ( $Rh^+$ ), не допускаючи, таким чином, переливання його крові резус-негативним реципієнтам.

Інколи зустрічаються зразки еритроцитів, що дають слабо виражену реакцію. У цих випадках слід повторно досліджувати їх кількома серіями сироваток антирезус високої активності або моноклональними антитілами (реагенти анти-D-супер).

Для визначення резус-належності крові донорів недостатньо розділення їх тільки на резус-позитивних і резус-негативних за сироваткою анти-D( $Rh_0$ ), а необхідно додатково досліджувати сироватками, що мають антитіла анти-C і анти-E, або моноклональними антитілами.

До резус-негативних донорів зараховують тільки тих осіб, кров яких не має жодного з вказаних антигенів.

Визначення антигенів резус-C, E, c і e проводять сироватками, що мають антитіла відповідної специфічності, або моноклональними реагентами. Ці антитіла можуть бути в сироватці як у чистому вигляді, так і в різних співвідношеннях.

Ці дослідження проводять тими ж методами, що і визначення резус-фактора – D. Як позитивний контроль використовують стандартні еритроцити, що мають відповідний антиген.

## Хід роботи

### Робота 1. Визначення резус-належності за допомогою реакції конглютинації із застосуванням желатину (в пробірці з підігрівом до 46–48 °С)

Попередня обробка досліджуваної крові і стандартних еритроцитів: кров для дослідження слід брати в кількості 2–5 мл в пробірку без стабілізатора. Звичайно після зсідання крові на дні пробірки лишається невелика кількість вільних еритроцитів, які слід використовувати для дослідження. Якщо цих еритроцитів недостатньо, слід струснути згусток для відділення більшої кількості еритроцитів. Якщо брати кров з 3,8-5,0 % розчином натрію цитрату (0,25 мл натрію цитрату на 1 мл крові), гепарином або іншим стабілізатором, еритроцити необхідно відмити. Для цього в пробірку доливають до верху 0,9 % розчин натрію хлориду, вміст її перемішують і центрифугують при 1500 об./хв протягом 5 хв за кімнатної температури. Для дослідження потрібно використовувати відмиті еритроцити. Для визначення резус-належності кров можна брати з місця проколу пальця скляною паличкою і негайно вводити в пробірку з сироваткою антирезус, змішаною з желатином у співвідношенні 1:2. Для визначення резус-належності кров можна зберігати в холодильнику протягом трьох діб за температури  $+6 \pm 2$  °С.

Техніка визначення: у разі використання двох серій сироватки антирезус у штативі розміщують три ряди центрифужних або будь-яких інших пробірок (об'ємом не менше 10 мл) у кожному ряді: досліджуваний зразок еритроцитів і по дві пробірки для стандартних резус-позитивних і резус-негативних еритроцитів. В перші пробірки кожного ряду вводять по одній краплі (0,05 мл) досліджуваних еритроцитів, а в контрольні – по одній краплі (0,05 мл) стандартних ( $Rh_0+$ ) і ( $Rh_0-$ ) еритроцитів.

У всі пробірки додають по дві краплі (0,1 мл) 10 % розчину желатину, попередньо підігрітого до розчинення на водяній бані за температури від 46 до 48 °С.

У всі пробірки першого ряду додають по одній краплі (0,05 мл) сироватки антирезус однієї серії, у всі пробірки другого ряду – по 1 краплі (0,05 мл) сироватки антирезус другої серії. Третій ряд є контролем для виключення можливого неспецифічного склеювання досліджуваних

еритроцитів, наприклад, за рахунок ауто-, теплових або холодних антитіл, і туди сироватку антирезус не додають.

Вміст пробірок перемішують струшуванням, і штатив з пробірками ставлять на водяну баню при температурі від 46 до 48 °С на 5–10 хв або в сухоповітряний термостат при тій же температурі на 30 хв.

Після виймання пробірок з водяної бані або з термостату до них додають 5–8 мл 0,9% розчину натрію хлориду і перемішують вміст шляхом 1–2-кратного перекидання пробірок.

### **Як зрозуміти результат**

Пробірки переглядають на світлі неозброєним оком або через лупу з двократним збільшенням. Результат оцінюють за наявністю або відсутністю аглютинації еритроцитів. За умови позитивного результату аглютинати легко розрізняються у вигляді червоних грудочок на прозорому, майже знебарвленому, тлі рідини. За умови негативного результату в пробірці видно рівномірно забарвлену рідину. Зразки еритроцитів, що дали аглютинацію з сироваткою анти-D(Rh<sub>0</sub>), є резус-позитивними (Rh<sub>0</sub>+). Зразки еритроцитів, що не дали аглютинації з сироваткою анти-D(Rh<sub>0</sub>), - резус-негативні (Rh<sub>0</sub>).

Результати враховують як вірогідні за умови співпадання їх в обох серіях сироватки антирезус і після перевірки контрольних зразків, які підтверджують специфічність і активність сироватки антирезус, тобто за відсутності аглютинації зі стандартними резус-негативними еритроцитами однойменної групи і наявності аглютинації зі стандартними резус-позитивними еритроцитами однойменної групи і групи O(I). У пробірках третього (контрольного) ряду аглютинації не повинно бути. Наявність аглютинації в будь-якій пробірці контрольного ряду свідчить про неспецифічність реакції. За цих умов позитивний результат з сироваткою антирезус не може бути врахований як вірогідний. У таких випадках для визначення резус-належності слід використовувати сироватку антирезус з повними антитілами або попередньо відмити еритроцити теплим 0,9 % розчином натрію хлориду для вимивання з них аутоантитіл. За сумнівного результату необхідно проводити мікроскопічне дослідження.

## **Робота 2. Визначення резус-належності за допомогою стандартного універсального реагенту (в пробірках без підігріву)**

Попередня обробка досліджуваної крові не потрібна. Може бути використана кров, взята безпосередньо перед дослідженням з місця уколу пальця, консервована кров і осад еритроцитів в пробірці після утворення згустку крові, взятої без стабілізатора. Дозволяється зберігати кров протягом 3 діб за температури  $+6 \pm 2$  °С.

Техніка виконання: у штатив ставлять 2 ряди пробірок з досліджуваних зразків еритроцитів у кожному ряді і по 2 пробірки для контрольних досліджень – стандартних резус-позитивних і резус-негативних еритроцитів. У всі пробірки 1-го ряду вносять по 2 краплі (0,1 мл) стандартного універсального реагенту антирезус. У всі пробірки 2-го ряду вносять по 2 краплі (0,1 мл) 0,9 % розчину натрію хлориду і по одній краплі (0,05 мл) 33 % розчину поліглюкіну.

У кожную пару пробірок вносять по 1 краплі (0,05 мл) досліджуваної крові, стандартних резус-позитивних і резус-негативних еритроцитів.

Вміст пробірок перемішують струшуванням і потім поволі повертають, нахилиючи майже до горизонтального положення так, щоб вміст розпливався по стінках. Таке розпливання крові по стінках пробірок робить реакцію більш вираженою. Як правило, аглютинація настає вже протягом першої хвилини, але для утворення стійкого комплексу антиген-антитіло і чітко вираженої реакції, а також зважаючи на можливість сповільненої реакції у разі слабкої аглютинабельності еритроцитів, контакт еритроцитів з реагентом при повертанні пробірок має тривати не менше 3 хв. Через 3 хв в пробірки додають по 2-3 мл 0,9 % розчину натрію хлориду і перемішують вміст 2–3-кратним повертанням пробірок (не струшувати!).

### **Як зрозуміти результат**

Пробірки передивляються на світлі неозброєним оком або через лупу з 2-кратним збільшенням. Результат оцінюють за наявністю або відсутністю аглютинації еритроцитів. За наявності аглютинації у вигляді великих грудочок або пластівців із склеєних еритроцитів на тлі освітленої рідини досліджувану кров можна вважати резус-позитивною. У разі відсутності аглютинації (в пробірці зберігається гомогенне забарвлення) досліджувану кров можна



вважати резус-негативною. Однак ці результати слід вважати вірогідними тільки після перевірки контрольних зразків, тобто у разі позитивної реакції зі стандартними резус-позитивними еритроцитами і негативної – з резус-негативними, а також після перегляду результатів у 2-му контрольному ряді. У всіх пробірках 2-го контрольного ряду аглютинації не повинно бути. Наявність аглютинації в будь-якій пробірці контрольного ряду вказує на неспецифічне склеювання еритроцитів і не дозволяє враховувати результат дослідження як вірогідний. У таких випадках для визначення резус-належності слід застосовувати іншу сироватку антирезус, включаючи сироватку з повними антитілами, або відмити еритроцити теплим 0,9 % розчином натрію хлориду для вимивання з них аутоантитіл.

**Робота 3. Визначення резус-фактора за допомогою реакції аглютинації в сольовому середовищі в маленьких пробірках або в планшеті для імунологічних реакцій (реакція придатна для роботи тільки з сироваткою, що має повні резус-антитіла)**

Попередня обробка досліджуваної крові і стандартних еритроцитів: кров для дослідження беруть у кількості 2–3 мл у звичайні пробірки, в яких знаходиться 0,25 мл (5 крапель) 3,8–5,0% розчину цитрату натрію або іншого стабілізатора. Еритроцити необхідно відмити, для цього в пробірки доливають доверху 0,9 % розчин натрію хлориду, зміст їх перемішують і центрифугують при швидкості обертання ротора 1500 об./хв протягом 5 хв. Можна брати кров без стабілізатора. У такому разі після зсідання в пробірці залишається деяка кількість вільних еритроцитів. Одержані за такою методикою еритроцити відмивають, як вказано вище. З відмитих еритроцитів готують 2% завис, для цього одну краплю еритроцитів переносять у відповідно позначену пробірку, в якій знаходиться 49 крапель 0,9% розчину натрію хлориду. Припустимо зберігати кров у холодильнику протягом 3 діб за температури  $+6 \pm 2$  °С.

Техніка визначення: у штатив встановлюють два ряди маленьких пробірок, у кожному ряді досліджуваний зразок еритроцитів і дві пробірки для контролю. У всі пробірки першого ряду вносять по 1 краплі (0,05 мл) сироватки антирезус однієї серії, у всі пробірки другого ряду – по 1 краплі

(0,05 мл) сироватки антирезус другої серії, у всі пробірки обох рядів – по 1 краплі 0,9 % розчину натрію хлориду. У перші пробірки рядів додають по 1 краплі (0,05 мл) 2% завису досліджуваних еритроцитів, а в контрольні пробірки – по 1 краплі (0,05 мл) 2% завису контрольних (стандартних резус-позитивних і резус-негативних) еритроцитів. Вміст пробірок ретельно перемішують струшуванням, штатив з пробірками ставлять у термостат за температури 37 °С на 1 год. За цей час еритроцити осідають на дно, попередньо увійшовши в контакт з сироваткою антирезус.

### **Як зрозуміти результат**

Пробірки слід розглядати по повздовжній осі над джерелом світла, закритим матовим склом. Результат оцінюють за наявністю або відсутністю аглютинації еритроцитів, що проявляється в різній формі їх осаду на дні пробірки. У разі позитивного результату осад еритроцитів розташовується на дні пробірки нерівномірним шаром. Видно шорсткість, губчастість або зернистість його структури. Контури осаду ніколи не бувають рівними, вони зігнуті, іноді згорнуті до середини. У деяких випадках еритроцити розташовуються у вигляді хвилястого віночка навколо більш світлої центральної частини.

У разі негативного результату осад еритроцитів розташовується рівномірним шаром без шорсткостей, інколи з невеликим просвітленням у центрі. Межі його виглядають як правильно окреслене коло. Діаметр осаду у разі негативного результату завжди менший, ніж у разі позитивного.

Зразки еритроцитів, що дають аглютинацію із сироваткою анти-D, є резус позитивними, зразки еритроцитів, що не дають аглютинації з сироваткою анти-D є резус-негативними. Однак результати вважають вірогідними за умови їх співпадання в обох серіях сироватки антирезус і після перевірки контрольних зразків, які підтверджують специфічність і активність сироватки антирезус, тобто за відсутності аглютинації зі стандартними резус-негативними еритроцитами однойменної групи і наявності аглютинації зі стандартними резус-позитивними еритроцитами однойменної групи. Слід зазначити, що повні антитіла не виявляють слабкий різновид фактора D<sup>U</sup>.

#### **Робота 4. Визначення антигенів системи резус за допомогою моноклональних антитіл**

Моноклональні реагенти (антитіла) призначені для виявлення окремих антигенів системи резус на еритроцитах людини. Їх можна застосовувати замість ізоімунних сироваток або паралельно з ними. Моноклональні тест-реагенти – це моноклональні антитіла, які виробляються гетерогібридомною. Одержують моноклональні антитіла з культуральної рідини гібридомних клітин-продуцентів. Технологія виготовлення тест-реагентів виключає можливість їх контамінації патогенними для людини вірусами.

Моноклональні антитіла анти-D-супер призначені для виявлення на еритроцитах людини антигену D і використовуються в серологічних тестах замість або паралельно з імунною анти-D-сироваткою. Моноклональні анти-D-антитіла випускають у вигляді повних (IgM) та неповних (IgG) антитіл. Оскільки IgM-антитіла не аглютинують деякі зразки еритроцитів із слабким варіантом D (зокрема, D<sup>U</sup>), необхідно такі «негативні» еритроцити додатково досліджувати в желатиновому тесті або непрямій пробі Кумбса з використанням анти-D-реагентів, що мають IgG-антитіла. Такими реагентами є поліклональні сироватки або моноклональні анти-D-IgG-реагенти.

Анти-D-IgM-антитіла викликають пряму аглютинацію еритроцитів, які мають D-антиген, і можуть використовуватись в будь-якій модифікації прямої аглютинації: в пробірках, на площині, в мікроплатах.

Моноклональні антитіла анти-C-супер вміщують антитіла, здатні викликати пряму аглютинацію еритроцитів, що несуть на собі C-антиген системи резус. Даний реагент не має антитіл іншої специфічності і тому придатний для виявлення C-антигену в еритроцитах будь-якої групи крові за системою ABO. Моноклональні анти-C-антитіла можуть бути використані в реакціях прямої аглютинації в пробірках, на площині, в мікроплатах. У разі застосування тесту на площині, скло необхідно попередньо злегка підігріти.

Моноклональні анти-CDE антитіла виготовляють із моноклональних антитіл (IgM та IgG) для виявлення в еритроцитах антигену C (один IgM-клон), D-антигену (один IgM-клон та один IgG-клон) і антигену E (один IgM-клон) шляхом прямої аглютинації в пробірках, на площині та в мікроплатах.

Слід підкреслити, що D<sup>U</sup>-позитивні еритроцити також аглютинуються цим реагентом. Проте в разі негативної реакції слабкий D<sup>U</sup> фенотип можна виявити в непрямому тесті Кумбса з використанням IgG-компонентів анти-CDE моноклональних антитіл.

Реакцію з моноклональними анти-резус-тест-реагентами можна ставити в пробірках, на площині та в мікроплатах.

Техніка виконання тесту в пробірках: одну краплю 3–5% завису еритроцитів сполучають з краплею моноклонального рідкого тест-реагенту. Пробірки струшують до повного перемішування реагентів, після чого центрифугують при швидкості ротора 1000 об./хв протягом 1 хв. Допускається попередня (перед центрифугуванням) інкубація при кімнатній температурі або при температурі 37 °С протягом 30 хв. Обережно струшують осад у пробірках. У разі негативного результату осад еритроцитів легко розбивається, створюючи гомогенну непрозору суспензію. Якщо результат позитивний, осад не розбивається, залишаючись у вигляді одного або декількох великих аглютинатів на тлі прозорої рідини.

Техніка виконання тесту на площині : на скляну площину зі змочуваною поверхнею наносять дві краплі тест-реагенту анти-резус (0,1 мл), 1 краплю досліджуваної крові (0,05 мл) і ретельно змішують. Через 20–30 секунд починають погойдувати площину. Чітка аглютинація починається і спостерігається досить чітко за 60 сек. Результат реакції слід враховувати через три хвилини, уникаючи висихання краплини (рис. 1).

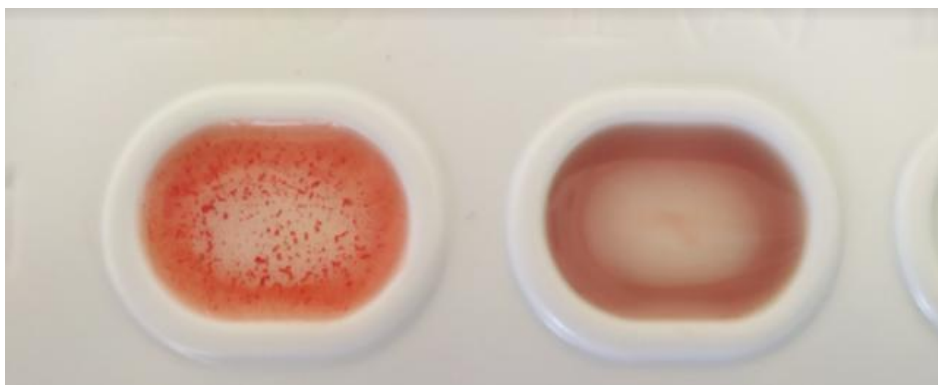


Рис. 1. Результат взаємодії резус-позитивної (ліворуч) та резус-негативної (праворуч) крові з моноклональним реагентом анти-D-супер.

Техніка виконання тесту в мікроплатах: в комірку мікроплати капають одну краплину тест-реагенту анти-резус і додають до неї одну краплю 3–5% завису еритроцитів. Ретельно перемішують вручну або вібратором для

мікроплат. Центрифугують за швидкості обертання ротора 1000 об./хв протягом 1 хв або попередньо інкубують 30 хв за кімнатної (від 20 до 27 °С) температури. Злегка струшують мікроплату. Якщо результат негативний, осад розбивається у вигляді рівномірного забарвлення рідини. У разі позитивного результату осад залишається у вигляді великих аглютинатів. Зчитування результатів необхідно проводити у прохідному світлі з дзеркалом або з використанням спеціального обладнання, наприклад, апарату автоматичного обліку мікроплат.

### **Робота 5. Непрямий тест Кумбса для визначення D<sup>U</sup>-антигену**

Техніка виконання тесту: готують 3–5 % суспензію досліджуваних еритроцитів в 0,9% розчині натрію хлориду. У пробірці сполучають 1 краплю суспензії еритроцитів з 1 краплею моноклональних анти-CDE-антитіл і ретельно перемішують реагенти. Ставлять на водяну баню за температури 37 °С на 15 хв. Після інкубації еритроцити тричі відмивають 0,9% розчином натрію хлориду. Для цього в пробірки доливають до верху 0,9% розчин натрію хлориду, вміст їх перемішують і центрифугують за швидкості 1500 об./хв протягом 5 хв. Додають до осаду еритроцитів 2 краплі антиглобулінової сироватки Кумбса, ретельно перемішують. Центрифугують протягом 1 хв за швидкості обертання ротора 1000 об./хв за кімнатної температури. Струшують пробірку та враховують аглютинацію. Аглютинація еритроцитів свідчить про наявність антигена D<sup>U</sup>. У разі негативного результату реакції ставлять паралельний контроль з D-позитивними та D-негативними еритроцитами в пробі Кумбса.

**Завдання:** визначте групову приналежність досліджуваної крові двома із запропонованих методів на вибір, порівняйте результати.

**Сформуйте висновки до роботи.**

**Тема: МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ, ДІАГНОСТИКА ТА ПРОФІЛАКТИКА  
ІЗОНЕСУМІСНОСТІ МАТЕРІ Й ПЛОДУ**

**Мета:** Вивчити механізми розвитку, методи діагностики та профілактики ізонесумісності матері і плоду за системами антигенів еритроцитів ABO, Rhesus та Kell.

**Обладнання і матеріали:** пластини або планшети білі плоскі для аглютинації, секундомір, палички скляні або пластикові, фізіологічний розчин, рукавички гумові, нирковидні лотки, контрольні еритроцити + і – фенотипу, моноклональні реагенти анти-А, анти-В, анти-АВ, анти-D Супер, анти-Е, анти-С Супер, капілярна або венозна кров, або еритроцити.

**Теоретичні відомості**

Термін «тип крові» відображає антигенний фенотип людини (повний антигенний «портрет», або антигенний профіль) – сукупність усіх групових антигенних характеристик крові. Еритроцити однієї людини можуть переносити молекули, що діють як антигени (речовини, які організм людини розглядає як чужорідні або потенційно небезпечні агенти й проти яких починає виробляти власні антитіла), у той час як в іншій людині еритроцити можуть не містити таких антигенів. Антигенні детермінанти груп крові виконують функцію транспортних молекул, каналів для води, аніонів.

Групові аглютиногени знаходяться у стромі та оболонці еритроцитів. Антигени системи ABO виявляються не лише на еритроцитах, але і на клітинах інших тканин або навіть можуть бути розчиненими в слині чи інших рідинах організму. Розвиваються вони на ранніх стадіях внутрішньоутробного розвитку, у новонародженого вже містяться у значній кількості. Кров новонароджених дітей має вікові особливості – у плазмі може ще не бути характерних групових аглютининів, які починають вироблятися пізніше (постійно виявляються після 10 місяців) і визначення групи крові у новонароджених в цьому випадку проводиться лише за наявності антигенів системи ABO.

Окрім ситуацій, пов'язаних із необхідністю переливання крові, визначення групи крові, резус-фактора, а також наявності алоімунних антиеритроцитарних антитіл повинно проводитися при плануванні або під час

вагітності для виявлення вірогідності імунологічного конфлікту матері та дитини, який може призводити до гемолітичної хвороби новонароджених.

Гемолітична хвороба новонароджених – гемолітична жовтяниця новонароджених, обумовлена імунологічним конфліктом між матір'ю і плодом через несумісність за еритроцитарними антигенами. Хвороба обумовлена несумісністю плода та матері за D-резус чи АВ0-антигенами, рідше має місце несумісність за іншими резус- (С, Е, с, d, е) чи М-, М-, Kell-, Duffy-, Kidd-антигенами. Будь-який із указаних антигенів (частіше D-резус-антиген), проникаючи у кров резус-негативної матері, викликає утворення в її організмі специфічних антитіл. Останні через плаценту надходять у кров плода, де руйнують відповідні антигенвмісні еритроцити.

Сприяють розвитку гемолітичної хвороби новонароджених порушення проникності плаценти, повторні вагітності та переливання крові жінці без урахування резус-фактора та ін. При ранній появі захворювання імунологічний конфлікт може бути причиною передчасних пологів чи викиднів. Існують різновиди (слабкі варіанти) антигена А (в більшій мірі) і рідше – антигена В. Щодо антигена А, існують варіанти: сильний А1 (більше 80%), слабкий А2 (менше 20%), та ще більш слабкі (А3, А4, Ах – рідко). Це теоретичне поняття має значення для переливання крові та може викликати нещасні випадки при віднесенні донора А2 (II) до групи 0 (I) чи донора А2В (IV) – до групи В (III), оскільки слабка форма антигена А іноді обумовлює помилки при визначенні групи крові системи АВ0. Правильне визначення слабких варіантів антигена А може потребувати повторних досліджень зі специфічними реагентами.

Зниження чи повна відсутність природних аглютининів альфа і бета іноді спостерігається при імунодефіцитних станах:

- ✓ новоутворення і хвороби крові – хвороба Ходжкіна, множинна мієлома, хронічна лімфатична лейкемія;
- ✓ уроджені гіпо- та агамоглобулінемія;
- ✓ у дітей раннього та людей похилого віку;
- ✓ імуносупресивна терапія;
- ✓ важкі інфекції.

## **Система Резус**

Система антигенів резус (Rhesus; Rh<sup>+</sup> та Rh<sup>-</sup>) представлена 6 антигенами, які успадковуються і не змінюються протягом усього життя; локус резус-системи міститься в 1-й хромосомі. Після антигенів АВО система антигенів резус має найбільше значення у клінічній практиці, оскільки резус-фактор є важливим чинником у виникненні гемолітичної жовтяниці немовлят та резус-конфлікту між матір'ю та плодом унаслідок того, що імунна система організму матері починає виробляти антитіла проти власної дитини (у разі, коли еритроцити резус-позитивного плода потрапляють у кров резус-негативної матері).

При переливанні резус-позитивних еритроцитів резус-негативним особам або навпаки виникають імунні реакції гемолітичного типу внаслідок аглютинації (склеювання) та гемолізу (руйнування) еритроцитів.

Понад 90% ускладнень при переливанні крові пов'язані з резус-несумісністю донора і реципієнта за антигеном Rh0 (D). За загальноприйнятою номенклатурою наявність антигену резус позначають знаком «+», а його відсутність — знаком «-». Резус-належність еритроцитів визначається за наявністю у людини антигену Rh0 (D). Людей, в еритроцитах яких цей антиген наявний, відносять до резус-позитивних, за його відсутності – до резус-негативних.

Є невелика категорія резус-позитивних осіб, здатних утворювати анти-резус антитіла. Це особи, еритроцити яких характеризуються значно зниженою експресією нормального антигена Rh на мембрані («слабкий» D, Dweak) чи експресією зміненого антигена Rh (частковий D, Dpartial). Ці слабкі варіанти антигена D в лабораторній практиці об'єднують у групу Du, частота якої складає близько 1%. Реципієнти, які містять антиген Du, повинні бути віднесені до резус-негативних, і їм повинна бути перелита лише резус-негативна кров, так як нормальний антиген D може викликати у таких осіб імунну відповідь. Донори із антигеном Du кваліфікуються як резус-позитивні донори, так як переливання їх крові може викликати імунну відповідь у резус-негативних реципієнтів, а у випадку попередньої сенсibilізації до антигена D – і тяжкі трансфузійні реакції.

При оцінці резус-належності донорів до резус-позитивних зараховують усіх осіб, еритроцити яких містять антигени D, C і E. Резус-негативними



називають донорів, еритроцити яких не містять жодного з цих антигенів. Така оцінка резус-належності дозволяє уникнути можливої сенсibilізації реципієнта до будь-якого з цих антигенів, що володіють високою імуногенною активністю. Обидва антигени С і с мають значно меншу імуногенність, ніж D-антиген. Антиген е трапляється частіше, ніж Е. Е має сильніші імуногенні властивості, ніж е.

У випадках виникнення ризику розвитку гемолітичної хвороби новонароджених, велике значення для підтвердження діагнозу (частіше за все під час вагітності) та при необхідності динамічного нагляду за появою і зміною титру антитіл є результати прямого та непрямого антиглобулінових тестів. Гемолітична хвороба новонародженого найчастіше пов'язана з несумісністю матері та плоду по антигену D. Антитіла, які з'являються при конфлікті чітко виявляються у непрямому антиглобуліновому тесті. Вірно встановлений титр антитіл та їх специфічність при даному захворюванні дає можливість прогнозувати тяжкість гемолітичної хвороби. Перевагою антиглобулінових тестів, за думкою багатьох авторів, є їх висока чутливість, яка значно перевищує чутливість альтернативних методів досліджень.

В даний час існує можливість медичної профілактики розвитку резус-конфлікту та гемолітичної хвороби новонароджених. Усі резус-негативні жінки в період вагітності повинні перебувати під наглядом лікаря. Необхідно також контролювати в динаміці рівень резус-антитіл.

Гемолітична хвороба новонародженого при Rh-несумісності проявляється звичайно після другої вагітності. Перша дитина народжується здоровою, другий з ознаками слабо вираженої анемії і тільки після третьої вагітності народжуються діти з явними ознаками гемолітичної хвороби. Тільки у попередньо сенсibilізованих жінок ще при першій вагітності може народитися дитина з симптомами гемолітичної хвороби. У деяких випадках імунізація викликає аборти і народження мертвих дітей. Для розвитку і тяжкості захворювання мають значення стан плаценти і тривалість впливу материнських аглютининів на плід. При появі аглютининів за 10-14 тижнів до пологів у дитини зазвичай спостерігаються субклінічні форми. Рання поява аглютининів, за 15-26 тижнів до пологів, викликає важкі форми захворювання. При всіх формах захворювання основним процесом є гемоліз. Наслідок

реакції антиген-антитіло - гемоліз, ураження печінкових і мозкових капілярів. Залежно від того, яке ураження переважає, спостерігаються і різні форми захворювання. небезпечні і деякі анафілактичні явища. Вони призводять до утворення гістаміноподібних субстанцій, що викликають важкі ураження печінки і особливо гангліонарних клітин базальних ядер, довгастого мозку і навіть кори головного мозку. При ураженнях печінкових клітин діти гинуть при важких явищах ядерної жовтяниці. Якщо вони виживають, залишаються симптоми уражень нервової системи (порушення з боку екстрапірамідальної системи з хореоатетозними рухами, своєрідною танцюючою ходою, примусовими рухами голови, іноді розладом координації довільних рухів з частим падінням, підвищеним тонусом м'язів, розумовою відсталістю.

### **Система Kell**

Система Kell є однією з найважливіших груп крові у трансфузіології та акушерській практиці. Система антигенів Kell (також відома як система Kell-Cellano) – група антигенів на поверхні еритроцитів, що є важливими детермінантами крові і мішенню для багатьох аутоімунних або аллоімунних захворювань, що знищують червоні кров'яні клітини крові. Показник Kell позначається як K, k і Kp. Білок Kell також недавно був позначений як CD238 (кластер диференціювання 238). Група Kell була названа по імені першого пацієнта, описаного з антитілами K1, вагітної жінки місис Cellano у 1945 році. Вона була першою вагітною жінкою з антитілами K2, яка вперше була описана.

Антигени Kell важливі в трансфузіології, в тому числі при переливанні крові, при аутоімунній гемолітичній анемії і гемолітичній хворобі новонароджених. У людей з браком специфічного антигену Kell можуть вироблятися антитіла проти антигенів Kell, коли робиться переливання крові, що містить цей антиген. При наступних переливаннях крові можуть відзначатися руйнування нових клітин цими антитілами (гемоліз еритроцитів). Особам, які не мають антигенів Kell (K0), при необхідності еритроцити переливаються тільки від Kell-негативних донорів, для запобігання гемолізу. З цієї причини від Kell-позитивних донорів в загальному випадку заготовляються тільки ті препарати крові, в яких немає еритроцитів: плазма, тромбоконтрат або криопреципітат. Особи ж з негативним антигеном Kell є

універсальними за цією ознакою реципієнтами еритроцитів, так як не відбувається їх відторгнення. Переливання еритроцитів від Kell-позитивного донора Kell-негативному хворому може викликати серйозні ускладнення – точно так само, як і при переливанні еритроцитів від резус-позитивного донора резус-негативному хворому.

Аутоімунна гемолітична анемія відбувається, коли організм виробляє антитіла проти антигенів групи крові на своїх власних еритроцитах. Антитіла призводять до руйнування червоних кров'яних клітин з наступною анемією. Крім того, вагітні жінки можуть виробляти антитіла проти еритроцитів плоду, що призводить до ГХН. Як аутоімунна гемолітична анемія, так і гемолітична хвороба новонароджених можуть мати дуже серйозні наслідки, викликані анти-Kell антитілами, оскільки вони є найбільш імуногенними антигенами після системи АВ0 і резус-фактора.

### **Методи дослідження**

Дослідження систем Rh (C, E, c, e) та Kell проводять методами реакції з моноклональними антитілами та гель-фільтрації. У першому методі використовують спеціальні моноклональні суміші, призначені тільки для прямого тестування і не використовуються в антиглобуліновому тесті. Rh-типсування також виконується з використанням гель-фільтрації. Антисироватка розподіляється рівномірно по всіх часточках гелем. Антиген-позитивні еритроцити реагують з антисироваткою, при цьому аглютиніни зв'язуються і не можуть звільнитись з гелю під час центрифугування.

Дослідження призначають перед плановими гемотрансфузіями з метою зниження частоти трансфузійних реакцій; додаткові обстеження під час вагітності з метою оцінки статусу за системами Rh та Kell; діагностика, оцінка ризику виникнення гемолітичної хвороби новонароджених та рішення про своєчасне адекватне лікування даної патології; обстеження донорів.

Визначення групи крові за системами АВ0 та Rhesus за період вагітності проводять дворазово (відповідно до вимог проведення імуногематологічних досліджень у пацієнтів). Антиген D-слабкий зазвичай чітко виявляється в НАГТ (непрямий антиглобуліновий тест). Резус-належність крові вагітної, яка має антиген D-слабкий, вважається позитивною.

Якщо у вагітної жінки виявлений D-варіантний антиген, то резус-належність вважається негативною. Категорія жінок, яка має D-варіантний антиген, при вагітності резус-позитивним плодом може виробляти анти-D антитіла.

Вагітним, в яких виявлений варіантний антиген D, необхідно проводити профілактику імуноглобуліном анти-резус так само, як і вагітним із резус-негативним типом крові.

Дослідження фенотипу за антигенами системи Rhesus проводиться у вагітних з алоантитілами для уточнення їх специфічності і прогнозу ризику ГХП або ГХН.

Клінічне значення у розвитку ГХН (гемолітичної хвороби новонароджених) мають IgG антитіла. IgM антитіла не викликають гемолітичної хвороби плоду та новонародженого через більшу молекулярну масу, що унеможлиблює їх проникнення через плаценту. Якщо у вагітної виявлені IgM антитіла і їх специфічність направлено до антигенів, які можуть викликати ГХП або ГХН, в подальшому необхідно регулярно проводити моніторинг антитіл тому, що зі збільшенням строку вагітності, до антитіл IgM, як правило, додатково з'являються антитіла IgG.

У разі виявлення антитіл IgG додаткове дослідження на належність їх до субкласів IgG дасть змогу оцінити ризик розвитку ГХП або ГХН, так як вони мають різні біологічні властивості. Якщо у сироватці присутні IgG1 антитіла, то вони вільно проходять через плаценту. Легко взаємодіють з Fc-рецепторами фагоцитуючих клітин, але чи буде еритроцит гемолізований, залежить від кількості IgG1. Якщо в наявності IgG3 антитіла, то вони теж вільно проходять через плаценту, легко взаємодіють з Fc-рецепторами фагоцитуючих клітин, але гемоліз не залежить від кількості IgG, які пройшли через плацентарний бар'єр, і в них більше, ніж у IgG1, виражена здатність активувати систему комплементу. Але частіше у сироватці крові виявляється суміш IgG1 і IgG3 антитіл.

Вагітним з групою 0, А, В, які мають чоловіка з іншою групою належності, обов'язково проводиться визначення антитіл за системою АВ0. Імунні анти-А і анти-В антитіла можуть викликати ГХН за системою АВ0, але

тяжка форма цього захворювання зустрічається рідко (1 випадок на 3000 пологів).

Пояснюється цей факти тим, що висока концентрація розчинених А та В антигенів плода у тканинах плаценти, плазмі крові плода, навколоплідних водах забезпечує значну інгібіцію анти-А, анти-В антитіл матері, які проникають через плаценту; структура антигенів А та В у новонароджених відрізняється від структури антигенів дорослих, тому еритроцити плода зв'язують незначну кількість антитіл, навіть при великій їх концентрації; під час дослідження сироватки вагітних встановлено, що майже всі анти-А, анти-В антитіла, як правило, відносяться до субкласу IgG2. Fc-рецептори клітин тканин плаценти ефективніше зв'язують IgG1, ніж IgG2 антитіла, тому анти-А та анти-В IgG2, навіть, у високих титрах не викликають тяжку форму ГХН.

Цим пояснюється і те, чому у деяких випадках при позитивному ПАГТ (прямий антиглобуліновий тест) не спостерігаються ознаки ГХН.

З іншого боку, в деяких випадках за наявності клінічних ознак ГХН спостерігається негативний ПАГТ. Це обумовлено наявністю анти-А або анти-В антитіл субкласу IgG3, рівень яких може бути нижчим, ніж рівень чутливості реакції ПАГТ.

### Хід роботи

**Робота 1.** Визначте групу крові вагітної жінки та її чоловіка за системою АВО за допомогою моноклональних антитіл. За результатами оцініть імовірність розвитку ізоімунного конфлікту матері й плоду.

**Робота 2.** Виконайте фенотипування досліджуваної крові вагітної жінки та її чоловіка за допомогою анти-Д, анти-С та анти-Е моноклональних антитіл. За результатами оцініть імовірність розвитку резус-конфлікту матері й плоду за умови успадкування батьківських антигенів еритроцитів.

Техніка проведення: моноклональний реагент анти-Д Супер містить моноклональні антитіла IgM в титрі  $\geq 1:128$ , анти-С Супер – в титрі  $\geq 1:8$ , анти-Е Супер – в титрі 1:16. Реагенти мають високу гемаглютинуючу активність і надійно виявляють відповідні антигени як гомо-, так і гетерозиготних фенотипів у прямій реакції на площині. Для дослідження використовують нативну кров без консерванту або кров стабілізовану з консервантами

(гепарин тощо). Моноклональні реагенти слід дістати з холодильника і витримати при кімнатній температурі 15 хв. Стандартні еритроцити, що зберігаються в консерванті, потрібно тричі відмити 0,9% фізіологічним розчином. Досліджувані еритроцити відмивати не обов'язково.

Приготування 5% суспензії еритроцитів: до 1 мл 0,9% фізіологічного розчину додайте 2 краплі крові або 1 краплю осаду еритроцитів.

В лунки планшета нанесіть 1-2 краплі (50-100 мкл) моноклональних реагентів анти-D Супер, анти-C Супер, анти-E Супер та по 1 маленькій краплі досліджуваної крові або еритроцитів і змішайте за допомогою похитування планшета до повного перемішування реагентів. Через 20-30 сек після змішування похитайте пластинку або планшет. Оцініть результат візуально по наявності або відсутності аглютинації. Чітка реакція настає через 30-60 сек після змішування. Аглютинація еритроцитів з гетерозиготним фенотипом настає трохи повільніше, ніж з гомозиготним. Остаточний результат підраховують через 3 хв, але не пізніше, тому що при підсиханні краплини може спостерігатись дрібна неспецифічна аглютинація. У сумнівних випадках після закінчення 3 хв можна додати 1-2 краплі фізіологічного розчину і похитати планшет, неспецифічна реакція зникне.

Реакцію враховують при позитивній реакції аглютинації зі стандартними позитивними і відсутності її негативними еритроцитами.

**Робота 3.** Визначити групу крові вагітної жінки та її чоловіка за системою Kell за допомогою моноклональних антитіл. За результатами оцінити ризик розвитку ізоімунного конфлікту за умови успадкування бітьківських антигенів еритроцитів.

**Робота 4.** Пряма та непряма проби Кумбса.

Антиглобуліновий тест був відкритий в 1945 році Р. Кумбсом, А. Морантом та Р. Рейсом. В 1945-1946 р.р. вперше було застосовано та описано антиглобуліновий реагент, а через декілька років антиглобуліновий тест почали застосовувати практично в кожній імуногематологічній лабораторії.

Складовою реагенту проби Кумбса є спеціальна сироватка, отримана із крові тварин, імунізованих імуноглобулінами (Ig G, Ig M, Ig A), компонентами

компліменту або іншими білками крові людини. При фіксації антитіл на еритроцитах (in vivo або in vitro) імунна сироватка виявляє наявність неповних (або повних) антиеритроцитарних антитіл, тобто викликає аглютинацію еритроцитів, на яких абсорбований білок людини (будь яке антитіло). В залежності від того, чи фіксується антитіла на поверхні еритроцитів чи знаходяться у вільному стані у сироватці крові, застосовується пряма або непряма проба Кумбса (рис. 1).

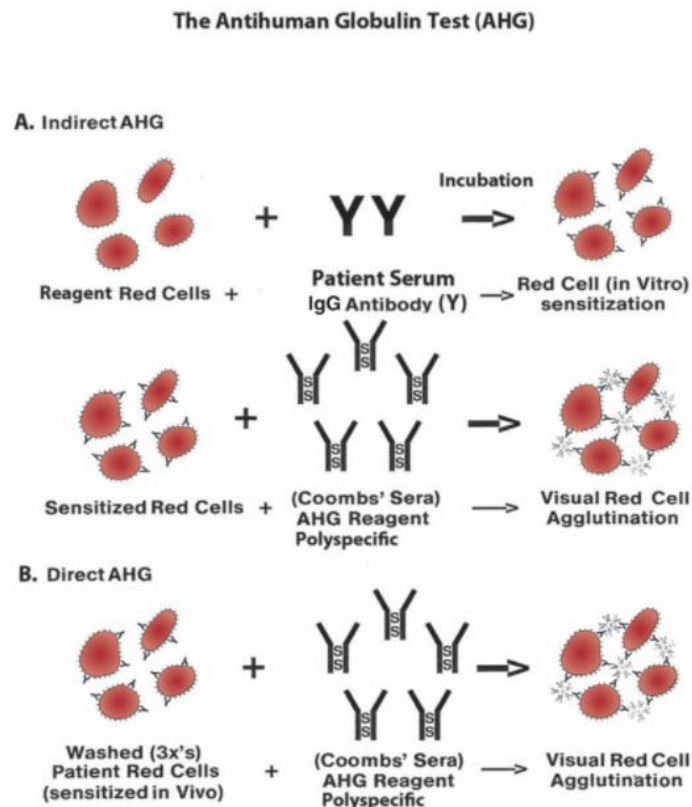


Рис. 1. Схема прямої та непрямой проб Кумбса

Пряма проба Кумбса проводиться у тих випадках, коли є припущення, що досліджувані еритроцити підлягали сенсibiliзації відповідними антитілами in vivo, тобто перша фаза реакції – фіксація антитіла на поверхні еритроцита – пройшла в організмі, а додавання антиглобулінової сироватки викликає аглютинацію сенсibiliзованих клітин. За допомогою непрямой проби Кумбса виявляють антитіла, не фіксовані на еритроцитах in vivo, а які вільно знаходяться в сироватці крові. В даному випадку реакція проходить два етапи. Перший етап – інкубація тест-еритроцитів з досліджуваною сироваткою, під час якої відбувається фіксація антитіл на поверхні еритроцитів. Другий етап – додавання антиглобулінової сироватки.

За допомогою цієї проби доводять наявність фіксованих еритроцитами дитини блокуючих антитіл. Позитивна пряма проба свідчить про сенсibilізацію і служить переконливою ознакою гемолітичної хвороби новонародженого ще до появи інших клінічних ознак. Як виняток і тільки в дуже важких випадках пряма проба Кумбса може виявитись негативною у зв'язку з майже повним гемолізом сенсibilізованих еритроцитів.

Пряма проба Кумбса виконується таким чином: 5 крапель крові, взятої з п'яти дитини, поміщають у пробірку і додають 5 мл фізіологічного розчину. Добре розмішують і центрифугують протягом 10 хв. Відокремлюють прозору рідину над осадом еритроцитів. Потім знову додають 5 мл фізіологічного розчину, змішують і центрифугують. Після триразового змішування з фізіологічним розчином еритроцити вже добре промиті. Після останнього відділення надосадової рідини еритроцитний осад у кількості 0,1 мл змішують з 0,9 мл фізіологічного розчину. Наносять 2-3 краплі цієї суміші на предметне скло і додають одну краплю сироватки Кумбса. Наявність аглютинації вказує на те, що реакція позитивна, (позитивна пряма проба Кумбса). Дослідження слід проводити при кімнатній температурі вище від 16 °С, щоб уникнути дії холодних аглютининів.

Непряма проба Кумбса служить доказом наявності вільних антитіл в сироватці матері і виконується з сироваткою крові матері.

**Завдання:** Користуючись теоретичним матеріалом та схемою встановити особливості проведення прямої та непрямої проб Кумбса.

**Сформуйте висновки до роботи**



## Практична робота 7

### Тема: МЕТОДИ ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

**Мета:** вивчити основні принципи поведення неконкурентних та конкурентних імуноаналізів на прикладі імуноферментного аналізу (ІФА).

**Обладнання і матеріали:** пластини або планшети білі плоскі для аглютинації, секундомір, палички скляні або пластикові, фізіологічний розчин, рукавички гумові, нирковидні лотки, контрольні еритроцити + і – фенотипу, моноклональні реагенти анти-А, анти-В, анти-АВ, анти-D Супер, анти-Е, анти-С Супер, капілярна або венозна кров, або еритроцити.

#### Теоретичні відомості

Імуноаналізами називають такі методи якісного та кількісного визначення розчинних речовин, в основі яких лежить взаємодія антигенів з антитілом (тобто імунологічне розпізнавання), яке візуалізується за допомогою спеціальної мітки, заздалегідь кон'югованої або з антитілом, або з антигеном. Методи імунного аналізу широко увійшли в медичну практику. У всіх областях сучасної медицини використовується імунний аналіз, переважно, з діагностичною та аналітичною цілями. Особливо важливо, що вони дають можливість ідентифікувати біологічні компоненти (гормони, ферменти, нейропептиди, продукти імунної системи, антигени і т.д.) в низьких і дуже низьких концентраціях. Всі продукти, проти яких можливе отримання антитіл, виявляються цими методами. Імунний аналіз ґрунтується на взаємодії антигену (АГ) і антитіла (АТ) з використанням різних варіантів мічення одного з компонентів (фермент, радіонуклід, флуоресцентний барвник та інші). Оцінка реакції проводиться автоматично на спеціальній апаратурі, що дозволяє стандартизувати ці методи. Залежно від типу мітки і умов виконання тесту імунний аналіз позначається як імуноферментний (ІФА), радіоімунний (RIA), імунофлуоресцентний та інші.

При постановці реакцій в один або декілька етапів вони позначаються як прямі або непрямі. Має значення середовище, в якому проводиться реакція. Якщо реакція проводиться з реагентами, фіксованими на поверхні, то тест

позначається як твердофазний, наприклад ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

Перші розробки імуноаналізів були у так званих гомогенних варіантах, або без розділення компонентів, тобто у розчині. Але незабаром стали використовувати тверду фазу, аналізи стали називати твердофазними або з розділенням компонентів.

Технологічно твердофазні аналізи без порівняння зручніші за гомогенні, і в даний час використовують тільки твердофазні варіанти методик ІФА. На тверду фазу сорбують або антиген, або антитіло. У якості такої фази використовують наступні матеріали: пластмасу у вигляді стандартно штампованих мікропанелей (96 або 60 лунок), або кульки, ковпачки та т.п. для постановки одиничних проб у пробірках; пористі матеріали типу нітроцелюлози у вигляді наповнювачів в об'ємі або у вигляді плоских листів чи смужок. У пористих матеріалах частина реагентів фіксовано сорбована, інша частина дифундує по порах.

Метод базується на специфічному зв'язуванні АТ з АГ, при цьому один з компонентів кон'югований з ферментом. В результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом утворюється забарвлений продукт, кількість якого можна визначити спектрофотометрично (рис. 1).

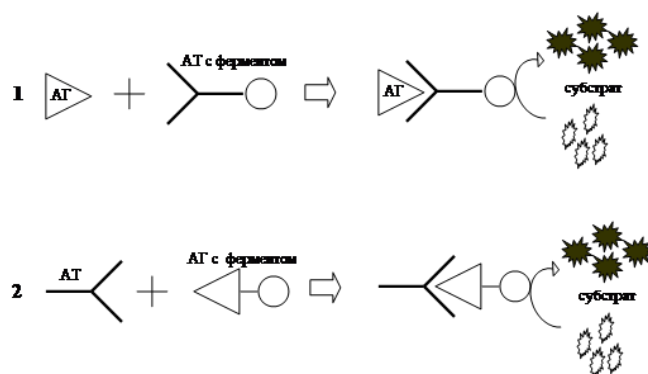


Рис. 1. Основний принцип ІФА. 1) Для виявлення антигенів. 2) Для виявлення антитіл.

Будь-який варіант ІФА містить **3 обов'язкові стадії**: 1) стадія впізнавання тестованої сполуки специфічним до неї антитілом, що призводить до утворення імунного комплексу; 2) стадія формування зв'язку кон'югату з імунним комплексом або з вільними місцями зв'язування; 3) стадія перетворення ферментної мітки в реєстрований сигнал.

**2.1. Класифікація ІФА.** В основу класифікації методів ІФА покладено кілька підходів:

**I. За типом реагентів,** присутніх на першій стадії ІФА, розрізняють **конкурентний і неконкурентний методи.**

А) У конкурентному ІФА на першій стадії в системі присутні одночасно аналізована сполука і її аналог, мічений ферментом і конкуруючий за центри специфічного зв'язування з нею.

Б) Для неконкурентних методів характерна присутність в системі на першій стадії тільки аналізованої сполуки і специфічних до неї центрів зв'язування.

**II. Всі методи ІФА поділяють на гомогенні та гетерогенні.**

Якщо всі три стадії ІФА проходять в розчині і між основними стадіями немає додаткових етапів відмивання (відділення імунних комплексів, які утворюються від компонентів, що не прореагували), – метод належить до групи гомогенних.

Для гетерогенних методів характерне проведення аналізу в двофазній системі за участю твердої фази – носія, і обов'язковою є стадія відмивання. Гетерогенні методи, в яких формування імунних комплексів на першій стадії протікає на твердій фазі, називають твердофазними методами.

**III. Прямі імуноаналізи**

Прямими називають імуноаналізи, у яких мітку приєднують або до заданого антигену, або до специфічного проти заданого антигену антитіла безпосередньо. Прямий варіант використовують у гомогенних системах і деяких гетерогенних: у конкурентному, інгібіторному, сандвіч-ІФА та імуноферментнометричному аналізі.

**IV. За принципом визначення тестованої речовини:**

А) Пряме визначення концентрації речовини (антигену чи антитіла) за кількістю центрів зв'язування, які з ним провзаємодіяли. У цьому випадку ферментна мітка буде знаходитися в утвореному специфічному комплексі АГ-АТ. Концентрація речовини, яка визначається буде прямопропорційною до зареєстрованого сигналу.

Б) Визначення концентрації речовини за різницею загальної кількості місць зв'язування і центрів зв'язування, які залишились вільними. Концентрація тестованої речовини при цьому буде зростати, а реєстрований сигнал знижуватися, отже, в даному випадку простежується зворотна залежність від величини реєстрованого сигналу.

## **2.2. Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА.**

**I. Мітки.** Ферментні мітки мають потужну каталітичну дію, одна молекула ферменту може реагувати з великою кількістю молекул субстрату. Таким чином, фермент, присутній у незначних кількостях, може виявити і кількісно визначити продукти, які утворились у реакції, яка цим ферментом каталізується. Найбільше застосування знайшли пероксидаза хрому (ПХ), лужна фосфотаза (ЛФ) і  $\beta$ -D-галактозидаза. Всі три стабільні і каталізують високочутливі реакції.

**II. Субстрати.** Найчастіше використовують хромогенні субстрати, які, руйнуючись, утворюють забарвлену речовину. Перспективним є використання високоенергетичних субстратів - флуоресцентних, хемілюмінесцентних. Застосування таких субстратів дозволяє теоретично підвищити чутливість ІФА на два порядки.

**III. Антигени та антитіла.** АГ і АТ, які використовують в ІФА, повинні бути добре очищеними і високоактивними. Крім того, АГ повинні володіти високою антигенністю, оптимальною щільністю і кількістю антигенних детермінант, чужорідністю і гомогенністю. Одним з найважливіших реагентів в ІФА є антитіла. Чутливість ІФА залежить від концентрації, активності та специфічності задіяних антитіл. Ці антитіла можуть бути полі- або моноклональними, різного класу (IgG або IgM) і підкласу (IgG1, IgG2). Чутливість і специфічність методу підвищується при використанні моноклональних антитіл. У цьому випадку з'являється можливість виявляти низькі концентрації АГ (АТ) у досліджуваних зразках.

**IV. Утворення кон'югату.** Кон'югат - це антиген або антитіло, мічені ферментної міткою. Утворення кон'югату - один з важливих етапів проведення ІФА. При формуванні кон'югату підбирають оптимальний метод введення ферментної мітки, щоб обидва компоненти кон'югату зберігали свою біологічну активність: фермент - здатність взаємодіяти з субстратом, а

антиген або антитіло – антигенність або антигензв'язуючу активність, відповідно. Наявність міченого, високоочищеного антигену дозволяє використовувати **конкурентні методи**. У цьому випадку на кінцевому етапі можна вимірювати активність кон'югату, не пов'язаного з іммобілізованими антитілами, що дозволяє уникнути процедури відмивання і робить аналіз більш зручним. Однак антигени різноманітні за своїми фізико-хімічними властивостями і будовою, а значить неможливо розробити загальні механізми для отримання кон'югату з антигеном. У цьому випадку одержання кон'югату антигену з ферментом представляє собою окрему складну задачу. Приготування мічених антитіл для ІФА методично більш доступне.

**V. Тверда фаза.** В якості твердої фази для проведення ІФА можна застосовувати різні матеріали: полістирол, полівінілхлорид, поліпропілен та інші речовини. Твердою фазою можуть служити стінки пробірки, 96-ямковий та ін. планшети, кульки, намистини, а також нітроцелюлозні й інші мембрани, які активно сорбують білки. Іммобілізація антигену або антитіл на твердій фазі можлива трьома шляхами: пасивна адсорбція, заснована на сильних гідрофобних взаємодіях між білками і синтетичної поверхнею; ковалентне прикріплення до твердої фази; імунохімічне та ін. (нековалентне і неадсорбційне приєднання). Антиген, іммобілізований імунохімічно, у 10 разів активніший, ніж пасивно адсорбований антиген.

**2.3. Варіанти постановки ІФА.** В даний час використовується величезна кількість всіляких різновидів і модифікацій ІФА. Широке розповсюдження одержали різні варіанти твердофазного ІФА (ELISA) (рис. 2).

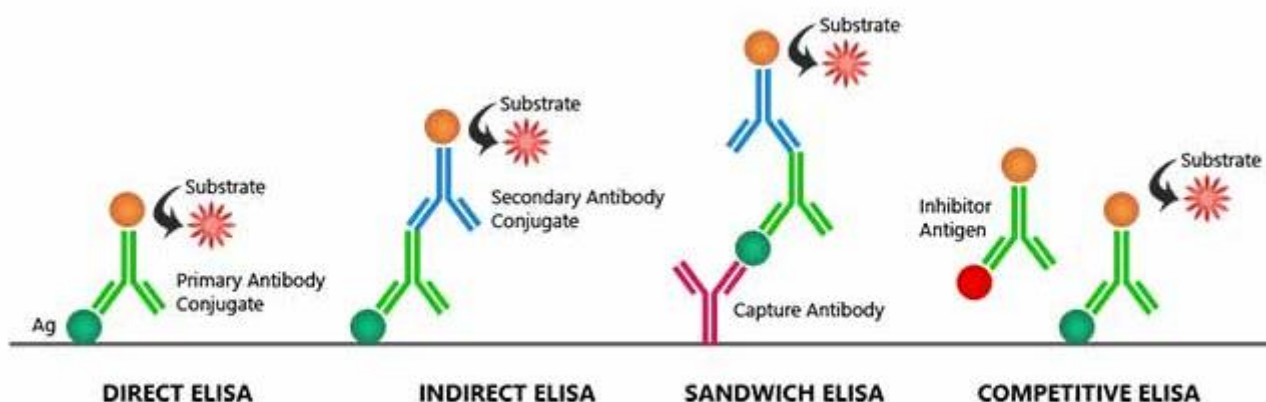


Рис. 2. Різновиди твердофазних ІФА

Основні принципи твердофазного ІФА, незалежно від модифікації, полягають в наступному:

1. На 1 етапі реакції адсорбують антигени або антитіла на твердій фазі. При цьому всі не пов'язані з твердою фазою реагенти легко видаляються відмиванням.

2. У сенсibilізованих лунках інкубують досліджуваний зразок. У лунках з позитивним контролем - стандартні реагенти. При цьому на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси. Незв'язані компоненти видаляють відмиванням.

3. При додаванні кон'югату антитіло-фермент або антиген-фермент і зв'язуванні його з іммобілізованим імунним комплексом активний центр ферменту залишається доступним для подальшої взаємодії з субстратом. Інкубація субстрату в лунках з іммобілізованим кон'югатом призводить до розвитку кольорової реакції. Цю реакцію можна зупинити на потрібній стадії, вираженість фарбування можна оцінити візуально або за оптичною щільністю.

Важливий етап будь-якого варіанту твердофазного аналізу - процедура відмивання від непов'язаних реагентів. Важливо не просто сполоснути фіксовані на твердій фазі компоненти, а видалити реагенти з усієї глибини шару. Це найбільш тривалі і трудомісткі етапи аналізу. Промивання проб може проводитися в автоматичному режимі за допомогою спеціального приладу - вошера або вручну, багатоканальною піпеткою.

### **Прямий ІФА.**

1. У лунках панелей адсорбують антигени або антитіла (досліджуваний матеріал). АГ істотно відрізняються за здатністю адсорбуватися на різних видах пластику в залежності від того, до якого класу речовин (білків, вуглеводів або ліпопротеїнів) вони належать. Часто в прямому ІФА антиген, іммобілізований на твердій фазі, це клітини та інші корпускулярні антигени.

В якості контролю використовують лунки з адсорбованим позитивним контрольним зразком, в якому обов'язково міститься антиген, і негативним контрольним зразком, де свідомо не міститься досліджуваний антиген.

2. В лунки вносять мічені ферментом антитіла або антигени (кон'югат), інкубують. Зв'язування кон'югату з твердою фазою буде відбуватися лише у випадку комплементарності обох компонентів системи. Після інкубації лунки відмивають, видаляючи, таким чином, не зв'язану частину кон'югату.

3. Потім у лунки вносять субстрат, специфічний до ферменту, інкубують. Після досягнення оптимального рівня фарбування в лунках з позитивним контролем, ферментативну реакцію зупиняють.

5. Облік реакції. Спочатку результати реакції враховують візуально. Для більш точного обліку результатів інтенсивність фарбування оцінюють на ІФА-рідері з відповідним світлофільтром. За результатами проведеного аналізу будують графік залежності оптичної щільності від концентрації.

**Непрямий ІФА.** Цей варіант ІФА використовують зазвичай для виявлення специфічних антитіл. У лунках панелей адсорбують стандартний антиген і інкубують з зразками сироватки або іншого біологічного матеріалу, отриманого від хворого (спинномозкова рідина, слина та ін.) Специфічні антитіла, що зв'язалося з антигеном на твердій фазі, виявляють за допомогою антиглобулінового кон'югату (рис. 3).



Рис. 3. Схематичне зображення непрямого ІФА

Реакція методично проста. Основні етапи непрямого ІФА для визначення антитіл:

1) Антиген адсорбують на твердій фазі, потім відмивають від незв'язаних компонентів.

2) Блокують вільні місця зв'язування. Відмивають.

3) В лунки вносять досліджуваний матеріал, інкубують і потім проводять процедуру відмивання. Паралельно ставлять проби з позитивним і негативним контролюми.

4. Додають антиглобулінової кон'югат, інкубують, відмивають від незв'язаних компонентів.

5. Вносять субстрат, інкубують. Після досягнення оптимального рівня фарбування в лунках з позитивним контролем реакцію зупиняють.

6. Вимірюють кількість продукту реакції на ІФА-рідері.

За оптимальних умов проведення аналізу цей метод високоспецифічний і чутливий. Він дозволяє виявляти нанограмові кількості антитіл у сироватках досліджуваних хворих.

#### **«Сендвіч» - варіант ІФА для виявлення антигенів.**

Антигени, що визначаються за допомогою даного варіанту ІФА, повинні мати кілька епітопів, здатних зв'язувати антитіла. При проведенні цього варіанту ІФА високоспецифічні полі- або моноклональні АТ, адсорбовані на твердій фазі, інкубують з досліджуваним зразком. Після процедури відмивання в лунки вносять мічені ферментом антитіла (кон'югат) до того ж антигену і далі проводять всі інші етапи реакції (рис. 4).

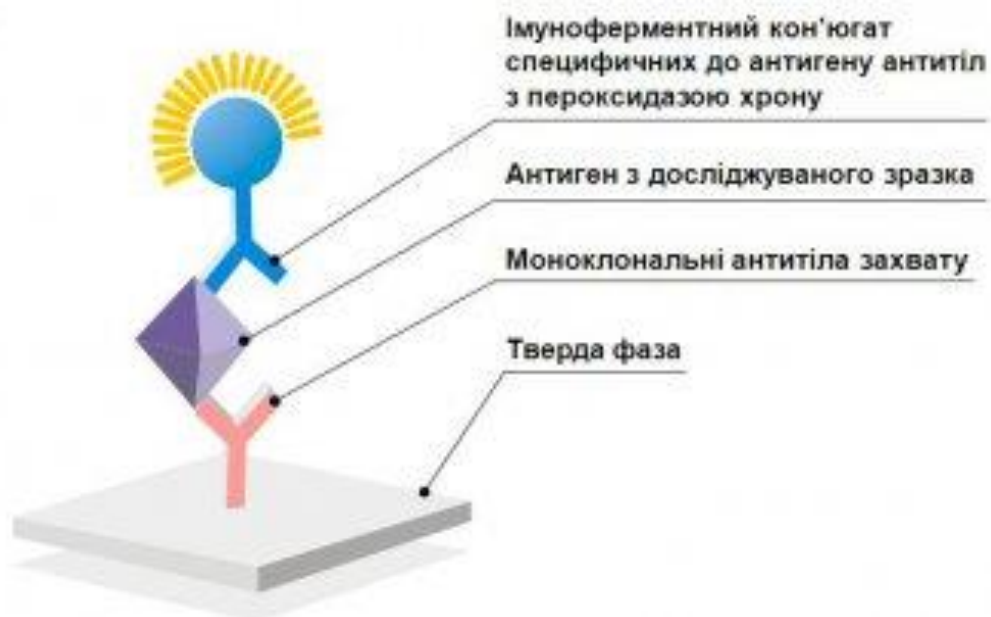


Рис. 4. Схематичне зображення сендвіч-ІФА.



Основні етапи аналізу:

1. На твердій фазі мобілізують АТ.

2. У лунки панелі вносять досліджуваний зразок, паралельно ставлять позитивний контрольний зразок і негативний контрольний зразок у різних розведеннях. Інкують і відмивають.

3. В лунки вносять мічені ферментом АТ - кон'югат. Після інкубації проводять відмивання.

4. Вносять субстрат, інкують. Реакцію зупиняють при досягненні оптимального фарбування в лунках з позитивним контролем.

5. Облік результатів здійснюють на ІФА-рідері.

Основною перевагою методу є висока чутливість, що перевершує можливості інших схем ІФА.

**Конкурентний ІФА.** Цей варіант аналізу заснований на конкуренції мічених (кон'югат) і немічених (досліджуваних) антитіл за зв'язування з антигеном, адсорбованим на твердій фазі. Кількість ферменту, який приєднався до твердої фази, зменшиться пропорційно вмісту в суміші вільних антитіл. Для визначення антигену використовується той же варіант, але в цьому випадку досліджуваний антиген конкурує з міченим, стандартним антигеном за зв'язування з антитілами, іммобілізованими на поверхні твердої фази.

Конкурентний метод вимагає мінімальної кількості операцій, незначних витрат реагентів і легко може побут автоматизований. Цей варіант ІФА застосовується для визначення різних сполук, таких як імуноглобуліни людини, раково-ембріональний антиген, інсулін та ін. Він дозволяє виявляти антитіла до діагностично значимих епітопів інфекційних агентів.

Основні етапи аналізу для виявлення антигену:

1. На твердій фазі мобілізують специфічні для досліджуваного антигена моноклональні антитіла.

2. У лунки панелей вносять у відомій концентрації антиген, мічений ферментом, і досліджуваний зразок. Проводять інкубацію та відмивання. Паралельно в сусідніх лунках ставлять позитивний і негативний контролю.

3. Додають субстрат, інкубують, зупиняють реакцію при розвитку оптимального фарбування в лунках з позитивним контролем.

4. Облік реакції здійснюють на ІФА-рідері. У цьому випадку кількість антигену в досліджуваному зразку обернено пропорційна ферментативній активності на твердій фазі.

**Інгібіторний ІФА.** У цьому варіанті ІФА антиген, присутній в досліджуваному зразку, зв'язується з моноклональними антитілами, міченими ферментної міткою, та інгібує їх взаємодію зі стандартним антигеном, іммобілізованим на твердій фазі. Присутність у зразку навіть слідових кількостей специфічного до кон'югату антигену буде пригнічувати зв'язування мічених антитіл з іммобілізованим антигеном. Ступінь інгібування прямо пропорційна вмісту антигену у розчині.

Концентрація досліджуваного антигену обернено пропорційна ферментативній активності на твердій фазі. ІФА може використовуватися не тільки для визначення розчинного антигену чи антитіла, але і клітин, що виробляють різні білки.

**Завдання 1.** Ознайомтесь з основними методами імунологічних досліджень. Складіть схему, яка відображала б основний принцип ІФА.

**Завдання 2.** Ознайомтесь з основними видами ІФА, компонентами, які використовуються в ІФА.

**Завдання 3.** Складіть схеми прямого та непрямого ІФА, з'ясуйте відмінності цих методів дослідження.

**Завдання 4.** Схематично зобразіть сендвіч ІФА, конкурентний ІФА, інгібіторний ІФА, з'ясуйте відмінності цих методів дослідження.

**Сформуйте висновки до роботи**

## Практична робота 8

### Тема: РЕАКЦІЯ АГЛЮТИНАЦІЇ

**Мета:** з'ясувати особливості взаємодії антигенів з антитілами у реакції аглютинації; навчитись виконувати реакцію латексної аглютинації.

**Обладнання і метериали:** латексна суспензія; розчинник; позитивний контроль, який містить ревматоїдного фактору (РФ) більше 12 МОд/мл; негативний контроль, який містить РФ менше 12 Мод/мл; досліджувана сироватка крові; тестовий слайд; автоматичний дозатор фіксованого або варіабельного об'єму (10–100 мкл) з наконечниками; предметні скельця; палички для розмішування сироваток.

### Теоретичні відомості

У реакції аглютинації антигеном є бактеріальні клітини або еритроцити, перебіг реакції відбувається за наявності електролітів, проявляється утворенням видимого осаду – аглютиніну. Реакцію аглютинації можна ставити на склі (орієнтовна реакція та в пробірках (розгорнута реакція).

Реакція аглютинації є основним методом ідентифікації групових антигенів і скерованих проти них антитіл.

Аглютиніни – антитіла, що мають властивість спричиняти склеювання відповідних бактерій, еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, корпускулярних хімічних часточок з адсорбованими на них антигенами або антитілами з утворенням конгломератів (аглютинатів), видимих неозброєним оком.

Додавання відповідних імунних сироваток до зависі бактерій спричиняє їх аглютинацію і випадання в осад у вигляді пластівців або зерен. У реакції аглютинації беруть участь антитіла (аглютиніни) і корпускулярні антигени (аглютиногени); вони взаємодіють у певних кількісних співвідношеннях і за наявності електроліту (0,85 % розчин натрію хлориду).

Реакцію аглютинації використовують для ідентифікації виділених мікроорганізмів із застосуванням заздалегідь відомих аглютинуючих сироваток.

Для діагностики інфекційних захворювань застосовують також реакцію непрямої гемаглютинації РНГА (антиген, який використовується для

проведення РА з сироватками крові хворих, попередньо адсорбований на поверхні еритроцитів барана). Застосовують під час діагностики черевного, висипного тифів і паратифів, туберкульозу, токсоплазмозу та ін. (рис. 1).

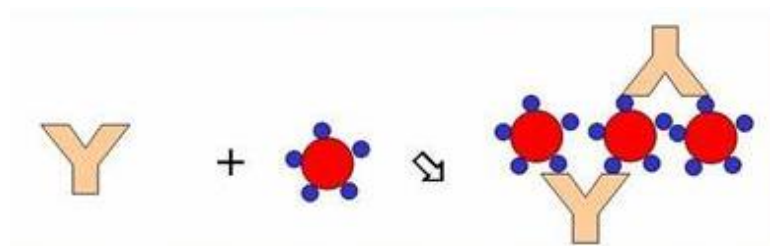


Рис. 1. Схематичне зображення реакції аглютинації. Антитіла сироватки хворого аглютинують антигени, які утворили розетки з еритроцитами барана, і результаті помітний видимий неозброєним оком аглютинат.

Для постановки коаглютинації (КОА) використовують золотисті стафілококи (штам Cowan 1). У клітинній стінці цих мікроорганізмів міститься білок А, який має значну спорідненість до Fc фрагмента IgG людини і кролика. Тому молекули IgG після адсорбції на стафілококах, що мають білок А, орієнтовані в оточуюче середовище своїми вільними Fab фрагментами, в яких знаходиться активний центр антитіла.

Реакцію ставлять на скляних пластинках, змішуючи рівні об'єми (1-2 краплі) досліджуваного матеріала (кров, сеча, слина, фільтрати фекалій та інш.) і стафілококового діагностичного сумішу. Суміш ретельно перемішують і через 2-5 хв на темному фоні враховують результати. На темному фоні повинна чітко буде проглядатись дрібнозерниста аглютинація стафілококів (рис. 2).

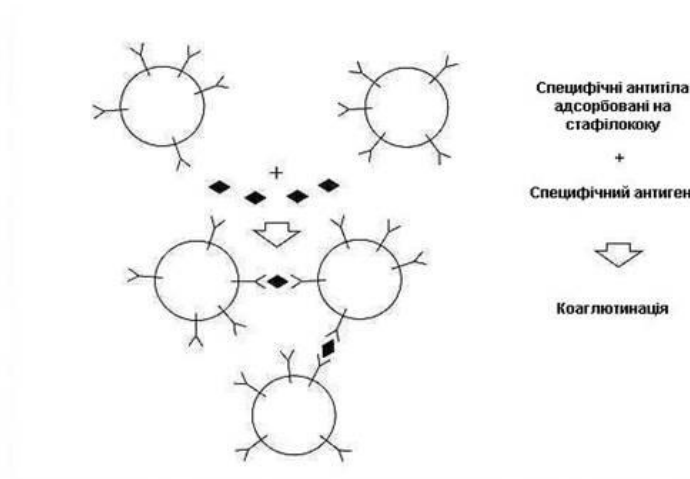


Рис. 2. Схематичне зображення реакції коаглютинації

## Хід роботи

### Робота 1. Дослідження особливостей проведення реакції аглютинації

**Завдання 1.** Проаналізуйте рис. 3. Які відмінності у реакціях, зображених праворуч та ліворуч? У яких випадках доцільно застосовувати кожен із видів реакції?

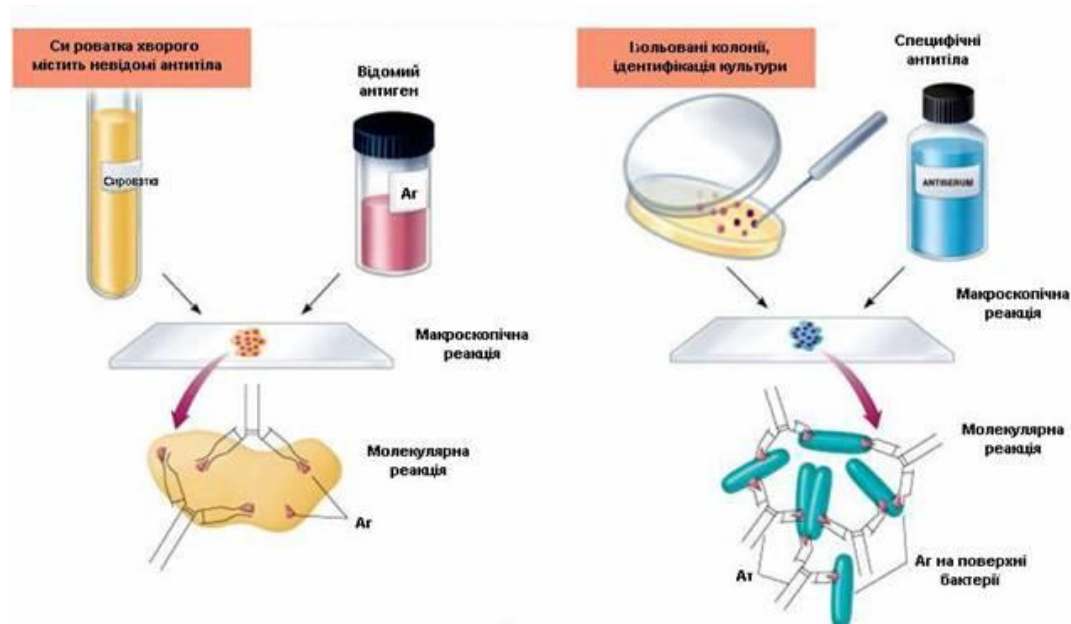


Рис. 3. Схематичне зображення реакції аглютинації

**Завдання 2.** Перегляньте відеозапис реакції Хеддельсона. Встановіть, який це тип реакції. Письмово визначте основні етапи реакції.

### Робота 2. Реакція латексної аглютинації для напівкількісного визначення ревматоїдного фактора в сироватці крові людини

У даному діагностичному використується принцип латексної аглютинації. Антиген, що адсорбований на нейтральних частинках латексу, вступає в реакцію аглютинації з ревматоїдним фактором (IgM проти Fc-фрагменту IgG). Інтенсивність реакції аглютинації прямо пропорційна кількості ревматоїдного фактору. Підвищення РФ характерне для ревматоїдного артриту (до 90% хворих); у нижчих титрах може спостерігатись під час інфекційного мононуклеозу, гострих запальних реакцій (бактеріального ендокардиту, сифілісу, туберкульозу, грипу і т.д.).

Підготовка реагентів: перед використанням всі реагенти необхідно витраматити за кімнатної температури протягом 30 хв. Латексну суспензію слід перемішати перед використанням шляхом легкого струшування (рис. 4).



Рис. 4. Підготовка обладнання та реагентів для виконання латексної аглютинації

Техніка проведення дослідження: за допомогою розчинника приготувати розведення досліджуваної сироватки – 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 і т.д. На тестовий слайд нанести послідовно по 10 мкл позитивного контролю, негативного контролю, досліджуваної сироватки. Після цього додати по 10 мкл латексної суспензії в кожену краплю позитивного та негативного контролів та досліджуваного матеріалу, перемішати скліною паличкою. Похитувати пластину протягом 3 хв. Оцінити результати дослідження (рис. 5, 6).

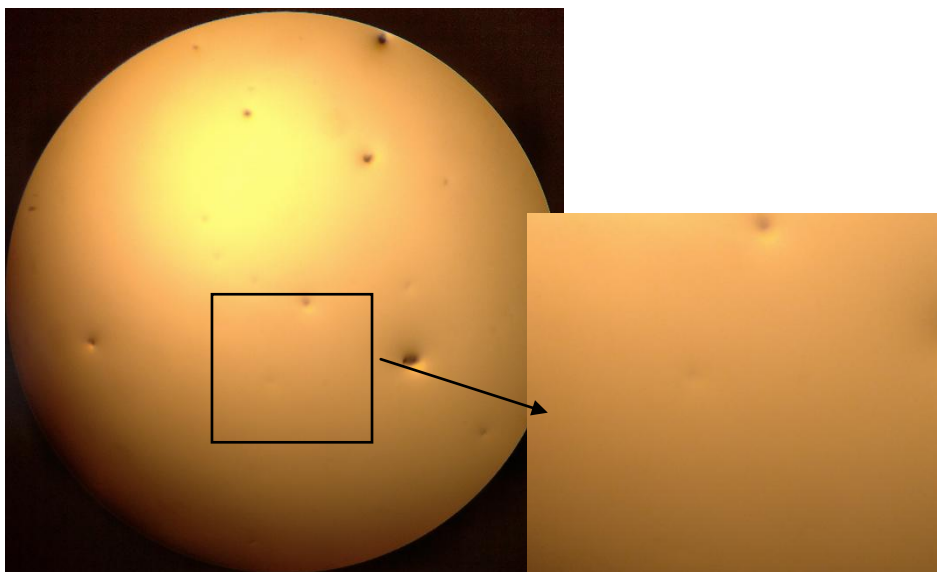


Рис 5. Відсутність аглютинації, немає аглютинованих часточок латексу (мале збільшення)

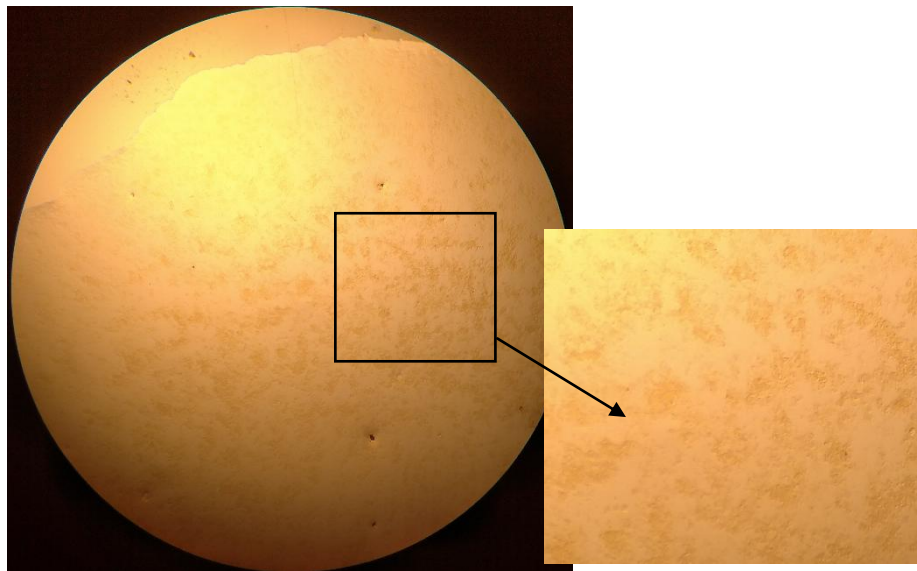


Рис 6. Аглотинація часточок латексу (мале збільшення)

### **Як зрозуміти результат**

Аглотинацію, яка відбулась після 3 хвилин, розуміють як неспецифічну. Реакцію вважають позитивною, коли спостерігається аглютинація частин латексу. Величину реакції оцінюють в «плюсах»: 4 плюси – всі частини аглютиновані, розчин прозорий; 3 плюси – 75% частин аглютиновані, розчин прозорий по краю; 2 плюси – половина частин аглютиновані, розчин трохи каламутний; 1 плюс – слабка аглютинація, розчин каламутний. При кількісному визначенні оцінку проводять згідно з останнім титром сироватки, який дав позитивний результат. Для визначення кількості ревматоїдного фактора в Мод/мл в пробі, необхідно найбільше розведення сироватки, що дало видиму аглютинацію, помножити на 12 Мод/мл. Наприклад, якщо аглютинація спостерегалась в титрі досліджуваної сироватки 1:20, то необхідно  $20 \times 12 = 240$  МОд/мл. Нормальною величиною є показник до 12 МОд/мл.

**Завдання 3.** Виконайте реакцію латексної аглютинації. Встановіть наявність/відсутність антитіл у досліджуваній сироватці. У випадку позитивного результату, встановіть кількість ревматоїдного фактора в МОд/мл.

### **Сформуйте висновки до роботи**

## Практична робота 9

### Тема: РЕАКЦІЯ ПРЕЦИПІТАЦІЇ

**Мета:** з'ясувати особливості взаємодії антигенів з антитілами у реакціях преципітації

#### Теоретичні відомості

Реакція преципітації (РП) – взаємодія розчинного антигену (преципітиногену) й антитіла (преципітину) в присутності електроліту (0,85 % розчин натрію хлориду). РП відрізняється від аглютинації за характером антигенів: в реакції аглютинації вони корпускулярні, навіть цілі клітини, а в реакції преципітації – молекулярні, в розчинному стані. Антигенами можуть бути екстракти мікроорганізмів, тканин, органів, хімічні речовини.

У реакції преципітації антигеном є окремі молекули (білки, полісахариди, вони можуть бути як повними антигенами, так і гаптенами). Перебіг реакції відбувається за наявності електролітів. На нерозведену сироватку в пробірці нашаровують розведений антиген. Якщо антиген і антитіло відповідають один одному, то через кілька хвилин з'являється осад у вигляді каламутного кільця (кільця преципітації). Реакцію застосовують для діагностики менінгіту, збудника сибірки, для виявлення фальсифікації харчових продуктів. Реакцію преципітації можна ставити в гелі для виявлення токсикогенності збудників дифтерії. В судово-медичній експертизі її застосовують для визначення видової належності крові. За допомогою специфічних преципітуючих сироваток проти білка людини, різних тварин і птахів можна встановити, якому виду належить виявлена кров.

Реакція флокуляції є різновидом преципітації у рідкому середовищі. Використовується для виміру сили токсинів і анатоксинів бактерій, зокрема дифтерійного анатоксина. Для визначення специфічності взаємодії антигена і антитіла змішують у пробірках однакові об'єми цільної (або розведеної у 2 рази сироватки) і розведеного фізіологічним розчином антигена. В процесі інкубації при 45 °С спостерігають, в якій пробірці раніше утворилися ніжні пластівці (ініціальна флокуляція). Кількість антитоксичних одиниць сироватки у пробірці з ініціальною флокуляцією відповідає кількості одиниць



анатоксина. Реакцію можна урахувати точніше за допомогою вимірювання мутності реакційної суміші на фотоелектроколориметрі.

Кільцепреципітація – якісна реакція преципітації. Проводиться у спеціальних тонких преципітаційних пробірках, куди спочатку наливають нерозведену преципітуючу сироватку, а зверху на неї нашаровують розчин антигена у зростаючих розведеннях, не допускаючи змішування двох шарів. При позитивній реакції через декілька хвилин на межі розділу шарів сироватки і антигена з'являється чітке кільце білуватого кольору – преципітат. На відміну від аглютинації титр преципітуючої сироватки визначається по титру антигена, тобто по тій найменшій кількості антигена, яка ще дає преципітат. Реакція кільцепреципітації дуже чутлива і специфічна і дозволяє виявляти антигени, розведені у тисячі і навіть мільйони разів. Кільцепреципітація використовується для визначення збудників хвороб по наявності певних антигенів, а також для визначення видової приналежності крові тварин за допомогою людських, курячих та інших сироваток.

Реакція термопреципітації Асколі – різновид реакції кільцепреципітації. Вона базується на тому, що преципітиногени проявляють значну стійкість до високої температури, витримують довготривале кип'ятіння, зберігаючи при цьому здатність реагувати з антитілами. Реакція термопреципітації Асколі використовується в основному для діагностики сибірської виразки (сибірки).

Реакції преципітації в гелі проводяться на щільних середовищах – на 1% агарі чи агарозі у чашках Петрі або на скляних пластинках. Вперше цей метод запропонував Дж. Оудін ще у 1946 р., встановивши, що антитіла сироваток можуть здійснювати дифузію в гелі та зв'язуватись прямо в ньому з антигенами. Іншими вченими були запропоновані модифікації методу преципітації в гелі. Деякі з них ми розглянемо нижче.

Зустрічна двомірна дифузія (метод Оухтерлоні) дозволяє аналізувати не одну пару «антиген – антитіло», а складні суміші мікробних антигенів і різних білків сироватки. На чашках Петрі з агаром роблять невеличкі (діаметром 5-6 мм) лунки: одна – в центрі, інші – по периметру, на відстані 1-2 см від центральної. В центральну лунку вносять антиген, а в інші – різні сироватки (або навпаки). Антигени і антитіла здійснюють дифузію у гель і починають рухатись назустріч один одному. Через 1-3 доби інкубації при кімнатній

температурі в місцях, де зустрічаються специфічні антиген і антитіло, в гелі утворюються білуваті дугоподібні смужки – лінії преципітації. Якщо лінії преципітації з'являються біля декількох лунок, то в досліджуваному матеріалі є декілька компонентів, що вступають в реакцію.

Проста радіальна імунодифузія (метод Манчині) використовується в лабораторній практиці для визначення концентрації імуноглобулінів (IgM, IgG, IgA) у сироватках людей. Радіальна імунодифузія проводиться у гелі на спеціальних скляних або полістиролових пластинах. Постановка реакції передбачає наявність стандартної сироватки з відомою концентрацією імуноглобулінів (для побудовання калібровочної кривої), а також моноспецифічних антисироваток проти IgM, IgG, IgA (для виявлення Ig у сироватці хворого). Антисироватку отримують шляхом імунізації тварини людськими імуноглобулінами певного класу (M, G чи A). Далі здійснюють очистку тваринної сироватки до такого стану, коли в ній залишаться антитіла тільки одного виду (наприклад, проти людських IgM).

Для постановки реакції завчасно готують гель на основі освітленого 1% агара (або агарози) з додаванням фізіологічного розчину (електроліта) і мертіолята (консерванта). У розплавлений гель при температурі 48<sup>0</sup>С вносять моноспецифічні антисироватки: в одну пробірку – антисироватку проти IgM, в другу – IgG, в третю – IgA. Кожний варіант гелю наносять на окрему спеціальну пластину і підписують її. Після застигання гелю в ньому роблять декілька горизонтальних рядів лунок з діаметром 2-3 мм. В них вносять по 20 мкл передчасно розведених проб досліджуваної сироватки хворого і стандартної сироватки. На одній пластині можна одночасно проаналізувати декілька сироваток хворих на наявність Ig певного класу. Пластини утримують у вологій камері при кімнатній температурі 48 годин. Завдяки дифузії в агар навколо лунок з'являються кільця преципітації з різним діаметром в залежності від розведення сироваток. Іноді для покращення візуалізації зон преципітації гелі профарбовують амідочорним. Після відмивки барвника преципітати набувають синього кольору. Вимірюють діаметр кілець зразків стандартної сироватки і для кожного виду Ig будують свою калібровочну криву, відкладаючи на осі абсцис концентрацію імуноглобуліна в пробі, а на осі ординат – квадрат діаметра зони преципітації. Вимірявши діаметри

преципітатів досліджуваної сироватки на трьох пластинах, можна визначити концентрацію імуноглобулінів трьох класів у даній сироватці.

Імуноелектрофорез – варіант імунопреципітації в гелі, в якому поєднані електрофорез і метод зустрічної дифузії Оухтерлоні. Цей метод дозволяє визначати склад багатокомпонентних сумішей розчинних антигенів (до 30 компонентів). Спочатку на агаровій пластині здійснюють розділення суміші антигенів в електричному полі. Потім у канавку, вирізану в гелі паралельно напрямку електрофоретичного розділення, наливають преципітуючу сироватку. В результаті уздовж канавки утворюються дугоподібні лінії преципітації. Кількість цих ліній відповідає кількості специфічних пар “антиген – антитіло”.

**Завдання 1.** Перегляньте відеофільм з постановкою реакції преципітації для виявлення видової приналежності крові. Зробіть короткий аналіз переглянутого; визначте, реакції яких видів представлені.

**Завдання 2.** Проаналізуйте схематичне зображення двох варіантів реакції преципітації, поясніть відмінності (рис. 1).

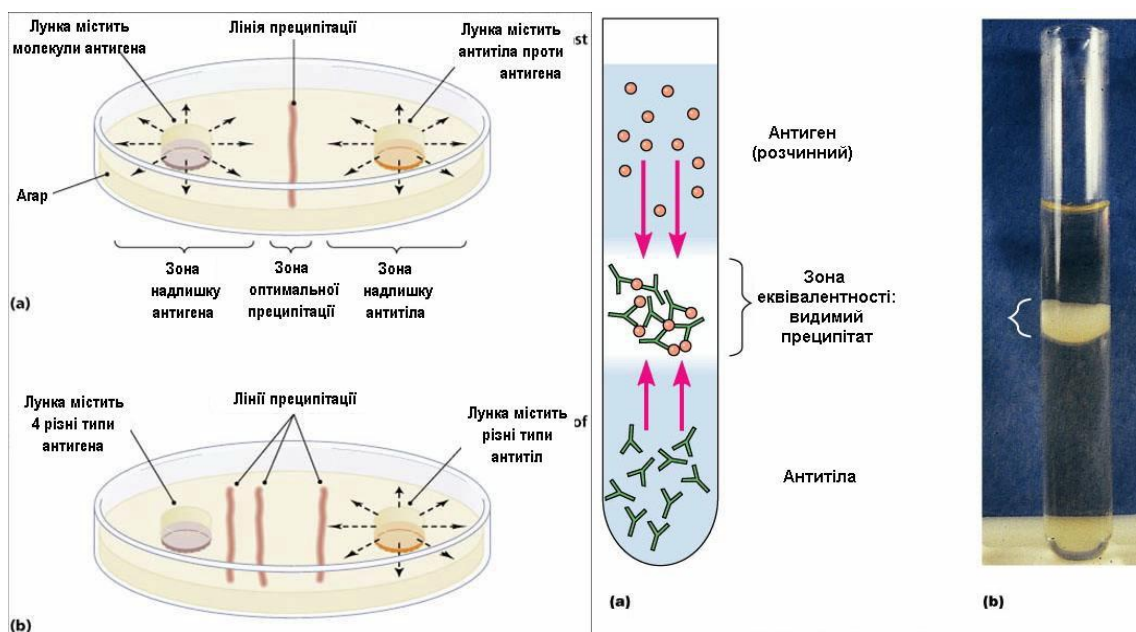


Рис. 1. Схематичне зображення двох варіантів реакції преципітації  
**Сформуйте висновки до роботи**

## Тема: ВИЗНАЧЕННЯ ОКРЕМИХ СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ

**Мета:** ознайомитись з методами визначення окремих субпопуляцій лімфоцитів

**Обладнання і матеріали:** гепаринізована кров, фосфатний буфер, середовище №199, термостат, еритроцитарні діагностикуми «Анти-CD3», «Анти-CD4», «Анти-CD8», «Анти-CD22», «Анти-CD16», 0,12% розчин глютарового альдегіду, фарба Романовського-Гімза, центрифуга, пробірки (10 мл), автоматичні дозатори (20–200 мкл), лабораторний посуд, мікроскоп.

### Теоретичні відомості

Лімфоцити - це єдині клітини організму, які здатні специфічно розпізнавати і розрізняти різні антигени і відповідати активацією на контакт з певним антигеном. Вони діляться на дві популяції, що мають різні функції і продукують різні білки.

**В-лімфоцити** – клітини з маркером CD20, який представлений на всіх стадіях їх розвитку. У людини В-лімфоцити дозрівають в кістковому мозку. В-лімфоцити розпізнають антигени специфічними рецепторами імуноглобулінової природи (CD19-22), які у міру дозрівання експресуються на їх мембранах. Взаємодія антигену з такими рецепторами є сигналом активації В-лімфоцитів та їх антигензалежного диференціювання в плазматичні клітини, що активно продукують і секретують специфічні для даного антигену антитіла - імуноглобуліни. При дозріванні В-лімфоцити змінюють клас імуноглобулінів, які синтезуються ними. Спочатку В-лімфоцити синтезують імуноглобуліни класу М (IgM), при дозріванні 10 % В-лімфоцитів продовжують синтезувати IgM, 70 % перемикаються на синтез IgG, а 20 % - на синтез IgA. Наступна експресія поверхневого IgD означає, що клітина готова до стимуляції антигеном. Деякі клітини, таким чином, несуть поверхневі Ig трьох різних класів: М, G і D або М, А і D, але усі молекули Ig на одній клітині мають однаковий ідіотип і, отже, кодуються одними і тими ж генами V(H) і V(L). Окрім молекул рецепторного комплексу на поверхні В-клітин експресуються молекули гістосумісності МНС II класу, оскільки В-лімфоцити є антиген-презентуючими клітинами. В-лімфоцити складаються з декількох субпопуляцій:

✓ В1-лімфоцити попередники плазмоцитів, несуть на мембрані диференційований антиген CD5+, синтезують антитіла IgM після контакту з антигеном без взаємодії з Т-лімфоцитами;

✓ В2-лімфоцити попередники плазмоцитів, проходять диференціювання в кістковому мозку від стовбурової клітини до попередників В-лімфоцитів під впливом ростових чинників, інтерлейкінів (IL-1, 4, 6), синтезують імуноглобуліни усіх класів після контакту з антигеном у відповідь на взаємодію з Т-хелперами. Ці клітини забезпечують гуморальний імунітет на антигени, які розпізнаються Т-хелперами;

✓ В3-лімфоцити (К-клітини), або В-кілери, вбивають клітини-антигени, покриті антитілами. Відносяться до великих гранулярних лімфоцитів, здатних розпізнавати (як і Т-клітини) зміни клітинної поверхні, які виникають при злоякісному переродженні чи вірусній інфекції. Крім того, на відміну від цитотоксичних Т-лімфоцитів, вони ефективно розпізнають клітини, поверхня яких не має молекул МНС або частково їх втратила;

✓ В-супресори, гальмують функцію Т-хелперів;

✓ В-лімфоцити пам'яті, зберігають і передають пам'ять про антигени, активно синтезують певні імуноглобуліни при повторній зустрічі з антигеном.

Особливістю В-лімфоцитів є те, що вони спеціалізуються на конкретних антигенах. При реакції В-лімфоцитів з антигеном, що зустрічається уперше, утворюються плазмоцити, які виділяють антитіла саме проти цього антигену. Утворюються клони В-лімфоцитів, відповідальні за реакцію з цим конкретним антигеном. При повторній реакції розмножуються і синтезують антитіла тільки В-лімфоцити, а точніше - плазмоцити, спрямовані проти цього антигену. Інші клони В-лімфоцитів не беруть участь в реакції.

В-лімфоцити безпосередньо не приймають участь в боротьбі з антигенами. Під впливом стимулів від фагоцитів і Т-хелперів вони трансформуються в плазмоцити, які і синтезують антитіла-імуноглобуліни, які знешкоджують антигени.

**Т-лімфоцити** отримали свою назву у зв'язку з їх диференціюванням у тимусі. За функціями серед Т-лімфоцитів розрізняють ефекторні (CD8 цитотоксичні лімфоцити – CTL, Т-кілери) і регуляторні (CD4+ Т-хелпери-Th) субпопуляції. Т-хелпери стимулюють проліферацію і диференціювання

цитотоксичних лімфоцитів, В-клітин і утворення антитіл. Тобто, Т-хелпери мають хелперну функцію (стимулюють В-лімфоцити для продукції імуноглобулінів) та індукторну функцію (стимулюють проліферацію і диференціювання цитотоксичних лімфоцитів, що відповідають на розчинні антигени проліферацією і продукцією лімфокінів).

Існує дві субпопуляції CD4+ Т-хелперів - Т-хелпери 1 і 2 типів, що не мають відмінностей за антигенною структурою, але розрізняються за набором (профілем) цитокінів, які вони здатні синтезувати у відповідь на антигенну стимуляцію, і від цього профілю залежить, який з двох основних типів імунної відповіді буде реалізований (клітинний або гуморальний).

Т-хелпери 1 типу (Th1) є активаторами клітинного імунітету, натуральних кілерів і моноцитів. Якщо наївна Т-клітина розпізнає антиген, що презентується макрофагом, то вона трансформується в Т-хелпер 1 типу. На цій клітині з'являються маркери диференціювання CD25 та CD45RB. Функція таких клітин - посилення активності макрофагів, спрямованої на знищення захопленого антигену, або приведення його в імуногенну форму. Продукуючи інтерлейкіни-2, 3, 12, ІФН- $\gamma$  і ФНП- $\beta$ , ГМ-КСФ, вони викликають активацію цитотоксичних Т-лімфоцитів, натуральних кілерів, макрофагів та Т-ефектори гіперчутливості уповільненого типу. Th1 забезпечують імунітет проти вірусів, внутріклітинних бактерій і онкогенних клітин. Активність Th1 пригнічує інтерлейкін-10.

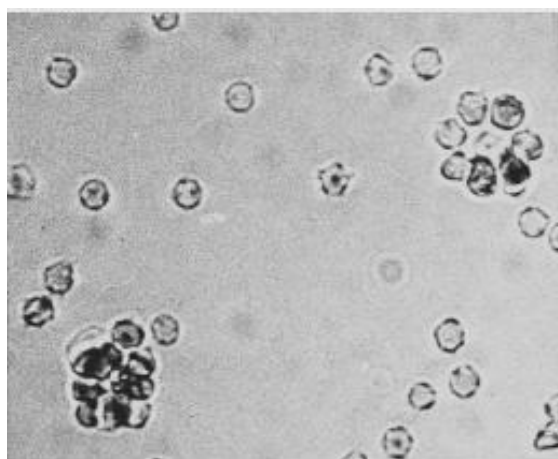
Т-хелпери 2 типу (Th2) відповідають за кооперацію з В-клітинами. Якщо Т-клітина розпізнає антиген, що розміщений на поверхні В-лімфоцитів, то це розпізнавання є сигналом до трансформації в Т-хелпери 2 типу, які забезпечують посилення продукції антитіл. На цій клітині з'являються маркери диференціювання CD25 та CD45RB. Продукуючи інтерлейкіни 4, 5, 6, 10 та 13, вони активують гуморальну імунну відповідь, В-лімфоцити й алергічне запалення. Стимулюючи продукцію плазматичними клітинами імуноглобулінів IgM, IgG4 і IgA, Th2 забезпечують імунітет проти звичайних (позаклітинних) бактерій і їх токсинів. Активація еозинофілів, тучних клітин і стимуляція синтезу імуноглобуліну Е (IgE) веде до розвитку алергії. Активність Th2 пригнічує ІФН- $\gamma$ .

T-лімфоцити, що несуть на своїй поверхні антигени CD8, мають супресорну (щодо В-лімфоцитів і продукції ними імуноглобулінів) і цитотоксичну активність. CD8 T-супресори гальмують розвиток імунної відповіді як на власні, так і на чужі антигени, забезпечуючи імунологічну толерантність.

Цитотоксичні CD8 T-лімфоцити (CD8+ CTL, Т-кілери) - це ефектори клітинної імунної відповіді, що забезпечують руйнування чужорідних клітин. Особливістю Т-клітинного рецептору є здатність розпізнавати чужорідний антиген тільки в комплексі з власними клітинними антигенами на поверхні допоміжних антиген-презентувальних клітин (дендритних або макрофагів). На відміну від В-лімфоцитів, здатних розпізнавати антигени в розчині і зв'язувати білкові, полісахаридні і ліпопротеїдні розчинні антигени, Т-лімфоцити можуть розпізнати тільки короткі пептидні фрагменти білкових антигенів, представлені на мембрані інших клітин в комплексі з власними антигенами головного комплексу гістосумісності. CD4 Т-лімфоцити здатні розпізнавати антигенні пептиди в комплексі з антигенами гістосумісності МНС II класу, а CD8 Т-лімфоцити здатні розпізнавати антигенні пептиди в комплексі з антигенами гістосумісності МНС I класу.

### **Робота 1. Визначення Т-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами барана**

Усі Т-лімфоцити мають рецептори до еритроцитів барана, тому за реакцією розеткоутворення (приєднання не менше трьох еритроцитів до одного Т-лімфоцита) визначають частку цих клітин у суспензії лімфоцитів (рис. 1).



## Рис. 1. Реакція розеткоутворення з еритроцитами барана

Для постановки реакції розеткоутворення потрібно взяти 3-6 мл гепаринізованої крові, додати таку ж кількість фосфатного буферу. Склад фосфатного буферу:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,15 г),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,2 г),  $\text{KCl}$  (0,2 г),  $\text{NaCl}$  (8 г) на 1 л дистильованої води. Лімфоцити виділяються з гепаринізованої крові центрифугуванням в одноступеневому градієнті фікол-верографін (густина 1,077 г/мл). На свіжоприготований одноступеневий фікол-верографіновий градієнт (2 мл) у центрифужній пробірці нашаровується за допомогою піпетки з грушею кров, розбавлена ФСБ (фосфатним буфером). Методика виготовлення градієнту: 147 мг фіколу-400 розчиняється у теплій дистильованій воді. Змішується з 0,3 мл 76% розчину верографіну. Об'єм доводиться до 2 мл. Температура зберігання розчину  $+8^\circ\text{C}$ . Пробірки з нашарованою на градієнт кров'ю центрифугуються протягом 20–25 хв при 1500 об/хв. Піпеткою з грушею відбирається середній шар, що містить лімфоцити (каламутний, незабарвлений), в окремі пробірки.

З отриманих лімфоцитів готують суспензію на середовищі №199, вона повинна містити 2 млн лімфоцитів на 1 мл.

У пробірку вносять рівну кількість (по 0,1 або по 0,2 мл) суспензії лімфоцитів та 0,5% суспензії еритроцитів барана. Інкують в термостаті протягом 30 хв за температури  $37^\circ\text{C}$  і в холодильнику протягом 1 год.

Підрахунок клітин виконують в камері Горяєва. Підраховують 200 лімфоцитів, серед них визначають відсоток тих клітин, які утворили розетки з еритроцитами барана.

За результатами загального аналізу крові досліджуваного визначають абсолютну кількість Т-лімфоцитів у крові.

**Завдання 1.** Визначте абсолютну кількість Т-лімфоцитів у крові. За отриманими результатами зробіть висновки про стан клітинного імунітету досліджуваного.

**Робота 2.** Визначення В-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, навантаженими антитілами до еритроцитів та комплементом



Усі В-лімфоцити мають рецептори до С3-компонента комплексу. Тому для визначення В-лімфоцитів необхідно навантажити еритроцити барана специфічними антитілами до них та комплексом. Утворені на поверхні еритроцитів барана комплекси дозволяють В-лімфоцитам взаємодіяти з еритроцитами барана.

Готують 5% суспензію еритроцитів барана. Еритроцити навантажують антитілами, для цього використовують гемолітичну сироватку в субгемолітичній дозі. Суміші лімфоцитів та навантажених еритроцитів інкубують протягом 30 хв за температури 37 °С.

У здорової людини кількість В-лімфоцитів у периферичній крові складає 20-25% від загальної кількості лімфоцитів.

**Завдання 2.** Визначте абсолютну кількість В-лімфоцитів у крові. За отриманими результатами зробіть висновки про стан В-системи імунітету досліджуваного.

### **Робота 3. Визначення субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів з використанням еритроцитарних діагностиків «Анти-CD3», «Анти-CD4», «Анти-CD8», «Анти-CD22», «Анти-CD16»**

Принцип методу базується на визначенні субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла проти рецепторів CD3 (Т-лімфоцити), CD4 (Т-хелпери), CD8 (Т-супресори), CD19 або CD22 (В-лімфоцити), CD16 (натуральні кілери). Облік результатів дослідження проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою.

Для даного дослідження достатньо 3 мл крові з гепарином. Мононуклеарний завис (лімфоцити) одержують на градієнті щільності 1,077. Відмивають клітини 2-3 рази фізіологічним розчином або фосфатним буфером рН 7,2-7,4. Бажана концентрація клітин у зависі  $2 \times 10^6$ /мл (20 клітин у великому квадраті камери Горяєва).

Підготовка діагностикума. Погойдуванням флакона осад еритроцитів ресуспендують без піноутворення. Можливе ресуспендування стерильним шприцом ємністю 2 мл: голкою проколюють пробку, набирають суміш і випускають у флакон кілька разів (без піноутворення). Набирають шприцом

кількість, необхідну для роботи (на одну пробу 0,05мл) та переносять у стерильні пробірки.

Визначення... У пробірки вносять 0,05 мл (50 мкл) CD-діагностикума і додають 0,05 мл завису лімфоцитів. Інкують суміш 40 хв за температури 37 °С, центрифугують при 1000 об/хв протягом 5 хвилин, залишають на 1 годину у холодильнику за температури +4 °С. Після цього відбирають надосадову рідину. Додають до осаду 0,05 мл 0,12% розчину глютарового альдегіду й обережно ресуспензують (без утворення піни!). Витримують 5-7 хвилин, знову обережно ресуспензують. Роблять мазок приблизно на 1 см<sup>2</sup> площі знежиреного предметного скла, висушують, фіксують спиртом і зафарбовують фарбою по Романовському. За допомогою світлового мікроскопу з імерсійною системою підраховують відсоток розеткоутворюючих лімфоцитів, що зв'язують не менш 3-х еритроцитів із CD-діагностикумами на 200 клітин. Важливо не враховувати гранулоцити, агрегати клітин, а також лімфоцити, що потрапили в агрегати. Можна також підраховувати розеткоутворюючі лімфоцити в нативному препараті в камері Горяєва.

Слід зауважити, що мазки рекомендовано робити на добре обезжиреному спирт-ефіром склі в вигляді моношару. Запобігати утворенню нашарування клітин. Діагностикуми повинні зберігатися за температури від +2 до +10°С. Не допускати замороження.

### **Як зрозуміти результат**

Відсоток Т-лімфоцитів дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD3-діагностикумом. Норма для дорослих – 50-80% (середнє 60±5%); для дітей – 47-76% (середнє 55±4,8%).

*Абсолютна кількість у 1 мкл крові = А × У × С : 10000,*

де: А – кількість лейкоцитів у 1 мкл крові, У – відсоток лімфоцитів у формулі крові, С – відсоток розеткоутворюючих Т-лімфоцитів.

Відсоток Т-хелперів (Th) дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD4-діагностикумом. Норма – 33-46% (середнє 40±3,0%).

Відсоток Т-супресорів (Ts) дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD8-діагностикумом. Норма – 17-30% (середнє 22±1%).

Імуно-регуляторний індекс (показник CD4/CD8). Окрім визначення чисельності популяцій і субпопуляцій, важливе значення надається обчисленню показника CD4/CD8 - імуно-регуляторного індексу або хелперно-супресорного відношення (норма –  $1,8 \pm 0,4$ ). Зменшення імуно-регуляторного індексу спостерігається при вірусних інфекціях, у новонароджених і при пересадці кісткового мозку, а збільшення - при аутоімунних захворюваннях, алергії. IPI: Th/Ts = 1,4 – 2,0 (IPI – імунорегуляторний індекс, Th – Т-хелпери, Ts – Т-супресори).

Відсоток В-лімфоцитів дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD22-діагностикумом. Абсолютну кількість В-лімфоцитів визначають також як і Т-лімфоцитів. Норма – 17-31% (середнє  $23 \pm 3,6\%$ ).

Відсоток натуральних кілерів дорівнює відсотку лімфоцитів, що утворюють розетки із CD16-діагностикумом. Норма – 12-23% (середнє  $16 \pm 4,5\%$ ).

**Завдання 3.** Визначте відсоток клітин різних субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів за допомогою еритроцитарних діагностикумів, порівняйте отримані результати з нормою. Визначте та оцініть імуно-регуляторний індекс.

**Сформууйте висновки до роботи**

## Практична робота 11

### Тема: ВИЗНАЧЕННЯ ОСНОВНИХ КЛАСІВ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

**Мета:** ознайомитись з методами визначення основних класів імуноглобулінів

**Обладнання і матеріали:** досліджувана сироватка крові, анти-IgA-, анти-IgG-анти-IgM-глобулінова сироватка, стандартна сироватка крові донора, сухий агар-агар, скляні пластини 9×12 см,

### Теоретичні відомості

#### **Робота 1. Визначення загальної кількості імуноглобулінів основних класів методом радіальної імунодифузії в гелі (реакція Манчіні)**

В основі реакції лежить реакція преципітації в гелі. При цьому антигенами виступають антитіла сироватки крові досліджуваного, а антитілами – антиглобулінові антитіла кролика, імунізованого людськими імуноглобулінами одного з класів (антиглобулінова сироватка).

Вміст антитіл певного класу у досліджуваній сироватці визначається у порівнянні зі стандартною сироваткою крові донора із зазначеним вмістом імуноглобулінів кожного класу (мг/мл).

Із сухого агару готують гель, який ще теплим змішують з однією з моноспецифічних сироваток і заливають на скло. Для отримання суміші 3 %-го агару у 0,1 М веронал-медіналовому буфері з рН 8,6 змішують при 56 °С у співвідношенні 1:1 з антисироваткою, в якій концентрація антитіл вдвічі перевищує робочий титр (титр у реакції імуноної дифузії (РІД)), вказаний на ампулі.

Скляні пластини розміром 9×12 см покривають рівномірним шаром суміші агару з моноспецифічною антисироваткою. Для цього на пластину поміщають латунну П-подібну рамку завтовшки 1 мм, зверху поміщають другу скляну пластину, змочену гідрофобною рідиною; простір між пластинами заливають сумішшю агару і антисироватки об'ємом 9 мл.

Після застигання роблять два ряди лунок діаметром 2 мм. У перший ряд лунок наливають по 2 мкл стандартної сироватки в розведенні 0, 1:2, 1:4, 1:8 (для калібрувальної кривої). У лунки другого ряду наливають цільні сироватки досліджуваних. Оскільки визначають три класи імуноглобулінів, то таких

скелець потрібно теж три, для кожного класу - свій гель з антисироваткою та свій ряд стандартної сироватки для побудови калібрувальної кривої.

Пластини інкубують у вологій камері за температури 4 °С. Для визначення IgG та IgA протягом 24 год, для визначення IgM – протягом 48 год.

Після цього вимірюють діаметр кільця преципітації стандартної і досліджуваної сироваток, виміри проводять під лупою з дворазовим збільшенням на темному фоні при косому освітленні. Якщо коли діаметр кільця преципітації досліджуваних препаратів перевищує діаметр кільця преципітації нерозведеної контрольної сироватки, досліджувані матеріали необхідно розводити (рис. 1).

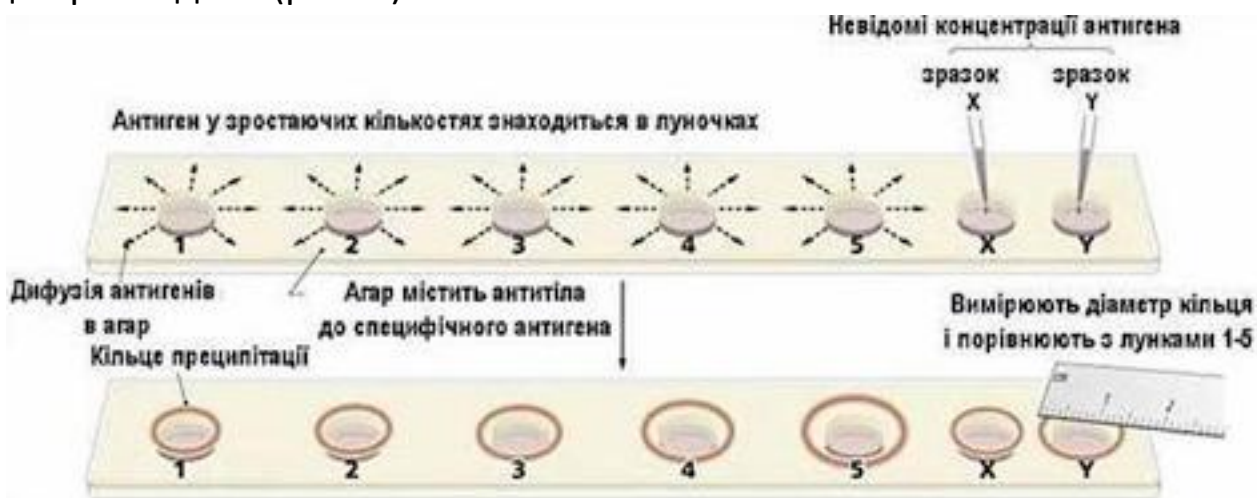


Рис. 1. Вимірювання діаметрів кільць преципітації

За результатами вимірювань стандартної сироватки креслять калібрувальні криві для кожного класу імуноглобулінів окремо, відкладаючи на осі абсцис (X) діаметри кільць преципітації в мм, а на осі ординат (Y) – кількість імуноглобулінів у мг/мл. Вміст кожного із класів імуноглобулінів у досліджуваній сироватці визначають за відповідною кривою.

У здорової людини концентрація IgG у сироватці крові складає 6-16 мг/мл, IgA – 0,5-1,8 мг/мл, IgM – 1-5 мг/мл.

**Завдання 1.** Визначити вміст імуноглобулінів G, A, M у досліджуваній сироватці крові за допомогою реакції Манчіні. Оцінити отримані результати.

**Сформуйте висновки до роботи**

**Тема: ВАКЦИНАЦІЯ. ОРГАНІЗАЦІЯ ПІДТРИМКИ ІМУНОПРОФІЛАКТИКИ В СУСПІЛЬСТВІ (ПІДГОТОВКА ПОЗАУРОЧНИХ ЗАХОДІВ ДЛЯ ПЕДАГОГІВ, ШКОЛЯРІВ ТА ЇХ БАТЬКІВ)**

**Мета:** ознайомитись з принципом дії, різновидами вакцин, графіком профілактичних щеплень, переліком обов'язкових та рекомендованих вакцин.

**Теоретичні відомості**

Термін «вакцина», який Пастер увів до річниці класичної роботи Дженнера з коров'ячою віспою, застосовується до всіх антигенів, що використовуються для індукції специфічного імунітету та ослаблення наслідків можливого в майбутньому інфікування. Вакцина вводиться дитині, як тільки її імунна система стає відповідати на антигени.

Види імунопрофілактики:

1) активна (вакцинація) – введення до організму відповідного антигену або антигенів мікроорганізму з метою стимулювання специфічної імунної відповіді (гуморальної та клітинної), яка захищає від інфікування або захворювання;

2) пасивна – парентеральне введення готових антитіл захисної дії;

3) активно-пасивна – поєднання вище вказаних методів;

4) передекспозиційна – проведена перед контактом із патогенним мікроорганізмом;

5) постекспозиційна – проведена після експозиції до інфекції неімунізованих осіб, у випадку хвороб із довшим інкубаційним періодом (напр., сказ, а у виняткових випадках також: правець, вірусні гепатити В або А, кір, вітряна віспа).

Вакцини бувають обов'язкові (для дітей та молоді або осіб, особливо наражених на ризик інфікування); лікар зобов'язаний передати кожному пацієнту, який відповідає критеріям, повну та вірогідну інформацію про можливості вакцинації (користь, ризик побічних реакцій, ризик, пов'язаний з відмовою від вакцинації) та безоплатне виконання вакцинації;

Рекомендовані – рекомендовані для конкретних груп пацієнтів; лікар зобов'язаний передати кожному пацієнту, який відповідає критеріям, повну інформацію про можливості вакцинації (користь, ризик побічних реакцій, ризик, пов'язаний з відмовою від вакцинації) та безоплатне виконання вакцинації, але вартість вакцини оплачується пацієнтом.

Живі гетеровакцини викликають легкі форми захворювання, перехресно захищають від більш важких форм. Найкращий приклад – вакцина проти коров'ячої віспи, що дозволила повністю знищити натуральну.

Живі ослаблені (атенуйовані) віруси кору, епідемічного паротиту, жовтої лихоманки, поліомієліту (вакцина Сейбіна), краснухи чи бактерії (БЦЖ) забезпечують субклінічне захворювання і ефективний захист. При імунізації хворих з імунодефіцитними станами необхідна максимальна обережність.

Убиті вакцини застосовують в тих випадках, коли їх ослаблення неможливо. Вони включають вбиті формаліном віруси (наприклад, сказу, грипу) або бактерії (наприклад, холери, коклюшу). Убиті вакцини безпечніше ослаблених, але менш ефективні. Деякі вбиті вакцини здатні виступати в ролі ад'ювантів для вакцин, що застосовуються одночасно з ними (наприклад, збудник кашлюку в потрійній вакцині зі збудниками дифтерії і правця).

Токсоїди (анатоксини) – інактивовані формаліном, але зі збереженою антигенністю бактеріальні токсини (наприклад, дифтерії і правця).

Капсульні полісахариди ефективно індукують синтез антитіл до менінгококових, пневмококових і гемофілійних інфекцій.

Вакцини з вірусних субодиниць, наприклад, з поверхневого антигену вірусів гепатиту В.

Синтетичні вакцини. Величезні зусилля спрямовуються на синтез чистих мікробних антигенів. Якщо хімічними методами або ДНК-рекомбінантною технологією така вакцина буде отримана, всі перераховані вище вакцини відійдуть на задній план.

ДНК, вектори. Вкрай цікава ідея вбудовувати гени одного мікроба іншому, менш вірулентному (наприклад, сальмонели або вірусу вісповакцини), який в цьому випадку поводить себе, як жива вакцина для бажаного антигену.

Поствакцинальні побічні реакції (ППР) – кожне порушення стану здоров'я у результаті вакцинації, яке виникає протягом 4 тиж. від моменту

введення вакцини (або довшого періоду після вакцинації проти туберкульозу), у зв'язку з дефектами у процесі виготовлення вакцини або порушення техніки під час проведення вакцинації, або через індивідуальну реакцію пацієнта на вакцину

1) тяжкі – смерть або загроза життю, стан, що потребує госпіталізації або подовжує її, тривале порушення здоров'я;

2) серйозні – досить інтенсивні, але не створюють потребу госпіталізації та не загрожують життю.

У більшості випадків порушень стану здоров'я після вакцинації (підозри на ППР) зв'язок є випадковим (збіг обставин), а не причинно-наслідковий.

Загальні протипокази до вакцинації

1. «Живі» вакцини (див. також конкретні протипокази для конкретних вакцин);

1) не вводять особам із вродженими або набутими порушеннями імунітету (особливо клітинного), також такими, що виникли внаслідок променевої терапії, хіміотерапії та імуносупресивної терапії (включаючи ГК у дозі еквівалентній  $>20$  мг/добу по преднізону протягом  $\geq 14$  днів – можна вакцинувати через  $>1$  місяць після закінчення терапії ГК); не є протипоказом до вакцинації використання місцевих препаратів ГК (нашкірно, інтраназально або інгаляційно, внутрішньосуглобово) або фізіологічних замісних доз ГК (напр., при недостатності кори надниркових залоз);

2) не вводять вагітним жінкам та за 1–3 міс. перед плануванням вагітності;

3) мінімальний проміжок між введенням наступної дози або інших «живих» вакцин становить 4 тиж. (під час одного візиту можна — за винятком хворих з імунодефіцитом — ввести кілька «живих» вакцин);

4) після вакцинації протягом  $\geq 2$  тиж. не вводять препаратів імуноглобуліну та препаратів крові, які містять імуноглобуліни, а якщо вони необхідні, то розглядають можливість повторної вакцинації через певний час (3–11 міс., залежно від препарату крові та дози) або оцінки концентрації специфічних антитіл (стосується вакцин проти кору, вітряної віспи та оперізуючого герпесу);



5) зберігають проміжок 3–11 міс. (залежно від препарату крові та дози) між введенням препаратів імуноглобуліну або крові та вакцин проти кору, вітряної віспи або оперізуючого герпесу.

2. Усі вакцини («живі» та «інактивовані»; див. також специфічні протипокази для конкретних вакцин)

1) абсолютні протипокази (тривалі):

а) системна анафілактична реакція (напр., шок, набряк гортані або симптоми анафілаксії з  $\geq 2$  систем) після стартової дози вакцини – протипоказ для подальшого введення цього препарату;

б) анафілактична реакція (як вище) на компоненти вакцини, напр. білок курячого яйця (грип, кліщовий енцефаліт, жовта гарячка), желатин (оперізуючий герпес і деякі вакцини проти кору, епідемічного паротиту, краснухи, вітряної віспи), неоміцин (кір, епідемічний паротит, краснуха, сказ, вітряна віспа, оперізуючий герпес, IPV, кліщовий енцефаліт), стрептоміцин або гентаміцин (IPV, кліщовий енцефаліт), або дріжджі (вакцини проти вірусного гепатиту В або 4-валентна проти HPV [*Human Papillomavirus*]) — протипоказ для введення цього препарату;

2) відності протипокази, тобто тимчасові, або ситуації, які потребують дотримання необхідної безпеки під час відбору (тобто обговорення із пацієнтом, чи користь від вакцинації переважає ризик можливих ППР): гостра хвороба з тяжким або середньотяжким перебігом (включаючи високу лихоманку; легка хвороба, напр., застуда, не є протипоказом до вакцинації); загострення хронічного захворювання (до зникнення симптомів загострення та стабілізації стану пацієнта); анафілактичний шок в анамнезі (після іншої вакцини або компоненту, який не входить у склад даної вакцини) – ризик розвитку системної анафілактичної реакції (включаючи шок) після вакцинації у таких осіб – вищий від середнього.

Кожний компонент вакцини може бути причиною системної (рідко, напр. білок курячого яйця або неоміцин) або місцевої (частіше; напр. тіомерсал, алюміній) алергічних реакцій у алергізованих осіб. Корки флаконів або елементи шприц-ампул деяких препаратів (вироблені із сухої натуральної гуми) містять латекс, небезпечний для осіб із алергією до цих компонентів.

**Завдання 1.** Ознайомитись з графіком індивідуальних щеплень за рекомендацією МОЗ. Вивчити власну медичну карту та з'ясувати, чи всі профілактичні щеплення ви отримали. Ознайомтесь з такими поняттями, як «планова вакцинація» та «постекспозиційна (екстрена, постконтактна) вакцинація», «вакцинація мандрівників» (рис. 1, 2).

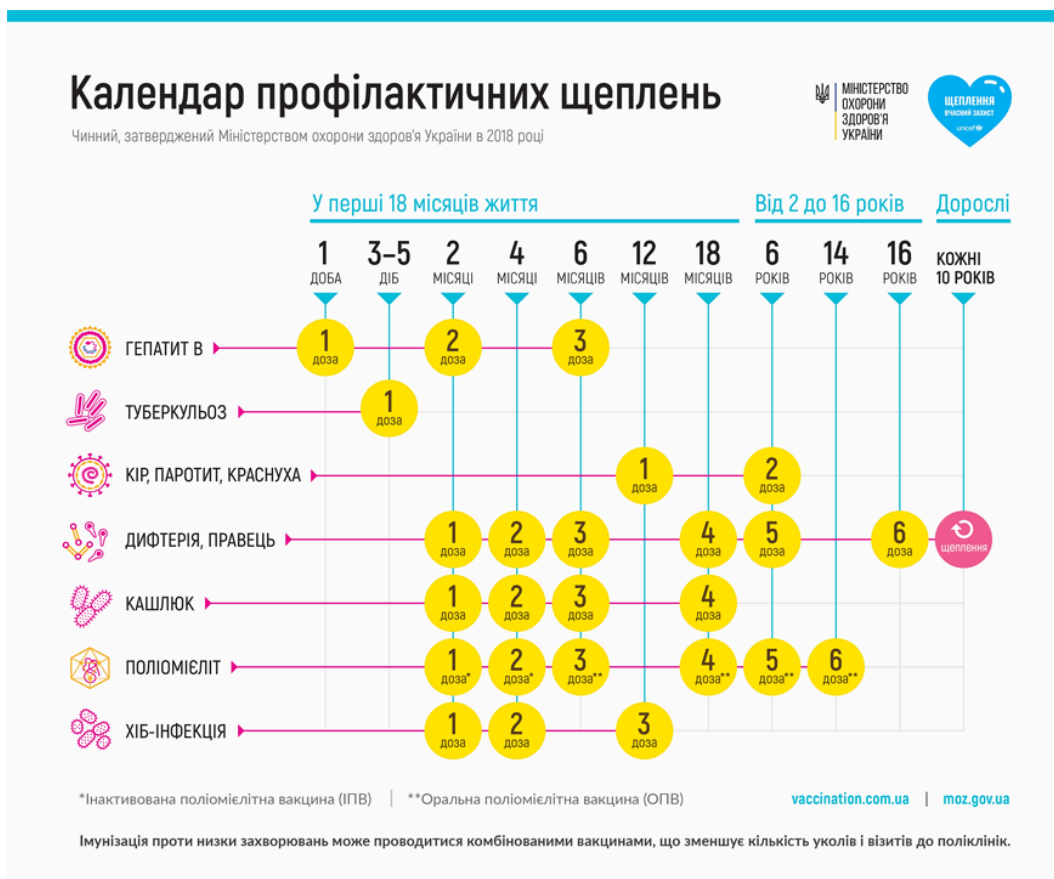


Рис. 1. Календар профілактичних щеплень, які фінансує держава

## ГРАФІК ПРОФІЛАКТИЧНИХ ЩЕПЛЕНЬ

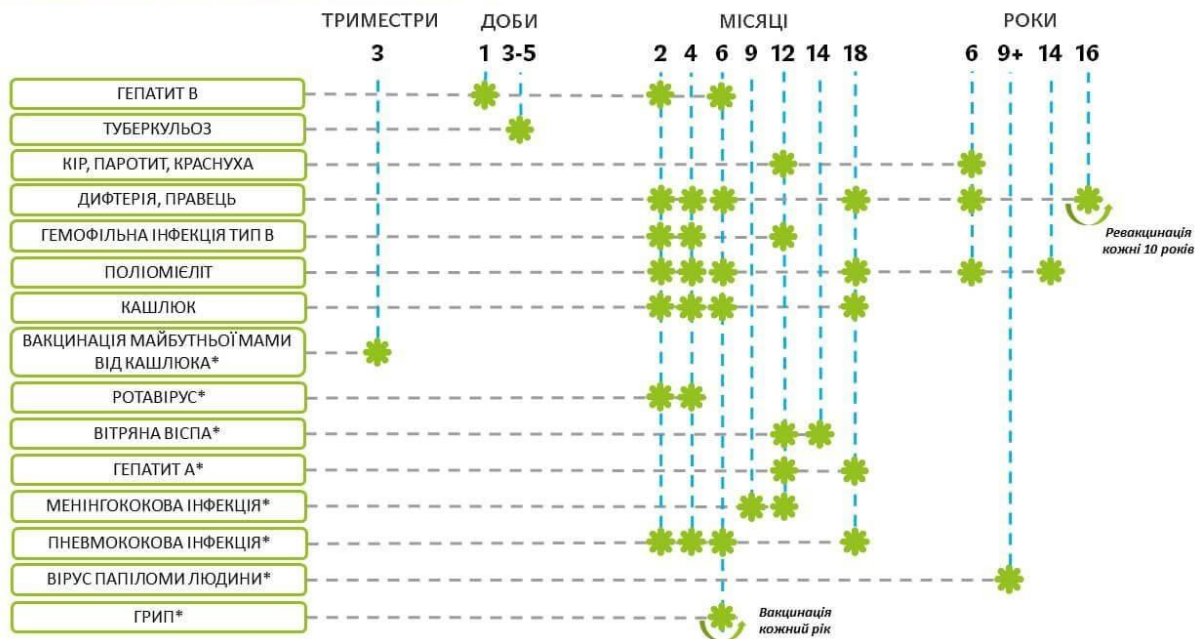


Рис. 2. Календар профілактичних щеплень, який містить ще й рекомендовані вакцини

**Завдання 2.** Ознайомитись з переліком обов'язкових та рекомендованих вакцин. Заповнити таблицю:

Захворювання	Назва вакцин	Вид вакцин	Рекомендований вік	Кількість необхідних ревакцинацій

В Україні Календар профілактичних щеплень передбачає вакцинацію проти 10 захворювань: туберкульозу, поліомієліту, дифтерії, кашлюка, правця, кору, гепатиту В, гемофільної інфекції, краснухи, епідемічного паротиту. За державні кошти МОЗ України закуповує

вакцини за Календарем і таким чином гарантує можливість українцям отримати безоплатні щеплення проти цих хвороб.

Також є рекомендовані щеплення, що не входять в обов'язковий перелік, але можуть захистити від небезпечних хвороб. Такі вакцини можна придбати за власний кошт в аптеці або зробити щеплення у приватній клініці.

### Вітряна віспа

Вітряна віспа є однією з найпоширеніших інфекцій у світі. Вірус передається повітряно-крапельним шляхом та є надзвичайно заразним.

Вітряну віспу ще називають «вірянкою». Захворювання зазвичай переноситься легко, проте можуть виникнути ускладнення. Більшість з них зумовлені приєднанням бактеріальної інфекції, наприклад, пневмонії. Також може виникнути ураження нервової системи та сепсис. Важкий перебіг хвороби та ускладнення частіше бувають у людей з ослабленим імунітетом, літніх, немовлят.

В багатьох країнах світу щеплення від вітряної віспи входить до переліку обов'язкових. В Україні вона рекомендована для тих, хто входить у групу ризику, а також жінкам, які планують вагітність та раніше не хворіли на вітряну віспу, оскільки вірус здатний проникнути через плаценту до плоду та викликати негативні наслідки. Для забезпечення раннього захисту від інфекції достатньо двох доз вакцини.

### Папіломавірус

Причиною 70% випадків раку шийки матки є папіломавірус. Папіломавірус передається під час статевого контакту, зокрема, контакту «шкіра до шкіри» в інтимних зонах. Більшість людей заражаються вірусом папіломи людини (ВПЛ) невдовзі після початку статевого життя. Інфікування відбувається безслідно, однак зумовлює зміни в клітинах слизової оболонки шийки матки, що може призвести до розвитку раку.

Попередити інфікування ВПЛ можна щепленням, що на 90% зменшує ймовірність новоутворень.

Вакцинацію краще робити до початку статевого життя. Рекомендований вік для імунізації проти папіломавірусу - 9–14 років.

Вакцини проти папіломавірусу застосовують у 84 країнах світу, наприклад, у США, Канаді та більшості країн ЄС. Близько 80 мільйонів людей вже вакцинуються проти папіломавірусу. Ефективність та безпечність вакцин проти ВПЛ підтверджено численними міжнародними дослідженнями.

Гепатит А — вірусне захворювання печінки. В Україні трапляються його спалахи через забруднення води. Щеплення від вірусного гепатиту А (ВГА) рекомендовані дітям і дорослим. Також вакцинація від гепатиту А рекомендована всім, хто планує відвідати країни, де він поширений, зокрема: Африку, Азію і Південну Америку.

Щодо вірусного гепатиту В (ВГВ), то з 2000 року вакцина від нього входить до Календаря профілактичних щеплень. Для дітей вона безкоштовна. Для дорослих ця вакцина входить до переліку рекомендованих. Імунізація проти гепатиту В захистить людину від небезпечних наслідків вірусної інфекції: цирозу і раку печінки. Схему вакцинації і дозування препарату підбирає лікар (залежно від віку та медичної історії пацієнта).

#### Пневмококова інфекція

У всьому світі пневмококова інфекція — одна із основних причин смертності серед дітей до 5 років. Згідно з оцінками ВООЗ щороку у світі реєструють 1,6 млн летальних випадків внаслідок пневмококових захворювань, близько 50% з них — серед дітей до 5 років.

Пневмокок є причиною таких небезпечних захворювань, як менінгіт, бактеріємія та сепсис. У 2018 році зареєстровано 43 випадки пневмококового менінгіту, із них 10 — серед дітей віком до 17 років.

Найбільше випадків серед дитячого населення — 50% (5 осіб) зареєстровано у віці 5–9 років.

Захиститися від захворювання можна, отримавши дозу відповідної вакцини. Дітям вакцинацію проти пневмококової інфекції можна проводити одночасно з іншими вакцинами, передбаченими Календарем.

Щепитися можливо у будь-якому віці. Щеплення проти пневмококової інфекції не включено до обов'язкових профілактичних щеплень Календаря — воно належить до рекомендованих щеплень.

### Менінгококова інфекція

Менінгококовий менінгіт — небезпечна інфекція, яка вражає оболонки головного та спинного мозку. Якщо вчасно не розпочати лікування, то 50% випадків закінчуються летально.

До груп ризику належать діти, люди з ослабленим імунітетом, вагітні, мікробіологи, які працюють в лабораторіях з патогенними бактеріями.

Також до групи ризику належать мандрівники, які подорожують в країни Африки, на південь від Сахари, від Сенегала до Ефіопії. Цей регіон називають «поясом менінгіту».

На сьогоднішній день вакцинація є найкращим способом захистити себе та своїх дітей від бактеріального менінгіту

### Ротавірусна інфекція

Ротавіруси є найбільш поширеною причиною важких діарейних захворювань у дітей молодшого віку в усьому світі.

За останні 10 місяців минулого року в Україні було зареєстровано 9 тис. випадків ротавірусного ентериту.

Майже кожна дитина у світі, до досягнення 5-річного віку, заражається ротавірусом принаймні один на раз. Однак з кожним наступним зараженням імунітет посилюється.

Джерелом ротавірусів є людина. Інфікування відбувається фекально-оральним шляхом як безпосередньо, так і під час контакту з поверхнями і предметами, що могли бути забруднені: іграшками, підлогою, меблями, одягом тощо, а також під час їжі.

Основними методами профілактики ротавірусної інфекції є вакцинація та дотримання правил особистої гігієни. Вакцина захищає від ротавірусних гастроентеритів і розвитку тяжких форм захворювання.

Для забезпечення раннього захисту від інфекції достатньо дві дози. Курс вакцинації слід завершити до досягнення дитиною віку 24 тижні.

### Грип

Грип — це високозаразне вірусне захворювання з можливістю тяжких ускладнень та ризиком смерті. Найчастішим ускладненням хвороби є пневмонія, яка іноді може лише за 4-5 днів призвести до летальних наслідків.

Захистити себе і своїх дітей від грипу допоможе вакцинація. Це найефективніший та найбільш безпечний метод протистояти цій хворобі.

Вакцинуватися краще до початку циркуляції вірусу грипу. Проте вакцинуватись від грипу не пізно упродовж усього сезону активності захворювання. Захисні антитіла в щепленої людини виробляються від 7 до 14 днів. Вакцинуватись від грипу необхідно щороку.

**Завдання 3.** Встановити алгоритм необхідних дій підготовки до вакцинації (перевірка якості (дотримання холодового ланцюга, терміну придатності вакцини), підготовка пацієнта, правила введення, правила поєднання, правила документування вакцинації).

**Завдання 4.** Скласти графік необхідних обов'язкових та рекомендованих щеплень особам з порушеним графіком вакцинації, використовуючи їх вакцинальні карти (анонімно).

**Завдання 5. Розв'яжіть ситуаційні задачі:**

1. 65-річний чоловік, хворіє на бронхіальну астму. Вакцинований ще у дитинстві. Чи доцільно йому рекомендувати якісь щеплення, якщо так, то які?
2. 10-річна дитина, в анамнезі онкопатологія, хіміотерапія. Чи доцільно йому рекомендувати якісь щеплення, якщо так, то які?
3. Мати 5-місячної дитини хоче вакцинувати її ротариксом. Як рекомендації їй можна надати?
4. 50-річного чоловіка вкусив за руку сусідський пес. Яких заходів потрібно вжити?
5. 50-річний чоловік наступив на цвях та поранив ногу. Яких заходів він має вжити? Які у нього ризики?
6. Молода жінка планує вагітність, які вакцини їй варто отримати?

7. Домашній кіт повернувся з прогулянки на вулиці і вкусив дитину. Яких дій мають вжити батьки?
8. 65-річна жінка часто хворіє на ГРЗ та грип, має бронхіальну астму, які вакцинації їй потрібні?

**Завдання 6.** Розділіться на команди по 3 особи; підготуйте та проведіть серед студентів групи один із заходів (на вибір):

- **Ситуаційний аналіз для визначення ступеня поінформованості та настроїв щодо вакцинації серед педагогічного колективу, школярів та їх батьків (анкетування, зустрічі тощо).** При цьому врахуйте, наскільки повно ці групи володіють інформацією стосовно актуальності щеплень; які питання їх цікавлять та хвилюють найбільше; що в організації вакцинації найбільше подобається або не подобається. Після проведеного заходу проаналізуйте отримані результати.

- **Матеріали для роз'яснення та підвищення інформованості педагогічного колективу, школярів та їх батьків щодо вакцинації.** Такими матеріалами можуть бути інформаційні листи (врахуйте особливості контингенту, з яким ви будете працювати); листівки з запитаннями та відповідями; статті, присвячені успіхам імунізації; листки з інформацією про імунізацію, клінічні прояви захворювання, спалахи хвороб; брошури, які розповідають про програму та послуги імунізації; презентації (відео або слайди).

Під час проведення заходу можна використовувати методику групового обговорення. Це ефективний спосіб обміну інформацією та ідеями. Під час обговорення можна запитати, що відомо групі про імунізацію і хвороби, розвитку яких запобігають за допомогою вакцин. Надайте групі можливість вільного обговорення. Запитайте батьків, що їх турбує та які в них є питання з приводу імунізації, чому деякі з них проти імунізації своїх дітей. Дякуйте учасникам за їхні відповіді. Обговоріть основні пункти, які повинні знати батьки перед проведенням програми імунізації. Використовуйте наочні посібники для ілюстрації того, про що ви говорите. Розповідайте історії та просіть присутніх пояснити, що сталося та чому.

**Сформуйте висновки до роботи**



## **Тема: МЕХАНІЗМИ АНАФІЛАКСІЇ. ЕКСТРЕНА ДОПОМОГА ПРИ АНАФІЛАКСІЇ**

**Мета:** Вивчити механізми формування, симптоми та методи екстреної допомоги під час анафілаксії

### **Теоретичні відомості**

Алергічна реакція – це комплекс симптомів, що виникає в сенсibilізованому організмі при повторному введенні алергену. У розвитку алергічної реакції виділяють три стадії: імунологічну, патохімічну та патофізіологічну.

Імунологічна стадія – це сенсibilізація. Вона формується при першому контакті організму з алергеном. Первинна доза алергену називається сенсibilізуючою. В основі сенсibilізації лежать ті самі механізми, що і в основі імунізації, тобто під впливом алергену синтезуються антитіла (IgE, IgM, IgG) та розмножуються сенсibilізовані лімфоцити. Виявити антитіла можна через 2-3 тижні, а сенсibilізовані лімфоцити – через кілька місяців і навіть років при повторному введенні алергену. Повторна доза алергену називається вирішальною.

Патохімічна стадія розвивається в разі взаємодії антитіл або сенсibilізованих лімфоцитів з алергеном. Утворений комплекс фіксується на мембранах клітин організму. Фіксація його на мембранах базофілів крові і тканинних базофілів (тучних клітин) призводить до вивільнення біологічно активних речовин (гістаміну, серотоніну та ін.), а також активації індукторів запалення (комплементу, макрофагів).

Патофізіологічна стадія (феноменологічна) проявляється внаслідок виникнення функціональних та структурних змін в органах і тканинах, що супроводиться проявленям певних симптомів захворювання. Ці симптоми проявляються по-різному й залежать від алергену та особливостей імунної перебудови організму.

Анафілактичний шок – системна алергічна IgE-опосередкована реакція негайного типу, що супроводжується небезпечними для життя клінічними проявами. Виникає у результаті потрапляння лікарських препаратів, продуктів харчування, укусів комах. Розрізняють п'ять варіантів анафілактичного шоку:

гемодинамічний, респіраторний (асфіктичний), церебральний, абдоміальний і змішаний.

Гемодинамічний	<ul style="list-style-type: none"><li>• Біль у ділянці серця, слабкість пульсу та його зникнення, порушення серцевого ритму, спазм периферійних судин, дисфункція мікроциркуляції</li></ul>
Асфіктичний	<ul style="list-style-type: none"><li>• Гостра дихальна недостатність, зумовлена набряком слизової оболонки гортані з частковим або повним закриттям її отвору, бронхоспазмом різного ступеня до повної непрохідності бронхіол, інтерстиціальним або альвеолярним набряком легень, який блокує газообмін</li></ul>
Церебральний	<ul style="list-style-type: none"><li>• Психомоторне збудження, судоми, дихальна аритмія, раптова втрата свідомості, судоми, менінгеальна симптоматика</li></ul>
Абдоміальний	<ul style="list-style-type: none"><li>• Симптоми гострого живота з різким болем в епігастральній ділянці, іноді мимовільна дефекація, сечовиділення, кишкові кровотечі, кров'янисті виділення з піхви</li></ul>
Змішаний	<ul style="list-style-type: none"><li>• Поєднання різних симптомів</li></ul>

Діагностика анафілаксії передбачає дослідження вмісту серотоніну крові, 5-оксиіндолоцтової кислоти сечі, катехоламінів; гістаміну чи його метаболітів у плазмі чи сечі, триптази у сироватці крові. Підвищені рівні  $\beta$ -триптази в крові свідчать про активацію тканинних базофілів (тучних клітин) із виділенням цього медіатора або під впливом IgE (анафілаксія) або під впливом лібераторів (анафілактоїдна реакція).

Діагностика та лікування людини з анафілактичною реакцією постребує професійної невідкладної медичної допомоги. Після прийому виклику диспетчер має встановити точний час початку захворювання (через скільки хвилин, годин, днів після початку застосування лікарського засобу виникли симптоми) та скерувати виїзд бригади швидкої медичної допомоги.

Лікар станції (відділення) швидкої та невідкладної медичної допомоги визначає план невідкладних заходів та скеровує госпіталізацію пацієнта. Під час огляду лікар має виявити загальний алергологічний, імунологічний

анамнез та алергічні реакції на лікарські засоби, провести фізикальне обстеження пацієнта, візуально оцінити стан шкірних покривів, ротоглотку пацієнта, провести аускультацию легень та серця. Диференціювати гострий стан і почати надання екстреної допомоги.

Перша лінія лікування:

- Епінефрин може врятувати життя пацієнту, тому має бути негайно введений у вигляді першої лінії лікування при анафілаксії. Епінефрин слід вводити внутрішньом'язово в середину зовнішньої частини стегна 0,01 мг/кг розчину 1:1000 (1 мг/мл); максимум 0,5 мг (дорослий) або 0,3 мг (дитина). У пацієнтів, які потребують повторних доз епінефрину, введення слід здійснювати принаймні через кожні 15 хв. У разі неадекватної реакції на дві або більше доз епінефрину внутрішньом'язово його можна вводити у вигляді вливання (інфузії) з проведенням відповідного кардіомоніторингу у відділенні невідкладної (екстреної) допомоги, інтенсивної терапії у супроводі лікарів.
- Блокатори  $H_1$ - та  $H_2$ -гістамінових рецепторів системної дії можуть полегшити шкірні симптоми анафілаксії.
- Системні глюкокортикостероїди (ГКС) можуть бути використані, оскільки вони можуть знизити ризик респіраторних симптомів пізньої фази.

Пацієнтів, які виявляли дихальну недостатність, слід ретельно оглядати принаймні впродовж 6–8 год. Пацієнтів, які виявляли нестабільність кровообігу, слід оглядати протягом 12–24 год.

Друга лінія лікування

- Слід зупинити дію тригера анафілактичної реакції.
- Надати правильне положення тілу пацієнта для запобігання аспірації. Пацієнта з анафілаксією слід покласти на спину з піднятими нижніми кінцівками, якщо він виявляє нестабільність кровообігу, перевести у позицію «сидячи», якщо він виявляє ознаки дихальної недостатності, або у рятівне положення на боці, якщо пацієнт втратив свідомість.
- Усім пацієнтам з анафілаксією слід вводити високу концентрацію кисню через маску – до 6–8 л/хв.

- Застосовувати стандартні методи для відновлення прохідності дихальних шляхів та профілактики аспірації.

- Швидко ввести 1–2 л розчину натрію хлориду 0,9% через катетер (5–10 мл/кг у перші 5–10 хв дорослому; 10 мл/кг дитині).

- Для зменшення вираженості симптомів бронхоспазму додатково ввести інгаляційні  $\beta_2$ -агоністи.

- За показаннями — проведення серцево-легеневої реанімації.

### Третя лінія лікування

- Для зменшення вираженості шкірних симптомів — блокатори  $H_1$ - та  $H_2$ -гістамінових рецепторів системної дії.

- З метою зниження ризику розвитку респіраторних симптомів пізньої фази — введення системних глюкокортикостероїдів.

- Моніторинг стану пацієнта (при дихальній недостатності — протягом 6–8 год, при нестабільності кровообігу — протягом 12–24 год; див. також рисунок).

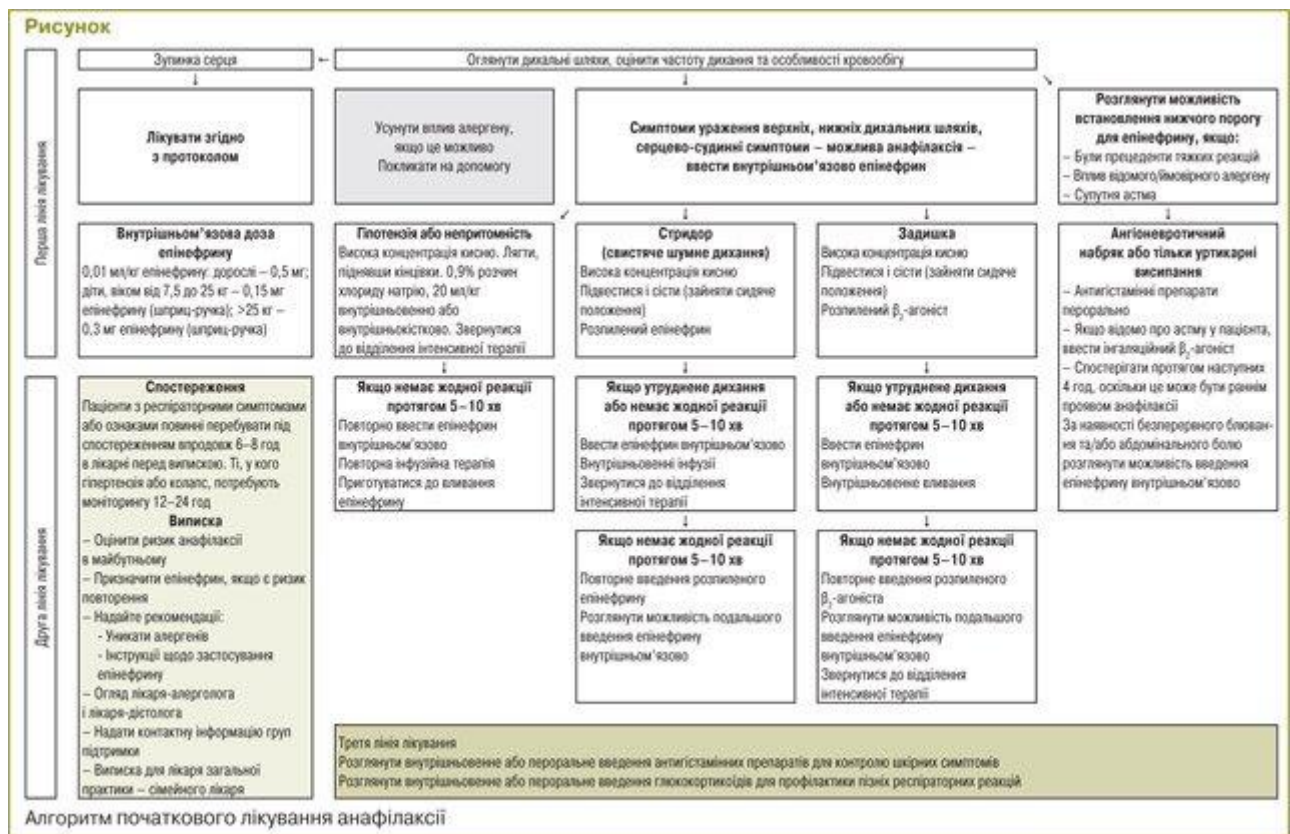


Рис. 1. Алгоритм початкового лікування анафілаксії

### Завдання

1. Переглянути фільм «формування експериментальної анафілаксії». Ознайомитись з методикою формування експериментальної анафілаксії

на кінську сироватку у морської свинки. Провести аналіз зовнішніх проявів експериментальної анафілаксії. Ознайомитись із змінами, які відбулись у структурі легеневої тканини досліджуваної тварини.

2. Порівняти перебіг експериментальної анафілаксії у морської свинки з аналогічними реакціями у людини.
3. Корисуючись теоретичними відомостями, рис. 1, скласти алгоритм дій допомоги людині з анафілаксією.

**Сформууйте висновки до роботи**

## Перелік використаних джерел

1. Анатомія людини. URL: <https://anatom.ua/basis/text/all/3-23/>
2. Білаш С. М., Борута Н. В., Шепітько В. І. та ін. Сучасні погляди на структурну організацію червоного кісткового мозку, особливості перебігу захворювань його та медико-біологічне значення препаратів з плацентарної тканини // Світ медицини та біології. 2017. № 1(59). С. 180-186.
3. 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.
4. Імунопрофілактика інфекційних хвороб : навч.-метод. Посіб. / Чернишова Л. І., Лапій Ф. І., Волоха А. П. К.: ВСВ «Медицина», 2019. 320 с.
5. Інструкція з визначення груп крові за системою АВ0. Наказ МОЗ України. URL: <https://ips.ligazakon.net/document/MOZ2277>
6. Інструкції та паспорти до використання моноклональних реагентів. ТОВ «Гранум», м. Харків, 2020.
7. Інструкції та паспорти до використання стандартних еритроцитів. ТОВ «Гранум», м. Харків, 2020.
8. Інструкція з використання діагностикуму «РФ-латекс-тест» ТОВ «Лабораторія Гранум», м. Харків, 2020.
9. Калиниченко Т. О., Аношина М. Ю., Павлюк Р. П., Балан В. В. Дослідження кріочутливості клітин пуповинної крові: зв'язок з окремими антигенними детермінантами груп крові. Scientific Journal «ScienceRise». №12(41). 2017. С. 14–20.
10. Кременчуцький Г. М., Крушинська Т. Ю., Степанський Д. О., Юргель Л. Г. та ін. практичні заняття з медичної мікробіології, вірусології та імунології (Модулі 1, 2). Дніпропетровськ: ДДМА, 2010. 288 с.
11. Малоштан Л. М., Рядних О. К., Жегунова Г. П. та ін. Фізіологія з основами анатомії людини. Х.: Вид-во НФаУ: Золоті сторінки, 2003. 432 с.
12. Луцик О. Д., Іванова А. Й., Кабак К. С. Гістологія людини : Підручник. Вид. 4-те, доповнене і випр. К. : Книга Плюс, 2013. 582 с.

13. Основи імунології : лабораторний практикум / уклад. : К. Г. Гаркава, А. В. Дrajнікова. К. : НАУ, 2015. 60 с.
14. Соколенко В. Л. Прикладна імунологія. Навчально-методичний посібник / В. Л. Соколенко, С. В. Соколенко. Черкаси: Вид. від. ЧНУ ім. Богдана Хмельницького, 2011. 60 с.
15. Судово-медична характеристика ушкоджень селезінки та визначення давності їх утворення / Мішалов В. Д., Петрошак О. Ю., Бабкіна О. П. / установи-розробники: Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Державна установа «Головне бюро судово-медичної експертизи МОЗ України» КЗ «Дніпропетровське обласне бюро судово-медичної експертизи ДОР». Київ, 2015. 35 с.
16. Третяк Н. М. Гематологія. Навчальний посібник. К.: Зовнішня торгівля, 2005. 240 с.
17. Устинов О. В. Невідкладна допомога при медикаментозній алергії. URL: <https://www.umj.com.ua/article/94169/nevidkladna-dopomoga-pri-medikamentoznij-alergii>
18. Чоп'як В. В., Потьомкіна Г. О., Гаврилюк А. М. та ін. Клінічна імунологія та алергологія: навч. посіб. К. : ВСВ «Медицина», 2017. 224 с.
19. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/7804/organikrovotvorennya-gemopoetichni-organi>
20. <http://transfusiology.com.ua/wp-content/uploads/2019/01/sop1.pdf>
21. <http://transfusiology.com.ua/poryadok-provedennya-imunogematologichnih-doslidzen-krovi-vagitnih/>
22. <https://www.invitro.ua/ua/analizes/for-doctors/1134/8200/>
23. <https://donor.ua/pages/2124>
24. [https://books.google.com.ua/books?hl=uk&lr=&id=vxyDDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&ots=-RC1RqAzFs&sig=Ce8QA9TkUhlBhMdfSdzstBuuadg&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ua/books?hl=uk&lr=&id=vxyDDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&ots=-RC1RqAzFs&sig=Ce8QA9TkUhlBhMdfSdzstBuuadg&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
25. <http://www.bioadvisers.com/elikine-elisa-kit/>
26. <https://vitrotest.ua/iimunofermentnij-analiiz-v-diiagnosticii.html>
27. <https://empendium.com.ua/chapter/B27.II.18.10>.

28. [https://nmapo.edu.ua/images/Novosti/04\\_11\\_16-11.pdf](https://nmapo.edu.ua/images/Novosti/04_11_16-11.pdf)
29. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1159-11/print>
30. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1237-14/print>
31. <https://bit.ly/2uIOrGq>
32. <https://bit.ly/2FJHUxE>