

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ
С.З. ГЖИЦЬКОГО
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

Кафедра внутрішніх хвороб тварин
та клінічної діагностики

**Методична розробка
до лабораторного заняття з дисципліни
“Спеціальна пропедевтика, терапія і профілактика
внутрішніх хвороб тварин”**

**СПЕЦІАЛЬНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ОРГАНІВ
ІМУННОЇ СИСТЕМИ**

Для підготовки фахівців другого (магістерського) рівня
вищої освіти
за спеціальністю – 211 “Ветеринарна медицина”

Львів – 2019

Розробники та укладачі: Слівінська Л.Г., Демидюк С.К., Зінко Г.О., Щербатий А.Р., Лукащук Б.О., Драчук А.О., Личук М.Г., Федорович В.Л., Жуковський І.К., Федорович Н.М., Дунець В.Ю., Стефаник О.В. **Методична розробка до лабораторного заняття з дисципліни “Спеціальна пропедевтика, терапія і профілактика внутрішніх хвороб тварин”.**

Навчально-методична карта заняття: Спеціальні методи дослідження органів імунної системи. У навчально-методичній карті відображено: назву навчальної дисципліни, тему заняття, вид заняття, мету заняття, міжпредметні зв'язки, забезпечення заняття (наочність, дидактичний матеріал, технічні засоби навчання, навчальні місця студентів), літературу, зміст заняття, теоретичний матеріал до теми заняття та методику виконання лабораторної роботи. Методична розробка спрямована для надання методичної допомоги викладачам і студентам під час вивчення дисципліни “Спеціальна пропедевтика, терапія і профілактика внутрішніх хвороб тварин” та проведення лабораторного заняття. У кінці заняття наведені питання для самоконтролю знань та завдання для самостійної роботи.

Відповідальна за випуск: Слівінська Л.Г., зав. кафедри внутрішніх хвороб тварин та клінічної діагностики, д. вет. наук, професор.

Навчально-методичне видання

Методична розробка розглянута і рекомендована до друку методичною комісією факультету ветеринарної медицини ЛНУВМ та БТ імені С.З. Гжицького протокол № від 25.01.2019 р.

Навчально-методична карта заняття № 8

Навчальна дисципліна: “Спеціальна пропедевтика, терапія і профілактика внутрішніх хвороб тварин”.

Тема заняття: “Спеціальні методи дослідження органів імунної системи. Визначення бактерицидної і лізоцимної активності фагоцитів та загальної кількості імуноглобулінів”.

Вид заняття: лабораторне заняття.

Мета заняття: “Ознайомитися із спеціальними методами дослідження органів імунної системи”

Вивчити: методику визначення бактерицидної і лізоцимної активності сироватки крові, фагоцитарної активності нейтрофілів, загальної кількості імуноглобулінів та циркулюючих імунних комплексів.

Знати: спеціальні методи дослідження органів імунної системи.

Вміти: диференціювання лейкоцитів, провести визначення бактерицидної та лізоцимної активності сироватки крові, фагоцитарної активності нейтрофілів, загальної кількості імуноглобулінів комплексів.

Володіти: основними практичними навиками по дослідженню органів імунної системи.

Міжпредметні зв'язки: клінічна діагностика, клінічна біохімія.

Забезпечення заняття: хворі тварини, інструменти для клінічного дослідження тварин, матеріали і прилади для дослідження крові (морфологічного, біохімічного та імунологічного), КФК-3, термостат.

Наочність: хворі (піддослідні) тварини, атлас крові.

Технічні засоби навчання: мультимедійна система, ноутбук.

Навчальні місця (для лабораторних занять):

1. Устаткування аудиторії (терапевтичного манежу):

Столики інструментальні – 2 шт., станки фіксаційні для великих тварин.

2. Пристосування для фіксації та приборкування тварин: щипці Гармса для великої рогатої худоби, пута з мотузками, бинтові пов'язки, намордники.

3. Обладнання: мікроскоп, пробірки, піпетки, штативи, КФК-3, термостат, кювети 10 мм; термостат.

4. Реактиви: стерильний фізіологічний розчин, м'ясо-пептонний бульйон Хоттінгера, м'ясо-пептонний агар, добова культура кишкової палички, добавка культури *Mycosoccus lysodeicticus*, 0,1 М боратний буфер (рН 8,4), 4% розчин ПЕГ.

Література:

1. Внутрішні хвороби тварин / В.І. Левченко, І.П. Кондрахін, В.В. Влізло та ін. / за ред. В.І. Левченка. – Біла Церква, 2015, Ч. 2. – 610 с

2. Клінічна діагностика хвороб тварин / В.І. Левченко, В.В. Влізло, І.П. Кондрахін та ін.; за ред. В.І. Левченка і В.М. Безуха. – Біла Церква, 2017. – 543 с.

3. Ветеринарна клінічна біохімія / В.І. Левченко, В.В. Влізло, І.П. Кондрахін та ін.; За ред. В.І. Левченка і В.Л. Галяса. – Біла Церква, 2002. – 400 с.

4. Методи лабораторної клінічної діагностики тварин / В.І. Левченко, В.І. Головаха, І.П. Кондрахін та ін.; За ред. В.І. Левченка. – К.: Аграрна освіта, 2010. – 237 с.

5. Комплексна оцінка впливу ветеринарних препаратів на морфофункціональний стан імунної системи (методичні рекомендації) / Косенко М.В., Коцюмбас І.Я., Клос Ю.С. та ін. – Львів, 2009. – 64 с.

Зміст та хід заняття

1. Організаційна частина (3 хв.). Взаємне вітання науково-педагогічного працівника зі студентами. Перевірка присутніх.

2. Актуалізація і корекція опорних знань студентів (5-10 хв.).

2.1. Фронтальне опитування.

1. Назвіть центральні органи імунної систем?
2. Назвіть периферичні органи імунної систем?
3. Що називають імунітетом?
4. Перерахуйте клітинні і гуморальні фактори імунітету

тварин.

3. Повідомлення теми (2 хв.).

“Спеціальні методи дослідження органів імунної системи. Підрахунок лейкоцитів. Визначення бактерицидної і лізоцимної активності сироватки крові, фагоцитарної активності нейтрофілів та загальної кількості імуноглобулінів”.

4. Виконання лабораторної роботи (40 хв.).

4.1. Теоретична частина.

Дослідження імунної системи. Схильність тварин до захворювання і характер їх перебігу в основному зумовлені станом резистентності їх організму. За однакових умов одні тварини не хворіють і зберігають високу продуктивність, інші хворіють у легкій формі зі зниженням продуктивності, а деякі – у тяжкій формі. Все це зумовлено не однаковим рівнем захисних адаптаційних механізмів організму, що називається узагальнюючим поняттям резистентність або імунітет. Під терміном резистентність (імунітет) слід розуміти стан специфічних і неспецифічних захисних і пристосувальних механізмів організму, здатних протидіяти різним несприятливим факторам зовнішнього середовища, у тому числі вірусам, бактеріям і найпростішим.

Імунна система здійснює специфічний захист організму від чужорідних антигенів. Основною особливістю імунної системи є її унікальна здатність розпізнавати антигени і специфічно реагувати на них. У зв'язку з тим, що ряд внутрішніх хвороб протікають з

імуно-дефіцитним станом, це погіршує лікування тварин та розробку профілактичних заходів, тому вивчення питань імунології на сьогодні є актуальним, що дозволить більш предметно проводити ранню діагностику хвороб та своєчасне їх лікування.

Всі різновиди імунної відповіді можна розділити на дві основні форми: вроджені і набуті, основна різниця між якими полягає у механізмі розпізнання “не свого”, чужорідного. Вроджений (природний) імунітет ще називають резистентність, а набутий – специфічним.

Природна резистентність залежить від температури тіла, стану шкірних покривів і слизових оболонок, наявності фагоцитів, комплементу, лізоциму, інтерферону і стану мікрофлори тіла тварини.

Специфічний (набутий) імунітет не передається по спадковості і має чотири основні характеристики: здатність відрізнати свої клітини та продукти їх життєдіяльності від чужих, здатність “запам’ятовувати” (імунна пам’ять), висока специфічність імунологічної пам’яті, специфічна імунологічна ареактивність в процесі ембріонального розвитку.

Специфічність та імунна пам’ять – головні характеристики адаптативного імунітету, а здатність формувати специфічні механізми та імунну пам’ять – властивість, що належить лише лімфоцитам .

Імунна система включає клітинні та гуморальні фактори.

Гуморальні фактори захисту охоплюють велику групу різних за походженням, структурою та дією речовин: фактори системи комплементу та некрозу пухлин, лізоцим, лейкоїни, інтерлейкіни, лізин, трансферин та ін.

Лізоцим – один з найважливіших факторів природної резистентності прямої дії. Він має властивість муколітичного ензиму і викликає лізис клітинної стінки чисельних

мікроорганізмів. Літична дія лізоциму значно посилюється компонентами комплементу.

Система комплементу охоплює понад 30 компонентів (протеїнів та глікопротеїдів), що діють каскадно.

Значну роль у гуморальному захисті відіграють антитіла, що являють собою специфічні протеїни – імуноглобуліни, що утворюються в організмі певним типом клітин. На сьогодні відомо 5 класів імуноглобулінів IgG, IgA, IgM, IgD та IgE.

Бактерицидна активність сироватки крові (БАСК) є інтегральним показником природної резистентності і зумовлюється дією багатьох неспецифічних захисних компонентів: нормальних антитіл, лізоциму, комплементу, пропердину, інтерферону та інших факторів, які знешкоджують мікробні клітини.

Істотну роль у природній резистентності відіграють клітинні фактори захисту, що здатні зв'язувати та поглинати клітини, мікроорганізми та сторонні частки, і перетравлювати їх.

Фагоцитоз є головним механізмом природної резистентності, а також обов'язковою ланкою індукції та формування специфічної імунної відповіді. Фагоцити відіграють провідну роль у природному і важливе значення у набутому імунитеті. Існує два типи фагоцитів: мікрофагоцити (полінуклеари, нейтрофіли) і макрофагоцити (мононуклеари). Останні, в свою чергу, ділять на циркулюючі в периферійній крові (моноцити) та осілі (тканинні).

Класичними фагоцитарними клітинами є нейтрофіли, макрофаги, дендритні клітини та еозинофіли, хоча здатність до фагоцитозу притаманна також В-лімфоцитам, базофілам, мастоцитам.

Нейтрофіли формуються в кістковому мозку, мігрують у кров, проникають у тканини та здійснюють першу лінію захисту від бактеріальних і грибкових інфекцій.

Макрофаги з'являються в зоні запалення після нейтрофілів на пізніх стадіях розвитку запального процесу. Вони звільняють організм від решток загиблих клітин, імунних комплексів, що циркулюють або відкладаються в тканинах.

Заключним етапом фагоцитарної реакції є утворення на поверхні макрофага комплексу стороннього протеїну з молекулами своїх антигенів, що розпізнається рецепторами Т-хелперів і служить сигналом для запуску подальших імунологічних реакцій.

Набутий імунітет у тварин. Набутий імунітет виникає внаслідок імунологічної перебудови в організмі під дією антигену або в разі введення готових антитіл та імунних лімфоцитів. Лімфоцити розповсюджені по всьому організму

Т-лімфоцити беруть участь у реакціях клітинного імунітету: гіперчутливість сповільненого типу, відторгнення трансплантата, аутоімунні процеси, імунний захист при ряді інфекційних та інвазійних хвороб. Вони синтезують лімфокіни – медіатори, що зумовлюють зв'язок з макрофагами, нейтрофілами, регулюють функції В-системи.

Популяція Т-лімфоцитів поділяється на кілька субпопуляцій: Т-кіллери, Т-ампліфайери (Т_a), Т-диференціюючі (Т_d), Т-хелпери (Т_h), Т-супресори (Т_s), Т-ефектори (Т_e).

Т-кіллери (цитотоксичні Т-лімфоцити) здатні руйнувати шляхом лізису клітини мішені. Їм належить провідна роль у реалізації конфлікту з трансплантантом, у захисті організму від пухлин, вірусних та деяких бактеріальних хвороб. Т-супресори здатні обмежувати імунну відповідь на антиген, як у кількісному, так і в якісному відношенні. Т-хелпери є зв'язуючою ланкою між Т і В-системами, вони стимулюють проліферацію та диференціацію В-лімфоцитів, забезпечуючи функціонування продуцентів антитіл, а також задіяні у реакціях клітинного імунітету. Т-ефектори близькі до Т-кіллерів, вони здійснюють алергічні реакції сповільненого типу. Т-ампліфайери посилювачі функцій інших

субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів. Т-диференціюючі впливають, в основному, на стовбурові кровотворні клітини, визначають напрям їх диференціації та міграції.

Деяка частина Т-лімфоцитів, після контакту з антигеном не диференціюється у клітини кіллери, а після декількох ділень диференціюються у довгоживучі клітини пам'яті, які протягом тривалого часу підтримують стан клітинної пам'яті щодо певного конкретного антигена.

В-лімфоцити виконують головну роль у процесі гуморального захисту організму проти більшості бактеріальних інфекцій, у розвитку гіперчутливості негайної дії та деяких аутоімунних процесів. Окрема група В-клітин (В-ефектори) трансформуються у плазматичні клітини – основні продуценти антитіл (імуноглобулінів).

Частина лімфоцитів не належить до Т- і В-клітин, оскільки вони не мають на своїй поверхні відповідних маркерів, так звані, 0-клітини. Серед них є клітини, які називають природними, або натуральними кілерами (НК-клітини). Через відсутність у них специфічних до антигену рецепторів, їх відносять до системи неспецифічного імунітету.

Розлади травлення тварин з симптомами діареї виникають на тлі дефіциту В-системи імунітету, тоді як респіраторні розвиваються через пригнічення Т-системи. З іншої сторони, за діарейних захворювань відмічається поглиблення В-імунодефіциту, а за важкої форми респіраторних – розвивається Т-імунодефіцитний стан.

В міру вилучення антигенів спрацьовують різні регуляторні механізми (за участю Т-лімфоцитів і антитіл) переважно супресорної дії, які спрямовані на поступове обмеження імунної відповіді аж до повної її припинення. Імунна система повертається до вихідного “неактивного” стану, але якісно іншого щодо

конкретного антигену, тобто збагачується на довгоіснуючі клітини пам'яті.

Імунна система є індикатором фізіологічного стану організму, вона чітко реагує на зміни умов оточуючого середовища, надходження в організм антиоксидантів, вітамінів та мікроелементів. Порушення її функції розглядається як один з патогенетичних механізмів патологічного процесу.

Слід відмітити, що визначати стан імунітету за одним з показників (клітинним чи гуморальним) є помилковим рішенням, оскільки внаслідок компенсаторних явищ в організмі при недостатній функції клітинних факторів посилюють захисну функцію гуморальні і навпаки.

З морфологічної точки зору, імунна система, це сукупність усіх лімфоїдних органів і скупчень лімфоїдних клітин. В імунній системі розрізняють центральні (первинні) та периферичні (вторинні) органи імуногенезу. У ссавців до центральних органів відносять кістковий мозок і тимус, до периферичних – лімфатичні вузли, селезінку, лімфоїдні утворення, травного тракту (мигдалики, пейсерові бляшки, солітарні фолікули), органів дихання і сечостатевого тракту, кров, лімфу, мікрофагальну систему. Центральні лімфоїдні органи регулюють усі імунні процеси в організмі та коригують напрямок імуногенезу в периферичній ланці імунної системи.

Імунні дефіцити (імунна недостатність) характеризується дефектами різних ланок імунної системи і тому організм не в змозі реагувати повноцінною імунною відповіддю на антигени.

За походженням бувають природжені (первинні), вікові (фізіологічні) і набуті (вторинні).

Залежно від активного компоненту імунної системи буває недостатність клітинного імунітету (Т-системи лімфоцитів); недостатність гуморального імунітету (В-системи лімфоцитів); недостатність системи фагоцитів (макро- і мікрофагоцитів);

недостатність системи комплементу та комбінована імунна недостатність.

Природжені (первинні) імунодефіцити виникають внаслідок генетично зумовленої неспроможності організму організувати імунну відповідь у зв'язку з гіпотензією центральних і периферичних органів імуногенезу через порушення диференціації клітин, ферментних систем, функціональної активності лімфоцитів, фагоцитів і мають спадковий характер.

Вікові (фізіологічні) імунодефіцити спостерігаються у ранньому і похилому віці.

Перша фаза вікового імунодефіциту і молодняку виражена у перші дні неонатального періоду, особливо до випоювання молозива, коли в крові є досить незначна кількість імуноглобулінів. Перший віковий імунодефіцит супроводжується шлунково-кишковими хворобами.

Друга фаза вікового імунодефіциту розвивається у телят на 7–14-й день життя, у ягнят і поросят на 14–28-й. Зумовлено це тим, що до цього часу більшість колостральних антитіл руйнується, а синтез власних відбувається ще недостатньо. В крові зменшується кількість лімфоцитів, імуноглобулінів, особливо Ig A, виникає друга хвиля шлунково-кишкових захворювань, а також з'являються ранні пневмонії.

Третя фаза вікового імунодефіциту у поросят збігається з періодом відлучення від свиноматки, а у телят – із переведенням з молочної на рослинну годівлю. Супроводжується такими хворобами, як ентеротоксимія, абомазоентерит, кормова алергія, сальмонельоз, пневмонія.

Набуті (вторинні) імунодефіцити розвиваються в наслідок різних хвороб, при яких відбувається значна втрата захисних факторів і виникають структурно-функціональні зміни в імунній системі. Можуть виникати за шлунково-кишкових хвороб, пневмонії, ураженням імунної системи радіоактивним

опроміненням, лейкозі, мікотоксикозах, отруєннях, інвазіях, довготривалому застосуванні імунодепресантів, антибіотиків, нітрофуранів, сульфаніламідів, кортикостироїдів, при дефіциті у раціоні протеїну, амінокислот, мікроелементів і вітамінів.

Діагностику проводять з урахуванням анамнестичних даних; аналізу результатів морфологічного, біохімічного та імунологічного дослідження крові; патоморфологічних цитологічних та імунологічних змін тимуса, кісткового мозку, лімфатичних вузлів, селезінки.

При дослідженні крові враховують загальну кількість лімфоцитів, у тому числі Т- і В- клітин, їхніх субпопуляцій, фагоцитозу, активність мікро- і макрофагів, загальну кількість імуноглобулінів та їх окремих класів (G, A, M), загальну кількість протеїну в сироватці крові а також гамаглобулінів.

Загальна кількість імуноглобулінів у сироватці крові 2–3-денних телят, визначена експрес методом з натрію сульфатом та цинку сульфатом, має бути не нижчою 20 г/л, гамаглобулінів 20 г/л, загального протеїну – в межах 60–70 г/л.

При концентрації Ig меншій, ніж 15 г/л, загального протеїну 55 г/л можна стверджувати про наявність імунодефіцитного стану.

Фагоцитарна активність (ФА) – це кількість активних фагоцитів у відсотках до загальної кількості активних лейкоцитів.

Фагоцитарний індекс (ФІ) – кількість фагоцитованих мікробних тіл, яка припадає на один активний нейтрофіл і характеризує поглинаючу здатність фагоцитів.

Фагоцитарне число (ФЧ) – кількість фагоцитованих мікробних тіл на 100 підрахованих нейтрофілів.

$ФА = (\text{кількість активних клітин} / \text{загальну кількість підрахованих клітин}) \cdot 100.$

Середній показник фагоцитозу у великої рогатої худоби – 22–60 %; індекс фагоцитозу – 5–11; у свиней ФА – 45–62 %, ІФ–3–7.

Рівень гуморальних факторів біологічних рідин і тканин (кров, сльоза, слина, жовч, молозиво, молоко, шлунковий сік та ін.) визначають за їхньою бактерицидною активністю (БА), яка є одним з важливих показників резистентності. Середній показник бактерицидної активності сироватки крові у здорових тварин становить: у великої рогатої худоби 35–65 %, свиней 38–60 %, у свиней промислових комплексів 11–50 %.

Основою гуморальних факторів є імуноглобуліни. Тому визначення їх у крові має велике значення при дослідженні імунного статусу. Принципи визначення загальних імуноглобулінів у сироватці крові та молозиві полягають у тому, що при внесенні в розчин, який містить імуноглобуліни, цинку сульфат або натрію сульфату змінюються протеїнові молекули, в наслідок чого розчин стає мутним. Ступінь цього помутніння прямо пропорційний вмісту імунних глобулінів і може бути визначено фотометричними приладами.

Виділено п'ять класів імуноглобулінів Ig: A, M, G, D, E. У сільськогосподарських тварин детальніше вивчені перші три класи Ig: A, M, G.

У сироватці крові новонароджених телят і поросят до згодовування молозива імуноглобулінів майже відсутні. Тому їх захист від несприятливих факторів зовнішнього середовища в перші дні життя забезпечуються за рахунок імуноглобулінів, що надходять з молоком в молозивом.

Основною причиною низької концентрації молозивних імуноглобулінів в сироватці у перші дні після народження телят є: пізнє випоювання молозива матері першого надою, недостатня кількість його споживання, низька якість (менше 60 мг/мл імуноглобулінів) молозива, що спостерігається часто у первісток, при неповноцінній годівлі корів, впливу на їх організм різних стрес факторів і ін.; хворобах шлунково-кишкового каналу або морфо-функціональній незрілості новонародженого (гіпотроїя).

Утворення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) відноситься до первинних актів імунної реакції організму. Цей фізіологічний процес, поряд з іншими, забезпечує підтримку імунологічного гомеостазу. В нормі ЦІК фагоцитуються і процес цей підсилюється у присутності білків системи комплементу. ЦІК впливають на функції лімфоцитів, макрофагів, отже беруть участь у регуляції імунної відповіді. Концентрація ЦІК залежить від антигенного навантаження, властивості антитіл, стану системи комплементу і фагоцитуючих клітин. ЦІК стають патогенними, якщо не можуть бути еліміновані з організму, зв'язуються з клітинами і акумулюються в тканинах, призводять до незворотних деструктивних змін

4.2 Лабораторна (практична) частина. Самостійна робота студентів під контролем викладача та лікаря-ординатора.

Клінічне дослідження хворої тварини:

- збір анамнезу – 2 студенти;
- клінічне обстеження тварини (3 групи студентів по 4 у кожній) з ресстрацією симптомів;
- постановка діагнозу, диференціальна (дискусія всіх студентів і викладача);
- дослідження крові (лейкограма);
- визначення бактерицидної активності сироватки крові;
- визначення лізоцимної активності сироватки крові;
- визначення фагоцитарної активності нейтрофілів;
- визначення загальної кількості імуноглобулінів.

Диференціальний підрахунок лейкоцитів (лейкограма).

Роблять мазок крові і зафарбовують за методикою Романовського-Гімзе. Підрахунок лейкоцитів проводять у камері Горяєва

Принцип методу. Кількість лейкоцитів підраховують у визначеному об'ємі камери Горяєва з відомим розведенням крові і підраховують наступні форми лейкоцитів: гранулоцити: базофіли еозинофіли, нейтрофіли (паличко- та сегментноядерні); агранулоци: лімфоцити, моноцити.

Поява в лейкограмі молодих і дегенеративних форм нейтрофілів (ядерний зсув нейтрофілів) притаманна інфекційним і запальним процесам, злоякісним новоутворенням, інтоксикаціям. Нейтрофілія може перебігати без змін співвідношення окремих форм нейтрофілів або супроводжуватися підвищенням кількості молодих форм нейтрофілів у периферичній крові – зрушення ядра вліво, або збільшення кількості сегментоядерних клітин – зрушення ядра вправо.

За ступенем регенерації нейтрофільний лейкоцитоз буває:

- а) з простим (регенеративним) зрушенням ядра
- б) з різким регенеративним (гіперрегенеративним) зрушенням
- в) нейтрофілія з гіпопластичним (регенеративно-дистрофічним)

Визначення бактерицидної активності сироватки крові (БАСК)

БАСК є інтегральним показником природної резистентності і зумовлюється дією багатьох неспецифічних захисних компонентів: нормальних антитіл, лізоциму, комплементу, пропердину, інтерферону та інших факторів, які знешкоджують мікробні клітини.

Реактиви. Стерильний фізіологічний розчин, м'ясо-пептонний бульйон Хоттінгера, добова культура кишкової палички, досліджувана сироватка.

Обладнання. КФК-3, кювети №2, стерильні пробірки і піпетки.

Хід визначення. На фізіологічному розчині готують змив із добової культури еширій, доводять її щільність на КФК-3 ($\lambda=540$ нм) до 0,48. У пробірки вносять до 4,5 мл стерильного м'ясо-

пептонного бульйону, у дослідну пробірку додають 1 мл. досліджуваної сироватки, а в контрольну – фізіологічного розчину. Потім вносять по 1 краплі 24 годинної культури еширїї, перемішують відбирають по 2 мл. і визначають оптичну густину. Суміш, що залишилася, інкубують при температурі 37°C протягом 3 годин і вимірюють оптичну густину.

$$\text{БАСК}\% = 100 - [(D_T - D_0 / K_T - K_0) \times 100]$$

де:

D_0, K_0 – оптично густина досліду і контролю до інкубації

D_T, K_T – оптична густина досліду і контролю через 3 години після інкубації.

Зниження рівня бактерицидної активності спостерігаються частіше, ніж її підвищення, і характерне для різних стресових ситуацій, порушення умов утримання та при виникненні захворювань, які протікають у скритій і хронічній формі. Підвищення БАСК відмічається при гострому перебігу захворювань і при стимулюючій дії різних факторів.

Визначення лізоцимної активності сироватки крові (ЛАСК)

Методика визначення лізоциму в сироватці крові ґрунтується на його літичних властивостях. У лабораторній практиці використовують декілька методів. З них найбільш раціональним вважається фотоелектроколореметричний метод.

Матеріали і реактиви: стерильний розчин 0,5 % NaCl, добавка культури *Mycosoccus lysodeicticus*, м'ясо-пептонний агар; пробірки; піпетки; штативи; КФК-3; кювети 10 мм; термостат.

Хід визначення: Перед дослідженням культури слід перевірити на лізуючу здатність у 0,5 % NaCl, Для цього до 2 мл змиву добової культури *M. Lysodeicticus*, стандартизованої на КФК-3 (зелений світлофільтр) до 0,320 од. опт. густини, додають 2 мл. 0,5 % NaCl і проводять визначення оптичної густини. Пробірку інкубують в

термостаті при 37⁰С 3 години, після чого проводять повторну колориметрію. Лізис мікробних клітин не повинен перевищувати 15 %.

Добову культуру *M. Lysodeicticus* змивають стерильним 0,5 % NaCl. Суспензію стандартизують на КФК-3 до екстенкції 0,320, що відповідає вмісту 1 млрд. мікробних клітин в 1 мл суспензії. “Нуль” на КФК-3 виставляється проти кювети з 0,5 % NaCl.

Тестовану сироватку крові готують у розведенні 1:2 (сироватку ВРХ 1:1), використовують стерильний розчин 0,5 % NaCl. До 2 мл розведеної сироватки крові додають 2 мл стандартизованої суспензії мікробної культури. Для контролю використовують 2 мл 0,5 % NaCl і 2 мл суспензії *M. Lysodeicticus*.

Проби колориметрують у кюветах 10 мм при зеленому світлофільтрі, інкубують 3 години у термостаті при 37⁰ С після чого колориметрують повторно. Розрахунок лізису проводять за такою формулою:

$$L = ((D_0 - D_1) / D_0) - (D_{k0} - D_{k1}) / D_{k0} \times 100\%, \text{ де}$$

L – % лізису,

D₀ – оптична густина досліджуваних кювет до інкубації,

D₁ – оптична густина досліджуваних кювет після інкубації,

D_{k0} – оптична густина контрольних кювет до інкубації,

D_{k1} – оптична густина контрольних кювет після інкубації.

Оскільки сироватку крові великої рогатої худоби використовують у розведенні 1:1, що впливає на оптичну густина рідини, то слід додатково ставити контроль з СК у розведенні 1:3 (1 мл СК і 3 мл 0,5 % NaCl) і отримані дані вираховувати з показів дослідних кювет.

Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів

Матеріали і реактиви: М'ясо-пептонний агар, фізіологічний розчин, дистильована вода, культура *St. aureus* або *E. Coli*,

фіксатор для мазків (метанол, етанол), фарба Романовського-Гімза, масло емерсійне для мікроскопії.

Обладнання: мікроскоп, пробірки, піпетки, штативи, КФК-3, термостат.

Хід визначення: Гепаринізовану кров вносять в пробірки в кількості 0,2 мл і додають стандартизований до 2 млрд/мл завис добової культури *E. Coli*, ставлять на водяну баню при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ на 30 хв. Потім готують мазки і фарбують за Романовським-Гімза. У кожному мазку підраховують 100 нейтрофілів. В якості показника фагоцитозу визначають ФА за кількістю активних клітин з 100 підрахованих (%), ФІ за кількістю фагоцитованих мікробних тіл, яка припадає на один активний нейтрофіл, ФЧ – кількість фагоцитованих мікробних тіл на 100 підрахованих нейтрофілів.

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

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

$$\text{ФА} = \text{к-ть фагоцитованих мікроорганізмів} / 100.$$

Визначення імуноглобулінів в сироватці крові

Принцип методу. Метод базується на здатності цинку сульфату змінювати структуру білкових молекул Ig, в наслідок чого розчин мутніє.

Реактиви: 10 % розчин оцтової кислоти, 18 % розчин цинку сульфату, ізотонічний розчин натрію хлориду, вода дистильована.

Обладнання: КФК, центрифуга, кювети 5 мм, термостат, колби мірні, папір фільтрувальний, ваги лабораторні, пробірки лабораторні скляні на 5; 10; 20 см³, пробірки скляні центрифужні з конічним дном, піпетки, петля бактеріологічна дротяна.

Хід визначення: У пробірки вносять по 3,8 см³ 18 % розчину цинку сульфату і додають по 0,1 см³ досліджуваної сироватки. Через 10–15 хв вміст пробірок фотокolorиметрують при довжині хвилі 400 нм у кюветі з робочою товщиною 5 мм. Контролем є 18

% розчин цинку сульфату. Вміст імуноглобулінів визначають згідно з калібрувальним графіком або за таблицею 1.

Таблиця 1

Оптична густина	Вміст Ig, мг/мл	Оптична густина	Вміст Ig, мг/мл	Оптична густина	Вміст Ig, мг/мл
0,17	4,28	0,55	12,4	1,05	23,4
0,18	4,50	0,60	13,6	1,1	24,6
0,19	4,72	0,65	14,6	1,15	25,8
0,20	4,94	0,70	15,8	1,2	26,8
0,25	5,80	0,75	16,8	1,25	28,0
0,30	6,80	0,80	17,8	1,3	29,0
0,35	8,00	0,85	19,0	1,35	30,1
0,40	9,00	0,90	20,2	1,4	31,2
0,45	10,00	0,95	21,2	1,45	32,3
0,5	11,40	1,0	22,3	1,5	33,4

Визначення циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові

Суть методу полягає у визначенні вмісту ЦІК – високомолекулярних білкових сполук, які утворюються в організмі тварин при взаємодії антигенів та антитіт і є показником реактивності організму, що дозволяє зробити висновок про ступінь запального процесу в організмі при наявності інфекції.

Метод ґрунтується на властивостях малих концентрацій ПЕГ викликати приципітацію імунних комплексів.

Реактиви: 0,1 М боратний буфер (рН 8,4), 4 % розчин ПЕГ.

Приготування 0,1 боратного буферу: 3,410 г борної кислоти, 4,275 г бури ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм до 1 л у мірній колбі, рН розчину повинен становити 8,4.

Приготування робочого розчину ПЕГ: готують 4 % розчин–6000 розчиняють у 240 боратному буфері: наважку 10 г ПЕГ-6000 розчиняють у 240 мл боратного буферу.

Проведення досліджень: досліджувану сироватку крові розводять у співвідношенні 1:2 боратним буфером. Для цього в чисту пробірку вносять дозатором 0,3 мл сироватки крові та 0,6 мл боратного буферу. З цього розведення вносять дозатором по 0,3 мл у 2 пробірки: дослідну 2,7 мл 4 % ПЕГ і контрольну з 2,7 мл боратного буфера. Вміст пробірок ретельно перемішують і інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі з наступним вимірюванням проб в КФК-3 у кюветі об'ємом 10 см³.

Оптичну щільність розчинів у кожній серії вимірюють за довжиною хвилі 450 нм.

$P = (P_0 - P_k) \times (P_d - P_b)$, де:

P_0 – відсоток світлопропускання дослідного зразка;

P_k – відсоток світлопропускання контрольного зразка;

P_d – відсоток світлопропускання 4 % ПЕГ;

P_b – відсоток світлопропускання боратного буферу;

P – підсумковий результат проби у відсотках світлопропускання або в одиницях оптичної щільності.

Одержаний за формулою результат виражають в одиницях оптичної щільності. При множенні цього показника на 1000 отримують вміст імунних комплексів у 100 мл сироватки крові.

4.3 Узагальнення та систематизація знань (10 хв).

Викладач опитує 4-5 студентів, з'ясовує ступінь засвоєння теми даного заняття; виставляє оцінки опитаним з урахуванням їх активності та якості виконаної ними роботи.

Контрольні питання:

1. Що таке фагоцитоз?
2. Назвіть центральні і периферичні органи імунної системи.
3. Класифікація і функція Т- і В-лімфоцитів?
4. Від чого залежить фагоцитарна активність у тварин?
5. Від яких факторів залежить рівень сироваткових імуноглобулінів?

6. Під дією яких факторів зовнішнього середовища відмічається зниження БАСК?

4.4 Обговорення отриманих даних, висновки і пропозиції щодо проведеної роботи, оформленням протоколу (15 хв).

Студенти в присутності всієї групи доповідають викладачу результати роботи, в дискусійній формі аналізують отримані дані, викладач підписує протокол.

4.5. Видача домашнього завдання та оголошення питань для тематичної самостійної роботи (3 хв).

Механізм захисту організму. Центральні і периферичні органи імунної системи. Резистентність та фактори, що впливають на неї. Клітини імунної системи. Цитокіни-медіатори імунної системи. Клінічне значення показників резистентності.

Упорядкування робочого місця (чергові студенти упорядковують манеж), інструменти та ін.