

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ІМУНОЛОГІЯ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до лабораторних занять та самостійної роботи
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
денної форми навчання
спеціальності 091 Біологія та біохімія

Одеса
ОНУ імені І. І. Мечникова
2026

УДК 57.083.3(075.8)
I-551

Укладачі:

Т. О. Філіпова, доктор біологічних наук, професор кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології;

Т. В. Гудзенко, кандидат біологічних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології;

О. Ю. Зінченко, кандидат біологічних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології;

М. Б. Галкін, кандидат біологічних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології.

Рецензенти:

О. А. Макаренко, доктор біологічних наук, завідувачка кафедри фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти;

С. С. Чернадчук, кандидат біологічних наук, доцент кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики.

Рекомендовано вченою радою біологічного факультету

ОНУ імені І. І. Мечникова.

Протокол № 5 від 14 грудня 2024 р.

I-551 **Імунологія** [Електронний ресурс] : електрон. метод. рек. до лаб. занять та самост. роботи для здобувачів першого (бакалавр.) рівня вищ. освіти ден. форми навчання спец. 091 Біологія та біохімія / уклад.: Т. О. Філіпова, Т. В. Гудзенко, О. Ю. Зінченко, М. Б. Галкін. Одеса : ОНУ імені І. І. Мечникова, 2026. 61 с. 1,9 МБ.

Методичні рекомендації до лабораторних занять та самостійної роботи містять теоретичні відомості, детальні протоколи виконання лабораторних робіт та завдання для самостійної роботи, які є необхідними для успішного засвоєння здобувачами дисципліни «Імунологія». Наведено інформацію стосовно основних засад практичної імунології, надано методики вивчення структурно-функціональної організації імунної системи, дослідження реакцій взаємодії імуноглобулінів з антигенами. Видання дозволяє сформулювати у студентів уявлення про організацію імунної системи як однієї з інтегративних систем організму, її біологічні функції, будову і функціонування її основних елементів. Розраховано для здобувачів першого (бакалаврського) рівня, що навчаються за спеціальністю 091 Біологія та біохімія.

УДК 57.083.3(075.8)

ЗМІСТ

	Стор.
Загальні відомості.....	4
Лабораторне заняття 1. Організація імунологічної лабораторії. Правила роботи та техніки безпеки. Методи підготовки посуду і матеріалів. Утилізація біоматеріалів.....	6
Лабораторне заняття 2. Структурно-функціональна організація імунної системи. Дослідження топографії органів імунної системи та будови лімфовузлів.....	12
Лабораторне заняття 3. Реакції антиген-антитіло. Реакції преципітації та їх різновиди. Поняття про зони еквівалентності. Визначення вмісту антитіл по Манчині.....	21
Лабораторне заняття 4. Реакції антиген-антитіло. Реакції аглоїтинації та їх різновиди. Реакція гемаглоїтинації та її застосування для визначення груп крові.....	31
Лабораторне заняття 5. Імуноферментний, імунофлуоресцентний та радіоімуний аналізи. Їх принципи та практичне застосування. Дослідження вмісту антитіл до певного антигену імуноферментним методом.....	44

Загальні відомості

Сучасна імунологія є самостійною науковою галуззю, яка займає одне з центральних місць серед біологічних дисциплін. В останні десятиліття інтерес до проблем імунології виріс, що визначається рядом факторів. Однією з особливостей здоров'я населення зараз є суттєвий ріст патології, асоційованої з порушеннями діяльності імунної системи (імунодефіцитні стани, алергічні захворювання, аутоімунні, пухлинні процеси, інфекції імунної системи та ін.). Разом з тим саме з успіхами імунології пов'язують розв'язання таких проблем, як одержання нових високоефективних діагностичних і лікарських препаратів методом імунобіотехнології, здолаття інфекційних захворювань на принципово нових підходах (гено-інженерні вакцини), розшифрування механізмів найбільш важких захворювань людини. Успіхи імунології широко використовуються в біології, медичній практиці, тому майбутньому біологу необхідні глибокі знання в області

Лабораторні заняття з дисципліни «Імунологія» є надзвичайно важливими для її успішного засвоєння, а також проводяться з метою формування спеціаліста-біолога у цілому. Лабораторні заняття з дисципліни «Імунологія» забезпечують практичну підготовку здобувачів, надаючи їм основні вміння та навички при роботі з антигенами та антитілами, які є важливими для подальшого працевлаштування у медико-діагностичних та наукових лабораторіях.

Дисципліна викладається у першому семестрі четвертого курсу. Для її успішного засвоєння необхідними є знання з курсів «Мікробіологія», «Вірусологія», «Загальна біотехнологія», «Анатомія людини», «Фізіологія людини та тварин», «Хімія біоорганічна», «Біохімія». Постреквізитами курсу є «Імунобіотехнологія», «Імуногенетика» та ін.

Мета – сформувати систему знань з імунології, ознайомити студентів із базовими принципами структурної організації та функціонування імунної системи і найбільш важливих біополімерів, що беруть участь в імунному розпізнаванні чужорідних структур в організмі та в регуляції імунних реакцій.

Завдання:

- 1) Сформувати уявлення про місце імунології серед біологічних наук, її роль і значення для розвитку науки і суспільства, загальні закономірності еволюційного розвитку захисних механізмів у тварин;
- 2) навчити орієнтуватись у структурній організації імунної системи, окремих органів та тканин, імунних функціях клітин організму в захисті від патогенів різного походження та власних трансформованих клітин;
- 3) сформувати уявлення про принципи будови антиген-розпізнавальних рецепторів та інших макромолекул, що беруть участь в імунному захисті;
- 4) дати студентам можливість усвідомити молекулярні механізми функціонування клітин імунної системи та реалізації ними ефекторних функцій у захисті макроорганізму;
- 5) сформувати уявлення про протиінфекційний, протипухлинний, трансплантаційний імунітет; надати знання про імунопатологічні стани: реакції гіперчутливості I-IV типів, первинні і вторинні імунодефіцити.

Очікуванні результати:

У результаті вивчення навчальної дисципліни здобувач вищої освіти повинен

Знати:

1. структурну організацію імунної системи;
2. види імунітету: вроджений та набутий, їх спільні та відмінні риси;
3. характеристики антигенів та їх різновиди;
4. будову та властивості молекул, що беруть участь в імунній відповіді: імуноглобуліни, рецептори, цитокіни;
5. реакції гуморальної та клітинної імунної відповіді, та динаміку її розвитку.

Вміти:

1. орієнтуватися у загальних та прикладних аспектах імунології;
2. застосовувати імунологічні методи для вирішення певних дослідницьких завдань;
3. обґрунтовано доводити необхідність профілактичних щеплень для конкретної людини та суспільства в цілому.

Лабораторне заняття 1

Організація імунологічної лабораторії.

Правила роботи та техніки безпеки.

Методи підготовки посуду і матеріалів. Утилізація біоматеріалів

Мета заняття – ознайомлення з організацією імунологічної лабораторії, технікою безпеки і правилами роботи в ній.

Питання для підготовки до заняття:

1. Облаштування імунологічної лабораторії і правила роботи в ній
 - облаштування лабораторій з різним ступенем безпеки;
 - підготовка лабораторії до роботи;
 - ламінарні бокси;
 - правила роботи з біоматеріалами;
 - обробка біоматеріалів та посуду;
 - ведення журналу лабораторних досліджень.
2. Лабораторний посуд та розчини.

Теоретичні відомості:

Імунологічна лабораторія – це комплекс приміщень, обладнання і приладів, що дозволяють використовувати різноманітні методи дослідження імунної системи та імунологічні методи діагностики. Лабораторія включає кімнати для мікробіологічних досліджень та підсобні приміщення.

Кімнати для імунологічних досліджень (навчальні лабораторії) – світлі, просторі, стіни покриті кахельною плиткою, підлога – лінолеумом або плиткою з метою спрощення їх миття та дезінфекції (рис. 1.1). Лабораторні столи мають бути добре освітленими і обладнаними газовою горілкою або спиртівкою для забезпечення асептичної роботи з мікроорганізмами. На лабораторних столах мають обов'язково стояти ємкості з дезрозчином для відпрацьованого матеріалу. Крім того, на робочих столах розміщуються штативи з пінцетами, пробірками та іншим інструментом, автоматичні піпетки та наконечники для них, ексикатори для приготування забарвлених мікроскопічних препаратів, мікроскопи для їх обстеження та ін. У робочих кімнатах також знаходяться термостати, які є шафами де підтримується оптимальна температура для проведення імунологічних реакцій, а також холодильники з режимом +4 °С для

зберігання реактивів та біоматеріалів.



Рис. 1.1. Приклад навчальної лабораторії для імунологічних досліджень з необхідним для роботи устаткуванням (фото доцента Мерліча А.Г.)

Правила роботи та техніки безпеки, яких необхідно дотримуватися в імунологічній лабораторії.

На лабораторних заняттях з курсу “Імунологія” проводяться дослідження біоматеріалу, що належить до групи потенційно інфікованого (кров, суспензія клітин, сироватка, плазма). Це потребує дотримання основних вимог техніки безпеки та санітарно-протиепідемічного режиму. До основних заходів, спрямованих на підтримку санітарного режиму, належить проведення дезінфекції, дотримання вимог асептики та стерилізації.

Для кожної лабораторної роботи має бути організоване робоче місце з усім необхідним для виконання завдання:

- розчини реактивів;
- штатив із пробірками, піпетки;
- предметне та покривне скло, камера Горяєва, мікроскоп, інше обладнання, яке використовується при виконанні завдання;

- інструкція проведення даного дослідження.

Правила роботи в лабораторії:

- роботу з біоматеріалом проводять у халатах, шапочках, рукавичках;
- на робочому місці не повинні знаходитись сторонні речі;
- на робочому столі повинна знаходитись ємність з дезінфікуючим розчином (0,5 % розчин хлорного вапна, 1% розчин хлораміну);
- робоче місце після роботи дезінфікують;
- при потрапленні біоматеріалу на спецодяг чи робочу поверхню місце дезінфікують, одяг замочують у дезінфікуючому розчині;
- використані пробірки, інструменти, що контактували з біоматеріалом, дезінфікують у відповідних маркованих ємностях з дезінфікуючим розчином;
- після виконання завдання проводять обробку використаного обладнання: центрифугу та іонометр протирають дезінфікуючим розчином; об'єктив мікроскопа протирають сухою матерією, окуляри – 70% спиртом;
- в кінці заняття робоче місце прибирають, рукавички занурюють у відповідну марковану ємність з дезінфікуючим розчином, миють руки.

Обробка лабораторного посуду:

- лабораторний посуд промивають у ємності з водою. Промивні води знезаражують шляхом кип'ятіння протягом 30 хв або сухим хлорним вапном (200 г/л), перемішують і залишають на 60 хв;
- скляні пробірки після вивільнення біоматеріалу складають у марковану ємність, заливають дезінфікуючим розчином, і після години інкубації пробірки проходять етап передстерилізаційної обробки і стерилізації; ємність для проведення дезінфекції має бути чітко маркована, мати кришку;
- пластиковий одноразовий посуд після обробки в дезінфікуючому розчині складають у спеціальний пакет для лабораторних відходів;
- пластиковий посуд багаторазового використання після обробки дезрозчином (6% розчином гідрогену пероксиду) ретельно промивають проточною, потім дистильованою водою, висушують і готують до роботи;
- капіляри, предметне скло, аглютинаційні пробірки стерилізують у сухожаровій шафі за температури 180 °C протягом 1 год. Стерильність зберігається протягом 3 діб.

Утилізація біоматеріалу:

- згустки крові збирають у спеціальну марковану ємність і засипають сухим хлорним вапном у відношенні 1 частина сухого хлорного вапна і 5 частин згустків крові;
- залишки слини обробляють таким самим чином;
- залишки сироватки зливають у марковану ємність і заливають дезінфікуючим розчином у відношенні 1:5.

Завдання 1. Знайомство з мікробіологічною лабораторією

Хід роботи:

1. Ознайомитись з структурою навчальної імунологічної лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології і правилами роботи в ній.
2. Подивитися за наступними посиланнями фільми щодо обладнання діагностичних та науково-дослідних імунологічних лабораторій:
<https://www.youtube.com/watch?v=LYz9yOtBGjg>
<https://www.youtube.com/watch?v=omH1tOE9bUw>
https://www.youtube.com/watch?v=5h_OIzzN4pM List of Equipments in Immunology lab
<https://www.youtube.com/watch?v=yeViT-We-YA> Makerere University Virtual Lab Tour: Immunology Laboratory MakCHS
3. Заповнити таблицю 1.1.

Таблиця 1.1

Обладнання імунологічних лабораторій різних типів

Тип лабораторії	Обладнання
Навчальна лабораторія	
Діагностична лабораторія	
Науково-дослідна лабораторія	

Завдання для самостійної роботи:

Питання для перевірки знань:

1. Що таке імунологічна лабораторія? З чого вона складається? Які є типи імунологічних лабораторій?
2. Наведіть приклади приладів, інструментів та обладнання, які знаходяться а навчальній імунологічній лабораторії та використовуються у роботі?

3. Перерахуйте правила роботи та техніки безпеки, яких необхідно дотримуватися в імунологічній лабораторії.

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань:

1. До підсобних приміщень імунологічної лабораторії належить:
А) робоча кімната;
Б) стерилізаційна кімната;
В) кімната для досліджень;
Г) усі варіанти вірні.
2. Склопосуд найчастіше стерилізують:
А) автоклавують;
Б) ультрафіолетом;
В) сухим жаром;
Г) кип'ятінням.
3. Стерилізація прокалювання у полум'ї спиртівки носить назву:
А) пастеризація;
Б) фламбування;
В) автоклавують;
Г) тиндалізація.
4. Стерилізація гарячим паром під тиском називається:
А) автоклавують;
Б) фламбування;
В) пастеризація;
Г) тиндалізація.
5. Яке із тверджень є вірним?:
А) В автоклаві найчастіше стерилізують скляний посуд та металеві інструменти;
Б) в сухожаровій шафі стерилізують об'єкти із пластика та резини;
В) фламбуванням стерилізують наконечники для дозаторів, поверхні та розчини;
Г) для стерилізації робочих поверхонь використовують дезінфектанти та ультрафіолетове світло.
6. Яке із тверджень є хибним:
А) У кімнатах для імунологічних досліджень проводять роботу з біоматеріалами;

- Б) в автоклавній кімнаті здійснюється стерилізація ;
- В) у мийній кімнаті миють, сушать та стерилізують лабораторний посуд;
- Г) у матеріальній кімнаті зберігаються реактиви, необхідні для роботи з мікроорганізмами.

Ситуаційні задачі:

1. Уявіть собі, що при роботі з біоматеріалом пробірка випадково розбилася. Досліджуваний матеріал потрапив на шкіру рук та на стіл. Якими будуть ваші дії?

Список літератури:

1. Вершигора А.Ю. Імунологія / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо та ін. – Київ : Вища школа, 2005. – 599 с. Оновлено 2020. <https://surl.li/dgkjtz>
2. Іонов І.А. Сучасна імунологія (курс лекцій) І.А. Іонов, Т.Є. Комісова, О.М. Сукач, О.О. Катеринич – Х.: ЧП Петров В.В., 2017. – 107 с. <https://dspace.hnpu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/d83c7215-7e4e-4d25-bad653fa9aed69/content>
3. Основи імунології : лабораторний практикум / уклад. : К. Г. Гаркава, А. В. Дращнікова. – К. : НАУ, 2015. – 60 с.

Електронні та інформаційні ресурси:

1. https://www.tru.ca/_shared/assets/Microbiology_Lab_Safety39696.pdf
2. [https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_\(Lee\)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory](https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_(Lee)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory)
3. <https://www.immunology.org/public-information/what-is-immunology>
4. <https://www.jimmunol.org/>

Лабораторне заняття 2

Структурно-функціональна організація імунної системи. Дослідження топографії органів імунної системи та будови лімфовузлів

Мета заняття: Ознайомлення з органами, тканинами, клітинами та функціями імунної системи.

Питання для підготовки до заняття:

1. Складові імунної системи.
2. Центральні та периферичні органи імунної системи.
3. Імунна система слизових оболонок.
4. Клітини імунної системи. Т- та В-лімфоцити, їх походження та функції.

Теоретичні відомості

Імунна система – сукупність органів, тканин і клітин (рис.2.1), які забезпечують захист організму від чужорідних агентів; система організму, яка контролює сталість клітинного і гуморального складу організму. Знищенню імунною системою підлягає *генетично чужорідне*: молекули інших організмів, мікробні клітини, молекули, до яких утворюються антитіла; крім того, імунна система може реагувати на власні клітини та тканини, що зазнали пошкодження або злоякісно трансформовані.

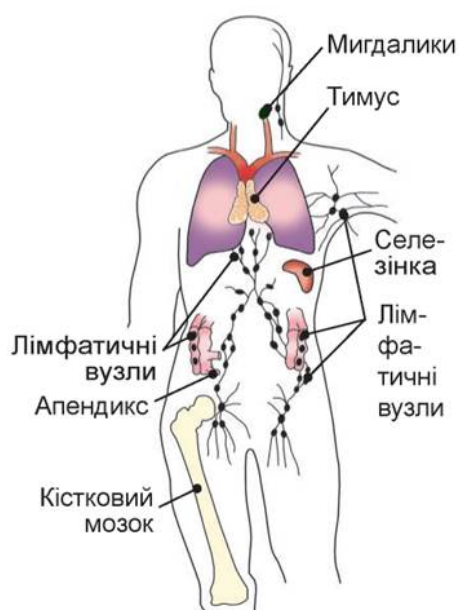


Рис. 2.1. Розташування органів імунної системи людини

Імунний захист організму поділяється на вроджений імунітет, який забезпечує негайний захист від мікробної інвазії, та набутий імунітет, який розвивається повільніше та забезпечує більш спеціалізований захист від інфекцій. Вроджений або природний імунітет завжди присутній у здорових індивідів, націлений на блокування вторгнення мікробів та їх швидку елімінацію у разі успішного проникнення у тканини господаря. Придбаний (специфічний або адаптивний) імунітет для забезпечення ефективного захисту вимагає проліферації та диференціювання лімфоцитів у відповідь на різні антигени (тобто він адаптується до специфічної реакції на чужорідний матеріал). Філогенетично вроджений імунітет є більш старим, а більш спеціалізований і сильний адаптивний сформувався пізніше.

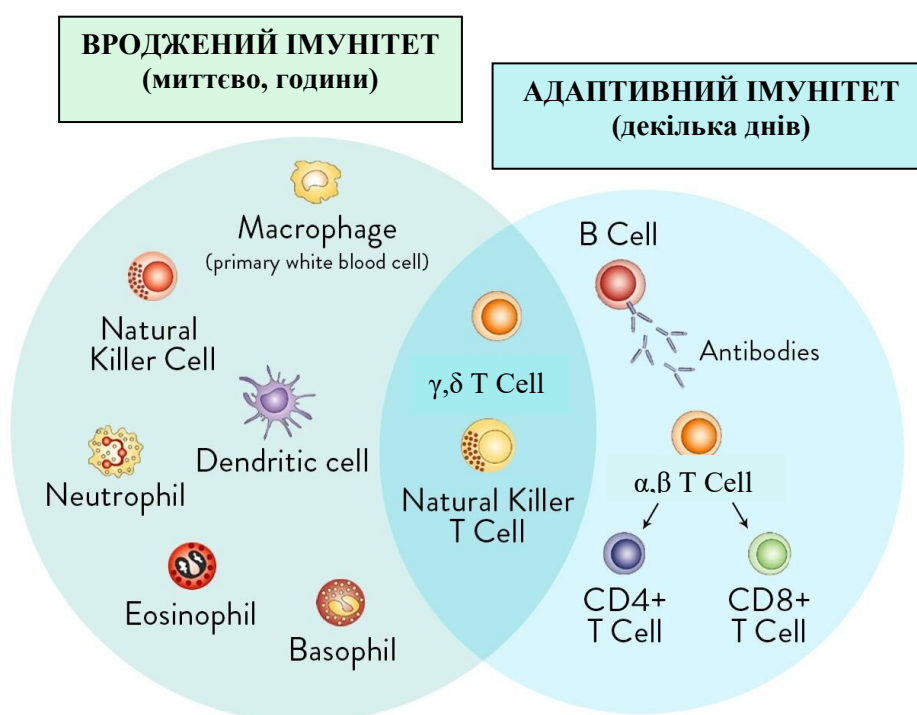


Рис. 2.2. Клітини, що беруть участь у вродженому та адаптивному імунітеті

Завдання 1. Ознайомитися з локалізацією в організмі основних органів и тканин імунної системи, їх анатомією та морфологією (тимус, селезінка, лімфатичні вузли, кістковий мозок, периферична кров). Визначення інтегральних показників стану лімфоїдних органів: абсолютної та відносної маси.

В ході виконання роботи необхідно звернути увагу студентів на дифузний характер локалізації лімфоїдної тканини в організмі, розглянути

морфологію основних типів клітин, що приймають участь в захисних реакціях (макрофаги, лімфоцити, нейтрофіли).

Доцільно також закріпити знання про існування популяцій та субпопуляцій лімфоцитів; функцій, які вони виконують в процесі розвитку імунної відповіді; уявлення про CD-молекули як маркери належності клітин до тих чи інших популяцій або субпопуляцій та їх функціонального стану.

Практичне завдання:

1. Розглянути розташування тимуса, селезінки, лімфовузлів, печінки та тонкого кишечника у порожнині тіла миші. Визначити форму та колір основних лімфоїдних органів і зарисувати їх.
2. Виділити тимус, селезінку та правий і лівий пахвові лімфовузли, визначити їх масу та розрахувати органні індекси.
3. Отримати клітинні суспензії з цих органів, підрахувати кількість ядерних клітин в них та приготувати мазки.
4. Розглянути під мікроскопом гістологічні зрізи лімфоїдних органів (готові препарати) та мазки. Зарисувати будову тимуса, селезінки та лімфатичних вузлів, визначити клітинний склад досліджуваних органів та відсоток основних типів клітин в них.

Матеріали та обладнання:

1. Мікроскопи.
2. Скляний гомогенізатор.
3. Фізіологічний розчин.
4. Пінцети, ножиці.
5. Пробірки, піпетки (1, 2, 5 мл).
6. Готові гістологічні препарати.
7. Камери Горяєва.
8. Миші.

Хід роботи:

1. Мишей зважити і потім декапітувати, одночасно зібрати кров у конічну пробірку.
2. Краплину крові нанести на предметне скло та приготують мазок.
3. Тіло миші закріпити на препарувальному столику черевцем догори і зробити подовжній розтин.
4. Знайти тимус, селезінку, пахвові лімфовузли та виділити їх, помістити у фізіологічний розчин. Привернути увагу на розташування у черевної

порожнині печінки та тонкого кишечника, як органів, що містять значну кількість макрофагів та лімфоїдної тканини.

5. Позначити на рисунку 2.3 розташування основних органів імунної системи миші:

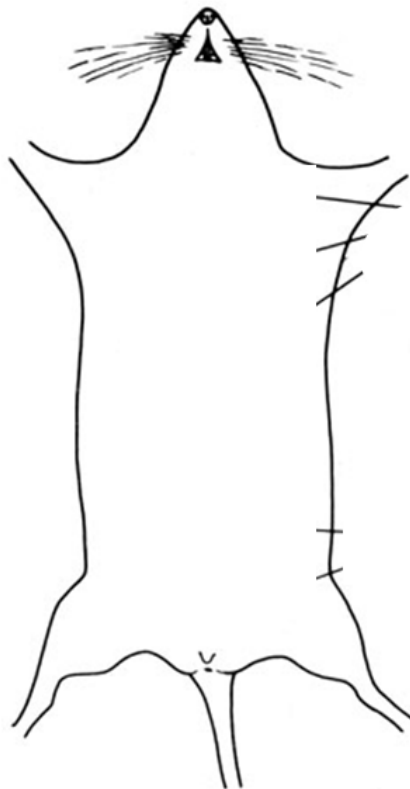


Рис. 2.3. Розташування головних органів імунної системи миші.

6. Тимус, селезінку та лімфовузли зважити на торзійних вагах та розрахувати відповідні органні індекси за формулою:

$$\text{МАСА ОРГАНА, мг / МАСА МИШІ, г} \times 100 \%$$

Завдання 2. Визначити кількість ядерних клітин у тимусі, селезінці та лімфатичних вузлах мишей.

Для одержання клітинної суспензії

1. помістити орган у скляний гомогенізатор і додати необхідний об'єм фізіологічного розчину (4 мл для селезінки, 2 мл для тимуса, 1 мл для лімфовузлів).
2. За допомогою скляного пестика обережно роздавити орган, поки всі клітини не перейдуть у розчин.

3. Суспензію профільтрувати скрізь декілька шарів марлі у чистій пробірці і
4. Підраховати кількість ядерних клітин. Для цього 0,1 мл завіси додати до 1,9 мл 3% розчину оцтової кислоти підфарбованого метиленовим синім, перемішують і поміщають у камеру Горяєва.
5. Рахувати під мікроскопом кількість клітин у 5 великих квадратах камери по діагоналі (А). Розраховувати кількість клітин у 1 мл суспензії за формулою:

$$A \times 20 \times 5 \times 10^4, \text{ де}$$

20 – коефіцієнт розведення суспензії розчином оцтової кислоти; 5×10^4 – коефіцієнт, що враховує об'єм камер Горяєва.

Для визначення кількості клітин у всьому органі отриману величину помножують на об'єм суспензії.

6. Результати представити у вигляді таблиці (табл. 2.1):

Таблиця 2.1

Абсолютна і відносна маса лімфоїдних органів та вміст в них клітин

Об'єкт	Абсолютна маса, г або мг	Відносна маса органів, %	Кількість ядерних клітин в органах $\times 10^6$
Миша			
Тимус			
Селезінка			
Пахвові вузли: лівий + правий			

Завдання 3. Розглянути під мікроскопом готові препарати гістологічних зрізів тимуса, селезінки та лімфовузлів і замальовати їх будову.

Завдання для самостійної роботи:

1. Подивіться навчальні відео за темою заняття

Первинні та вторинні органи імунної системи:

<https://www.youtube.com/watch?v=A4zPntLis-k>

Лімфатичні вузли та селезінка:

<https://www.youtube.com/watch?v=9lo46CZYY4E>

Органи кровотворення та імунного захисту:

<https://www.youtube.com/watch?v=HpgKPMUPxZA>

Імунна система. Гістологія: <https://www.youtube.com/watch?v=rqcwDVeTrdI>

2. Позначьте на рисунку 2.4 назви органів лімфоїдної системи людини

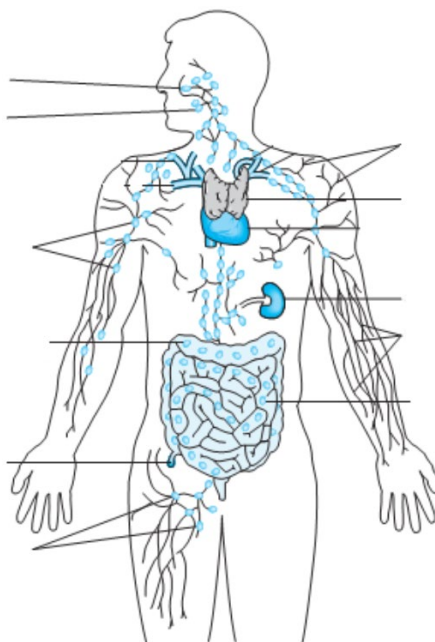


Рис. 2.4. Органи імунної системи людини

3. Позначьте на рисунку 2.5 основні структури лімфатичного вузла (капсулу, первинні та вторинні фолікули, коркову та медулярну зони, вхідні та вихідні лімфатичні судини):

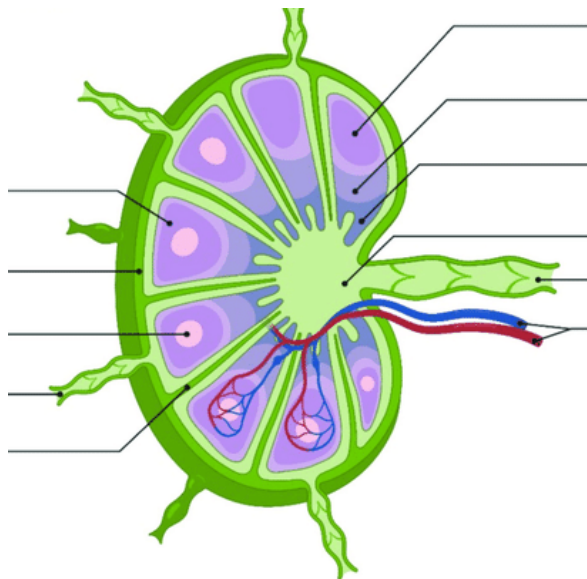


Рис. 2.5. Будова лімфатичного вузла

Питання для перевірки знань:

1. Будова імунної системи.
2. Первинні (центральні) органи імунної системи людини та їх функції.
3. Вторинні (периферичні) органи імунної системи людини та їх функції.
4. Центральні органи імунної системи птахів.
5. Будова тимусу.
6. Будова селезінки.
7. Будова лімфатичних вузлів.
8. Імунна тканина слизових оболонок.
9. Вроджений та набутий імунітет.
10. Клітини імунної системи.
11. Популяції та субпопуляції лімфоцитів.

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань:

У ссавців лімфоцити набувають властивості Т-клітин у:

1. Тимусі
2. Селезінці
3. Лімфатичних вузлах
4. Червоному кістковому мозку

У птахів лімфоцити набувають властивості В-клітин у:

1. Селезінці
2. Бурсі
3. Лімфатичних вузлах
4. Червоному кістковому мозку

У ссавців лімфоцити набувають властивості В-клітин у:

1. Тімусі
2. Селезінці
3. Лімфатичних вузлах
4. Червоному кістковому мозку

Специфічні імунні реакції здійснюють:

1. Натуральні кілери
2. Макрофаги
3. Т- і В-лімфоцити
4. Нейтрофіли

Вроджений імунітет захищає організм від:

1. будь-яких антигенів
2. одного конкретного антигену
3. тільки від бактерій
4. тільки від вірусів

Специфічні реакції імунітету формуються у відповідь на:

1. на будь-які антигени
2. один конкретний антиген
3. тільки на білкові молекули
4. тільки на полісахаридні молекули

У центральних органах імунної системи формуються:

1. Макрофаги
2. Еритроцити
3. Т- і В-лімфоцити
4. Нейтрофіли

Список літератури:

1. Вершигора А.Ю. Імунологія / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо та ін. – Київ : Вища школа, 2005. – 599 с. Оновлено 2020.
<https://surl.li/dgkjtz>
2. Іонов І.А. Сучасна імунологія (курс лекцій) І.А. Іонов, Т.Є. Комісова, О.М. Сукач, О.О. Катеринич – Х.: ЧП Петров В.В., 2017. – 107 с. <https://dspace.hnpu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/d83c7215-7e4e-4d25-bad653fa9aed69/content>
3. Основи імунології : лабораторний практикум / уклад. : К. Г. Гаркава, А. В. Дrajнікова. – К. : НАУ, 2015. – 60 с.
4. Імунологічні методи : метод. вказівки до проведення лаб. занять з курсу «Імунологія» / Т. О. Філіпова, Т. В. Гудзенко, М. Б. Галкін, О. Ю. Зінченко, Г. В. Ямборко, М. Ю. Русакова. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2018. – 90 с.

Електронні та інформаційні ресурси:

1. https://www.tru.ca/_shared/assets/Microbiology_Lab_Safety39696.pdf
2. [https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_\(Lee\)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory](https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_(Lee)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory)
3. <https://www.immunology.org/public-information/what-is-immunology>
4. <https://www.jimmunol.org/>

Лабораторне заняття 3

Реакції антиген-антитіло. Реакції преципітації та їх різновиди. Поняття про зони еквівалентності. Визначення вмісту антитіл по Манчіні

Мета заняття: Ознайомитися з принципами та галуззю застосування реакції преципітації, опанувати методику постановки реакції преципітації.

Питання для підготовки до заняття:

1. Будова імуноглобулінів.
2. Антигени та їх властивості.
3. Взаємодія антитіл з антигенами. Імунні комплекси.
4. Різновиди реакцій взаємодії антитіл з антигенами.
5. Ознайомитися з методикою визначення вмісту імуноглобулінів за Манчіні

Теоретичні відомості:

Реакція преципітації (РП) (від лат. *praecipitatio* – осадження) – осадження комплексу розчинного антигену з антитілом. Реакція преципітації вперше була описана у 1897 р. вченими Краусом та Чистовичем, які відзначили, що фільтрати бульйонних культур бактерій у присутності певних сироваток, що мають імунні гомологічні антитіла, дають утворення візуально помітного осаду.

Принцип реакції. В основі реакції преципітації лежить агрегація та утворення осаду комплексів антиген-антитіло. При цьому антиген має назву преципітиноген, антитіло – преципітин, утворюється комплекс – преципітат (рис. 3.1). Відрізняє реакцію преципітації від реакції аглютинації те, що у першій – антиген розчинний, у другій – корпускулярний.

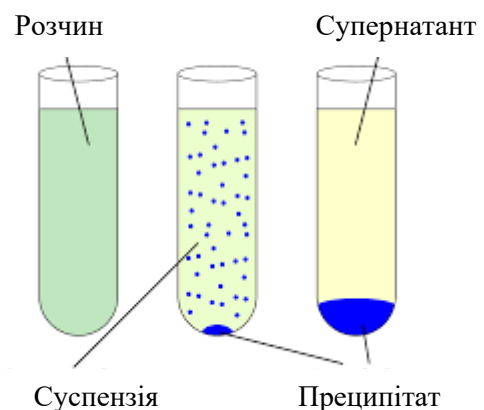
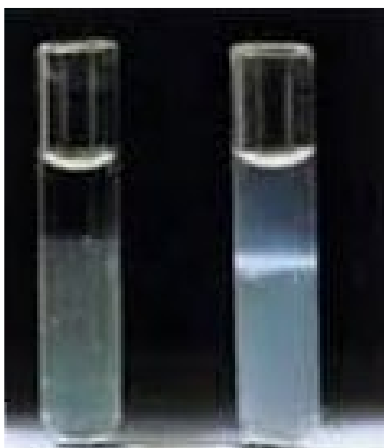


Рис. 3.1. Фото пробірок з преципітатом та схема реакції

Антигеном можуть слугувати екстракти та лізати мікроорганізмів, тканин, органів, складні високомолекулярні сполуки та хімічно чисті речовини. Преципітуючу сироватку отримують шляхом гіперімунізації тварин (коней, овець, кролів) відповідним антигеном. Така сироватка має високий титр антитіл (не менш 1:100000).

Феномен реакції: антитіла, з'єднуючись з антигенами, викликають їх агрегацію, що візуально виявляється помутнінням прозорих рідин та утворенням осаду. Осадження з рідин комплексів АГ-АТ відбувається тільки у діапазоні еквівалентних співвідношень концентрацій взаємодіючих молекул (рис. 3.2). У разі надмірної кількості одного з реагентів утворюється розчинний комплекс і феномен реакції не проявляється.

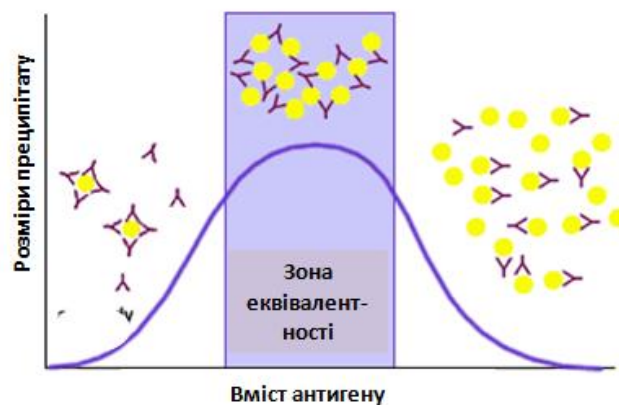


Рис. 3.2. Залежність розмірів преципітату від концентрацій антигену та антитіл

Основні методи проведення реакції преципітації: реакція кольцепреципітації та реакція преципітації в агарі (гелі).

Ця реакція застосовується для діагностики епідемічного цереброспінального менінгіту, чуми, дизентерії. Особливе значення має реакція термопреципітації Асколі, яку використовують для визначення інфікованості збудником сибірки продуктів і матеріалів тваринного походження.

Реакцію преципітації використовують:

- у судовій медицині для визначення видової приналежності кров'яних плям, сперми;
- у санітарній експертизі – виявляють домішки молока тварин одного виду до молока тварин іншого виду, домішки штучного меду до натурального, фальсифікація м'ясних, рибних, борошняних виробів;
- у біології – визначають генетичні зв'язки споріднених тварин, рослин;

- в імунології - для виявлення та кількісного визначення імуноглобулінів у крові;
- у вірусології – для виявлення антигенів та антитіл до різних вірусних захворювань, а також для вивчення антигенної структури вірусів, наприклад вірусів кору, ящуру, віспи, поліомієліту та ін.
- у бактеріології – для визначення антигенів у діагностиці ряду інфекцій (дизентерії, сибірки, менінгіту, пневмонії), а також для виявлення бактеріальних токсинів (наприклад у вивченні токсиноутворення у збудника дифтерії).

Реакція преципітації – надзвичайно специфічна і чутлива імунологічна реакція, яка дає можливість виявити антигени у 10^{-6} г білка.

Реакція преципітації в агарі широко використовується для кількісного визначення вмісту імуноглобулінів методом радіальної імунодифузії по Манчіні. Визначення IgA, IgM, IgG методом радіальної імунодифузії в гелі агарози по Mancini et al. засновано на тому, що зразки досліджуваних сироваток вміщують у лунки агару, який містить антитіла до одного з класів імуноглобулінів: IgA, IgM, IgG у відомій концентрації. Імуноглобуліни, дифундуючи з лунок в агар, при взаємодії з відповідними антитілами будуть утворювати кільця преципітації, розмір яких знаходиться в тісній залежності від вмісту в сироватці обстежуваного імуноглобулінів того чи іншого класу (рис 3.3).

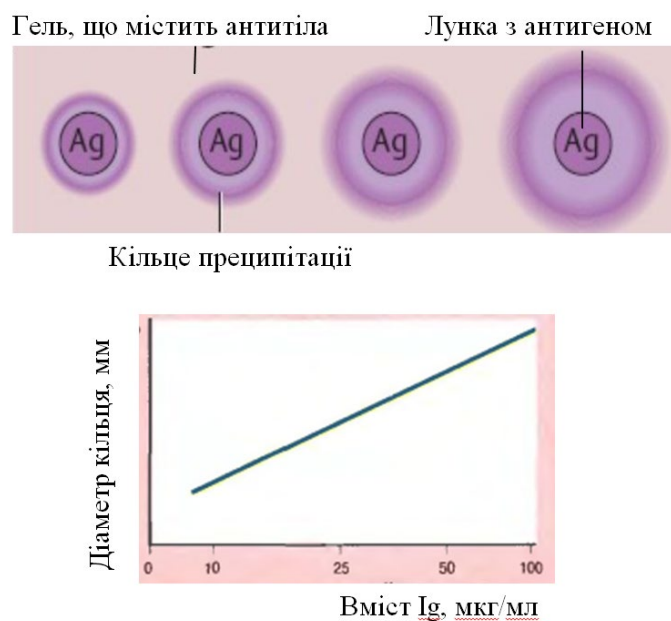


Рис. 3.3. Визначення вмісту імуноглобулінів за Манчіні (зверху – загальний вигляд результатів, знизу – калібрувальна крива)

Завдання 1. Визначити кількісний вміст імуноглобулінів класів А, G, М, в сироватці крові людини за методом радіальної імунодифузії в гелі (метод Манчіні).

1. Поставити реакцію Манчіні з метою визначення рівня імуноглобулінів у досліджуваній сироватці крові.

2. Побудувати калібрувальну криву і визначити кількість імуноглобулінів класів А, G, М.

Матеріал та обладнання:

1. Скляні пластини 9×12 см або кришки 96-лункових планшетів.
2. П-образна рамка 120×90×8 мм для полегшення заливки скла агаром.
3. Водяна баня на 50-60 °С.
4. Пастерівські піпетки з відтягнутим кінцем.
5. Волога камера.
6. Вимірник.
7. Калібрувальна лінійка.
8. Комерційні набори для визначення концентрації імуноглобулінів.
9. 0,2 М вероналовий буфер.
10. Реактив для забарвлення преципітату.
11. Пробійник круглий діаметром 1,5-2,0 мм для вирізання лунок в гелі агарози.

Хід роботи:

Приготування вероналового буферу: 1,84 г вероналу і 0,34 г їдконого натру розчиняють в 200 мл дистильованої води. *Приготування гелю агарози:* агарозу з набору для визначення імуноглобулінів в сироватці крові у кількості 3,6 г висипають в 200 мл вероналового буферу, підігрітого до температури 50-60 °С, після чого кип'ятять впродовж 10-15 хв. на водяній бані до повного розплавлення агару і отримання прозорого гелю. Розплавлений агар фільтрують через вату і розливають по 21 мл в підігріті скляні циліндри, які закривають пробками і поміщають на водяну баню з температурою 56-58 °С. Ампуну моноспецифічної сироватки з робочим титром 1:20-1:30 розводять в 1 мл вероналового буфера, виливають у відповідний циліндр, перемішують і 10-15 хв. витримують на водяній бані. Скляні пластини розміром 9×12 см протирають ефіром, на склі поміщають обмежувальну рамку (за відсутності рамки краю можна

обробити парафіном). Підготовлені таким чином пластини підігрівають і поміщають на строго горизонтальну поверхню. На середину пластини з циліндра швидко виливають розплавлений агар, що містить моноспецифічну сироватку. Гель за допомогою скляної палички швидко і рівномірно розподіляють по усій поверхні стекла, бульбашки повітря ретельно видаляють. Пластину з гелем залишають на горизонтальній поверхні до повного затвердіння агару.

За допомогою круглого штампу по трафарету в гелі вирізують лунки. Відстань від краю скла до лунок і між лунками повинно бути не менше 10 мм. На одному склі розміром 9×12 см можна розмістити до 48 лунок. Агар з лунок видаляють пастерівською піпеткою, сполученою з вакуумним або водоструминним насосом. Підготовлені пластини при необхідності можна зберігати у вологій камері при температурі 4 °С. Досліджувану сироватку за допомогою пастерівської піпетки з тонко відтягнутим кінцем вносять в лунки до зникнення увігнутого меніска. Кожну сироватку вносять в агарові лунки, що містять ту або іншу моноспецифічну сироватку. У 4 лунки агарової пластини вносять цілісну і розведену в 2, 4, 8 разів стандартну (еталонну) сироватку з відомим вмістом імуноглобулінів усіх класів (рис. 3.4).

	Ц	1 : 2	1 : 4	1 : 8
1	О	О	О	О
2	О	О	О	О
3	О	О	О	О
4	О	О	О	О

Рис. 3.4. Схема постановки реакції преципітації по Манчіні

Ампула із стандартною сироваткою входить в кожен набір моноспецифічних сироваток. Після внесення досліджуваних сироваток пластини поміщають у вологу камеру (можна використовувати ексікатор з наливою на дно водою або інший відповідний посуд з кришкою) і інкубують впродовж 24 годин (для визначення IgA і IgG) або 48 годин (для визначення IgM). Після інкубації пластини витягають з вологої камери і забарвлюють відповідним барвником: бромфеноловим синім (склад фарби: бромфеноловий синій 0,5 г, свинець оцтовокислий 4% водною розчин - 10

мл, оцтова кислота крижана 20 мл, вода дистильована до 1 л), амідочорний 10 В (склад фарби: 1% амідочорного в 7% водному розчині оцтової кислоти). *Облік результатів.* Для оцінки результатів реакції вимірюють діаметр кілець преципітації, що утворилися навкруги лунок. Потім будують калібрувальну криву: наносять на осі абсцис діаметри кілець стандартної сироватки, а по осі ординат - відому концентрацію кожного класу імуноглобулінів в г/л і будують калібрувальний графік, за допомогою якого обчислюють вміст імуноглобулінів в кожній досліджуваній сироватці. У нормі в сироватці міститься 0,65-1,65 г/л IgM; 7,50-15,45 г/л IgG; 1,25-2,5 г/л IgA.

Результати визначення заносять у таблицю і роблять висновок про нормальний або змінений вміст імуноглобулінів у досліджуваних зразках сироваток.

Таблиця

Вміст імуноглобулінів у досліджуваних сироватках (г/л)

Зразок	IgM	IgG	IgA
1			
2			
3			

Клінічне значення. Імуноглобуліни є продуктами секреції В-клітин на кінцевій стадії їх диференціювання, тобто плазматичних клітин. Рівень сироваткових імуноглобулінів відображує функціональний стан В-клітинної ланки імунної системи у відповідь на стимуляцію організму антигенними подразниками. Підвищення рівня характерне для гострих та хронічних запальних процесів, аутоімунних захворюваннях та ін. Дефекти, пов'язані з порушенням метаболізму імуноглобулінів, спостерігаються при багатьох захворюваннях. Зниження рівня імуноглобулінів свідчить про недостатність гуморальної ланки імунітету, порушення їх синтезу або посилення катаболізму, адсорбція на імунних комплексах.

Підвищення концентрації IgA спостерігається при: гострій та хронічній бактеріальній, грибковій, паразитарній інфекції, хронічних захворюваннях печінки, цирозі, ревматоїдному артриті, СЧВ, хронічному лімфолейкозі, мієломній хворобі, моноклональній гамопатії, хворобі Вальденстрема, ендотеліомі, остеосаркомі, кандидозі, муковісцидозі, захворюваннях дихальних шляхів. Зменшення концентрації IgA

спостерігається при: фізіологічній гіпогамаглобулінемії у дітей (у віці 3-5 місяців), вродженій гіпогамаглобулінемії або агамаглобулінемії, новоутвореннях імунної системи, лікуванні цитостатиками і імунодепресантами, станах після видалення селезінки, кишкових та ниркових синдромів втрати білка, гострих вірусних, хронічних бактеріальних інфекціях. Підвищення концентрації IgM спостерігається при: гострих та хронічних бактеріальних, грибкових, паразитарних інфекціях, гострих вірусних гепатитах, цирозі, ревматоїдному артриті, СЧВ, гострому та хронічному лімфолейкозі, мієломній хворобі, макроглобулінемії Вальденстрема, ендотеліомі, остеосаркомі, кандидозі, муковісцидозі, захворюваннях дихальних шляхів. Зменшення концентрації IgM спостерігається при: фізіологічній гіпогамаглобулінемії у дітей (у віці 3-5 місяців), вродженій гіпогамаглобулінемії або агамаглобулінемії, новоутвореннях імунної системи, лікуванні цитостатиками і імунодепресантами, опроміненні іонізуючою радіацією, станах після видалення селезінки, кишкових та ниркових синдромів втрати білка, хронічній вірусній інфекції, недостатності гуморальної ланки імунітету. Підвищення концентрації IgG спостерігається при: гострих та хронічних бактеріальних, грибкових, паразитарних інфекціях, гострих та хронічних захворюваннях печінки, цирозі, вірусному гепатиті, автоімунних захворюваннях, ревматоїдному артриті, СЧВ, саркоїдозі, муковісцидозі, хронічному лімфолейкозі, мієломній хворобі, інфекційному мононуклеозі, моноклональній гамопатії, хворобі Вальденстрема, реконвалесценції первинної бактеріальної інфекції, при гострому періоді повторної інфекції, СНІД. Зменшення концентрації IgG спостерігається при: фізіологічній гіпогамаглобулінемії у дітей (у віці 3-5 місяців), вродженій гіпогамаглобулінемії або агамаглобулінемії, новоутворенні імунної системи, лікуванні цитостатиками і імунодепресантами, станах після видалення селезінки, кишкових та ниркових синдромів втрати білка, при хронічній вірусній інфекції, гемоглобінопатії.

Завдання для самостійної роботи

Подивитися навчальні відео за посиланнями:

1. Precipitation Reactions and Precipitation

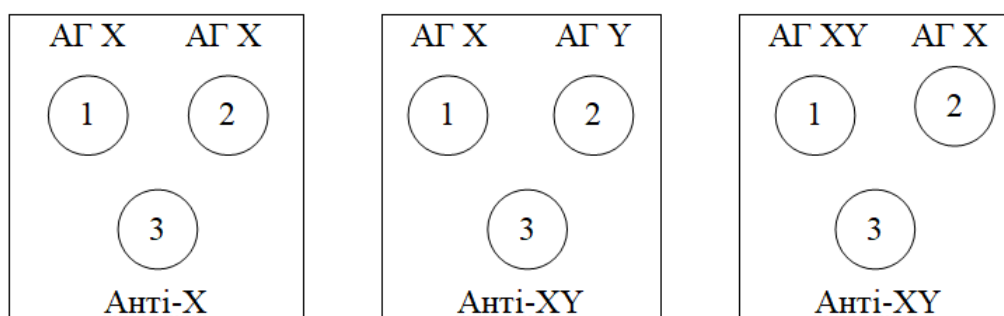
Curve <https://www.youtube.com/watch?v=Ew15yHuqzmY>

2. Radial Immunodiffusion (Mancini Technique)

https://www.youtube.com/watch?v=Bn-w6P_9TUA

3. Double immunodiffusion (Ouchterlony Double Diffusion)
<https://www.youtube.com/watch?v=4vgyrT0U7S8>
4. Immunoelectrophoresis
<https://www.youtube.com/watch?v=zUGikX9ZB9U&t=8s>

Описати метод подвійної імунодифузії за Оухтерлоні та навести схеми розташування смуг преципітації при: ідентичності антигенів у лунках 1 та 2; не ідентичності антигенів у лунках 1 та 2; частковій ідентичності антигенів у лунках 1 та 2.



Питання для перевірки знань:

1. Яка особливість будови молекул імуноглобулінів забезпечує утворення преципітатів?
2. Перелічіть варіанти реакції преципітації.
3. Які антигени можуть вступати в реакції преципітації?
4. Чи можуть неповні антитіла утворювати преципітати з антигенами?
5. Назвіть принцип методу радіальної імунодифузії.

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань:

1. Антитіло, що вступає в реакцію преципітації має назву:
 - А. Преципітат.
 - Б. Преципітин.
 - В. Преципітиноген.
 - Г. Аглютинин.
2. Антиген, що вступає в реакцію преципітації має назву:
 - А. Преципітат.

- Б. Преципітин.
 - В. Преципітиноген.
 - Г. Аглютининоген.
3. Імунний комплекс, що утворюється в результаті реакції преципітації має назву:
- А. Преципітат.
 - Б. Преципітин.
 - В. Преципітиноген.
 - Г. Аглютинат.
4. У реакції преципітації вступають антигени:
- А. Корпускулярні.
 - Б. Розчинні.
 - В. Нерозчинні.
 - Г. Усі перелічені.
5. Вміст яких імуноглобулінів можна визначити за методом Манчіні:
- А. IgM, IgE та IgA.
 - Б. IgG та IgA.
 - В. IgM, IgG та IgA.
 - Г. Тільки IgM .

Список літератури:

1. Вершигора А.Ю. Імунологія / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо та ін. – Київ : Вища школа, 2005. – 599 с. Оновлено 2020 <https://surl.li/dgkjtz>
2. Іонов І.А. Сучасна імунологія (курс лекцій) І.А. Іонов, Т.Є. Комісова, О.М. Сукач, О.О. Катеринич – Х.: ЧП Петров В.В., 2017. – 107 с. <https://dspace.hnpu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/d83c7215-7e4e-4d25-bad653fa9aed69/content>
3. Основи імунології : лабораторний практикум / уклад. : К. Г. Гаркава, А. В. Дращнікова. – К. : НАУ, 2015. – 60 с.
4. Hornbeck P. Double-Immunodiffusion Assay for Detecting Specific Antibodies (Ouchterlony). Current Protocols in Immunology. – 2017. – 116 (1):2.3.1-2.3.4 [doi:10.1002/cpim.18](https://doi.org/10.1002/cpim.18). PMID 28150863. S2CID 35908711.

Електронні та інформаційні ресурси:

1. https://www.tru.ca/shared/assets/Microbiology_Lab_Safety39696.pdf
2. [https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_\(Lee\)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01](https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_(Lee)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01)

[%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory](#)

3. <https://www.immunology.org/public-information/what-is-immunology>
4. <https://www.jimmunol.org/>

Лабораторне заняття 4

Реакції антиген-антитіло. Реакції аглютинації та їх різновиди. Реакція гемаглютинації та її застосування для визначення груп крові

Мета заняття: Ознайомитися з принципами та галуззю застосування реакції аглютинації, опанувати методику постановки реакції аглютигації.

Питання для підготовки до заняття:

1. Будова імуноглобулінів.
2. Антигени та їх властивості.
3. Взаємодія антитіл з антигенами. Імунні комплекси.
4. Різновиди реакцій взаємодії антитіл з антигенами.
- 5. Різновиди реакції аглютинації.**

Теоретичні відомості:

Реакції аглютинації – це реакції склеювання корпускулярних антигенів за допомогою антитіл.

Розрізняють:

- прямі реакції аглютинації, що використовують для виявлення антитіл у сироватці крові хворого. Додавання суспензії убитих мікробів до сироватки хворого викликає утворення пластівчастого осаду (позитивна реакція склеювання мікроорганізмів антитілами). Використовується для визначення черевного тифу, паратифу й ін.
- реакція пасивної, чи непрямой гемаглютинації заснована на використанні еритроцитів з адсорбованими на їх поверхні антигенами, взаємодія яких з відповідними антитілами сироватки крові хворих приводить до утворення фестончатого осаду. Використовується для визначення вагітності, виявлення підвищеної чутливості хворих до лікарських препаратів і гормонів;
- реакція гальмування гемаглютинації заснована на здатності антитіл імунної сироватки нейтралізувати віруси, що у результаті втрачають властивість склеювати еритроцити. Використовується для діагностики вірусних хвороб;

– реакція коагутинації – різновид реакції аглютинації, у якій антигени збудника визначають за допомогою стафілококів, попередньо оброблених імунною діагностичною сироваткою

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.

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 (рис. 4.1). 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.

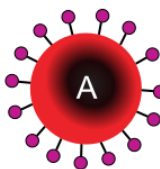
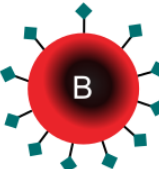
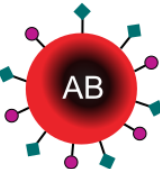
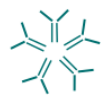
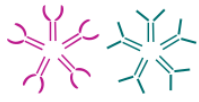
	Група A(II)	Група B(III)	Група AB(IV)	Група O(I)
Тип еритроцита				
Антитіла у плазмі крові	 Анти-В	 Анти-А	Немає	 Анти-А та Анти-В
Антигени на мембрані еритроцита	 А-антиген	 В-антиген	 А та В антигени	Немає

Рис. 4.1. Групи крові по системі АВ0 – антигени та антитіла

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. Визначення груп крові проводять з використанням реакції гемаглютинації.

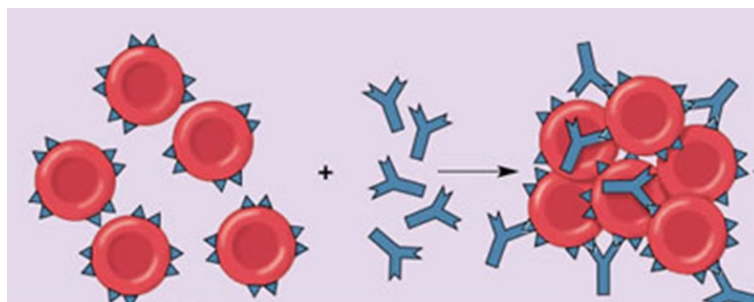


Рис. 4.2. Схематичне зображення реакції гемаглютинації

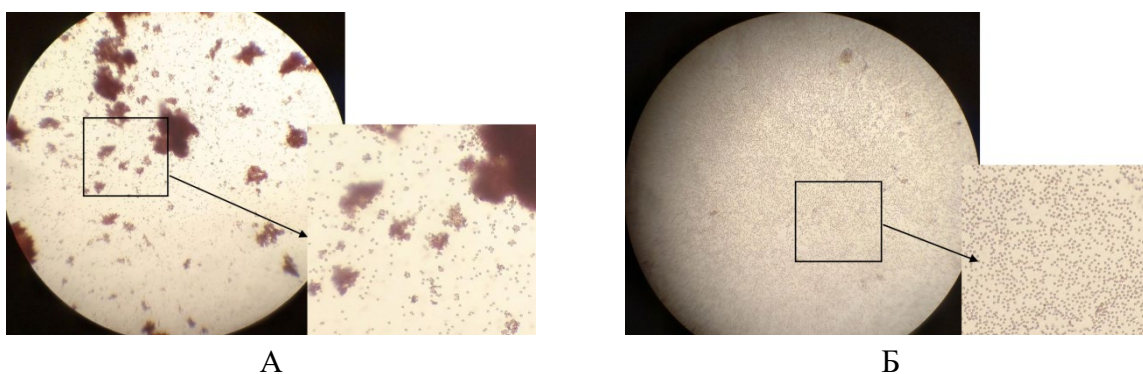


Рис. 4.3. Позитивна (А) та негативна (Б) реакція гемаглютинації (світлова мікроскопія)

Завдання 1 – провести визначення груп крові з використанням набору моноклональних антитіл (цоліклонів) або стандартних антиеритроцитарних сироваток та еритроцитів різних груп крові.

Матеріали та обладнання:

1. Набір цоліклонів (рис 4.4) або стандартних сироваток (рис. 4.5).
2. Еритроцити груп крові 0, А, В, АВ.
3. Плоскодонні планшети або порцелянові (пластикові) платівки для проведення реакцій.
4. Автоматичні піпетки.
5. Наконечники для автоматичних піпеток.
6. Розчин 0,9% NaCl.
7. Ємність для використаних наконечників.
8. Скляні палички.

Хід роботи

1. Визначення груп крові з використанням цоліклонів.

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.

Метод не потребує багато часу та складного обладнання (рис. 4.4).



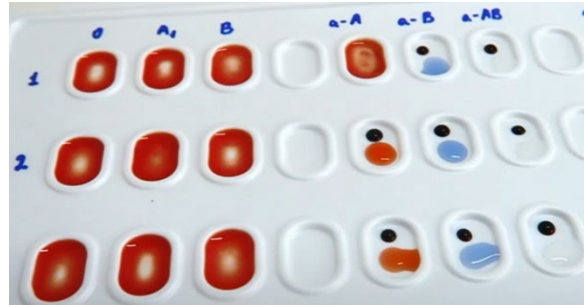
Рис.4.4. Набір цоліклонів та необхідного обладнання

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.

Цоліклони містять моноклональні антитіла класу IgM в титрі $\geq 1:32$.

1. Реагенти потрібно дістати з холодильника і витримати за кімнатної температури 15 хв.
2. Для визначення групи крові на планшетку нананосять 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 окремим стерильним наконичником.

3. Поруч з реагентами поміщається по 1 краплі (50 мкл) крові пацієнта або еритроцитів.
4. Стерильною паличкою реагенти змішують з біологічним зразком:



5. Спостерігають за ходом реакції 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.

6. Оцінка результатів.

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. 4.3).

- Відсутність будь-якої реакції склеювання у всіх зразках означає, що на поверхні 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 групи (тип АВ).
- 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.

2. Визначення групи крові за допомогою стандартних сироваток

Визначення групи крові проводять у добре освітленому приміщенні при температурі від +15 до +20 °С з використанням стандартного набору сироваток (рис.4.5).



Рис.4.5. Набір стандартних сироваток та необхідного обладнання

Сироватку наносять на пластину повздовжніми рядами: перша крапля – 0 (I), друга крапля – А (II), третя крапля – В (III). У кожную краплю додають еритроцити досліджуваної крові. Краплини перемішують скляною паличкою, погодуючи, спостерігають 5 хвилин (рис. 4.6).



Рис. 4.6. Аглютинація еритроцитів різних груп крові за допомогою стандартних сироваток. Примітка: у правому нижньому кутку – контрольне дослідження зі стандартною сироваткою АВ (IV) групи крові.

У клінічній практиці обов'язково проводять визначення з двома

серіями сироваток.

Завдання 2 – Провести діагностику бруцельозу.

1. Виявити у сироватці крові специфічні аглютиніни до бруцел. Поставити та провести облік результатів реакції Хедлсона – платівкову реакцію аглютинації з бруцельозним діагностиком.
2. Визначити титр специфічних аглютининів до бруцел. Поставити реакцію Райта – класичний розгорнутий пробірковий метод.

Хід роботи

Платівкова реакція аглютинації Хедлсона використовується для прискореної серодіагностики бруцельозу під час масового обстеження людей та тварин (рис. 4.7).

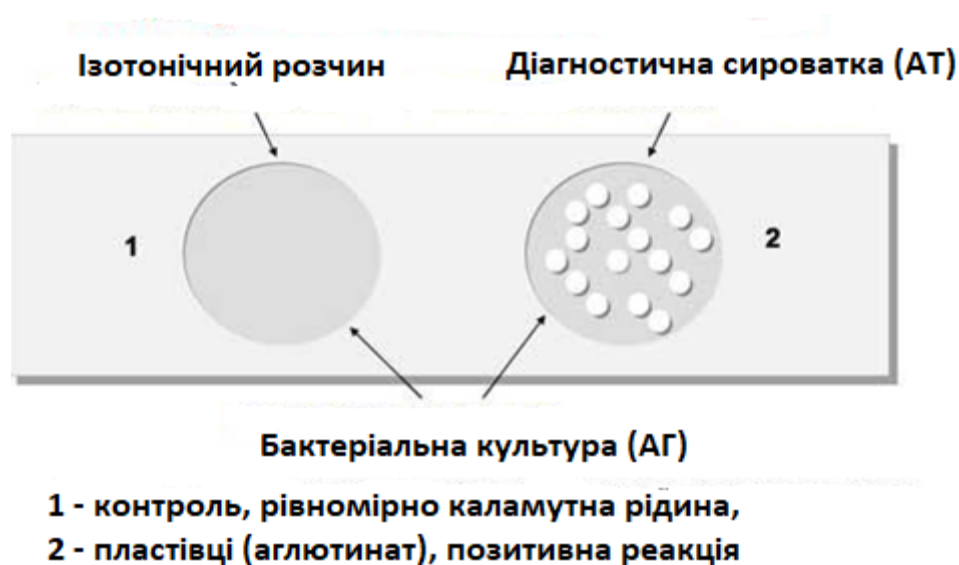


Рис. 4.7. Схема постановки пластівчастої реакції аглютинації

Методика постановки реакції: чисту знежирену скляну платівку (20×12 см) розділити восковим олівцем на шість квадратів, у п'ять із них (1-5) нанести нерозбавлену досліджувану сироватку у кількості 0,08; 0,04; 0,02; 0,01; 0,002 мл (табл.1). Додати до перших чотирьох доз сироватки бруцельозний діагностикум - антиген Хедлсона у кількості 0,03 мл, що містить 2×10^{10} клітин у 1 мл; до п'ятої додати 0,03 мл фізіологічного розчину (контроль сироватки). У шостий квадрат нанести антиген Хедлсона (бруцельозний діагностикум) та фізіологічний розчин (контроль антигену) по 0,03 мл кожного компоненту. Тримавши скло двома руками,

коловими рухами перемішати сироватку з антигеном. Для прискорення реакції сироватки з антигеном суміш злегка підігріти (1-2 хв.), високо тримаючи над полум'ям пальника.

Таблиця 4.1

Схема постановки реакції Хедлсона

Інгредієнти	Доза реагентів, мл				КС	КА
Досліджувана сироватка (нерозбавлена)	0,08	0,04	0,02	0,01	0,02	-
Бруцельозний діагностикум	0,03	0,03	0,03	0,03	-	0,03
Фізіологічний розчин	-	-	-	-	0,03	0,03
Облік результатів	++++	++++	+++	++	-	-

Облік та оцінку результатів реакції Хедлсона проводять за 5-10 хвилин неозброєним оком, за допомогою лупи або аглютиноскопа (рис. 4.8). Основним критерієм під час оцінки є величина, кількість зерен аглютинату та ступінь просвітлення рідини у краплі.



Рис. 4.8. Аглютиноскоп

За наявності аглютинату у краплі сироватки з АГ та відсутністю його у контролі сироватки та АГ оцінюють ступінь виразності аглютинації за чотирьохплюсовою системою:

«++++» – усі клітини аглютиновані з утворенням великих і дрібних зерен, добре виразний осад, повне просвітлення рідини;

«+++» – дрібні та поодинокі великі зерна, виразний осад, слабка опалесценція рідини;

«++» – аглютинат дрібнозернистий у вигляді невеликого осаду, слабке просвітлення рідини;

«+» – ледь помітні дрібні зерна, сліди аглютинації, рідина непрозора;

«-» – відсутність зерен аглютинації, рідина рівномірно мутна.

Для діагностичної оцінки результатів використовують таку схему:

1. Різко позитивна реакція – аглютинація на «++++» в усіх дозах сироватки;
2. Позитивна реакція – аглютинація на «+++» не менше, ніж у третій (0,02 мл) та четвертій (0,1 мл) дозах сироватки;
3. Негативна реакція – відсутність аглютинації в усіх дозах сироватки.

Пробіркова об'ємна розгорнута реакція Райта призначена для серологічної діагностики бруцельозу та визначення титру аглютинінів до бруцел.

Методика постановки реакції. Приготувати основне розбавлення (1:50) досліджуваної сироватки: внести у пробірку 0,2 мл нерозведеної сироватки, додати до неї 9,8 мл фізіологічного розчину, перемішати.

У штативі поставити ряд чистих аглютинаційних або звичайних пробірок, на кожній з них восковим олівцем написати ступінь розведення (від 1:100 до 1:3200), на двох останніх - відмітити контроль сироватки (КС) та контроль АГ (КАГ) (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Схема постановки розгорнутої реакції аглютинації Райта

Інгредієнти	Розбавлення сироватки							КС	КАГ
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200			
фізіологічний р-н, мл	1	1	1	1	1	1	-	-	1
Досліджувана сироватка (1:50), мл	1→	1→	1→	1→	1→	1 ↓	1:50	-	-
Бруцельозний діагностикум, мл	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1
Облік результату	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-

→↓ - напрям титрування

В усі пробірки, окрім № 7, розлити по 1 мл фізіологічного розчину.

З основного розбавлення сироватки (1:50) методом перекатки приготувати ряд послідовних (кратних двом) розбавлень від 1:100 до 1:3200 в аглютинаційних пробірках, встановлених у штативі. Для цього у першу пробірку наливають 1 мл основного розбавлення сироватки (1:50), після ретельного струшування вмісту 1 мл переносять у 2-у пробірку, потім у 3-ю і т.д. З 6-ої пробірки 1 мл видаляють (у банку з дезрозчином) для збереження однакового об'єму. У 7-у пробірку (КС) вносять 1 мл основного розбавлення сироватки (1:50). Додають по дві краплі бруцельозного діагностикуму у кожену пробірку з розбавленням сироватки (з 1 по 6) та у 8-у пробірку (КАГ). Штатив з пробірками енергійно струшують і ставлять у термостат при 37 °С на 18-20 годин.

Облік та оцінку результатів реакції визначають за інтенсивністю аглютинації (чотирьохплюсова система, див. вище).

Достовірними можна вважати результати тільки при чітких контролях: КС - не повинен бути мутним (це можливо за рахунок проростання сироватки при порушенні умов зберігання або використанні реагентів після закінчення терміну придатності; КАГ – не повинно бути спонтанної аглютинації діагностикуму.

За титр АГ (аглютинінів) у сироватці приймають те найбільше його розбавлення, у якому спостерігається аглютинація не менше, ніж на ++.

Діагностичну оцінку результатів реакції Райта здійснюють за ступенем аглютинації в розбавленнях сироватки:

1. Реакція різко позитивна – аглютинація не менше, ніж на «++» при титрі сироватки 1:1600 та вище;
2. Реакція позитивна – при титрі 1:200 - 1:400;
3. Реакція сумнівна – при титрі 1:100.

Матеріали та обладнання:

1. Досліджувана сироватка хворого.
2. Антиген Хедлсона – бруцельозний діагностикум: суспензія убитих нагріванням та забарвлених кристалічним фіолетовим бруцел, густиною 2×10^{10} клітин у 1 мл.
3. Фізіологічний розчин.
4. Скляні платівки розміром 20×12 см.
5. Пробірки.
6. Піпетки градуйовані (1 мл).

Завдання для самостійної роботи

1. Подивитися навчальні відео:

Agglutination Reactions <https://www.youtube.com/watch?v=3W67OH3v2IU>

ABO Blood Group <https://www.youtube.com/watch?v=mYoeMxWuvtM>



Відео групи крові укр..mp4

2. Ознайомитися з методиками визначення груп крові людини та діагностики бруцельозу.

Питання для перевірки знань:

1. Яка особливість будови молекул імуноглобулінів забезпечує утворення аглютинатів?
2. Перелічіть варіанти реакції аглютинації.
3. Які антигени можуть вступати в реакції аглютинації?
4. У крові якої групи немає антитіл анти-А та анти-В?
5. На поверхні еритроцитів якої групи крові відсутні антигени А та В?
6. Чим пластивчата реакція Хедлсона діагностики бруцельозу відрізняється від розгорнутої реакції Райта?

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань:

1. Антитіло, що вступає в реакцію аглютинації має назву:
 - А. Преципітат.
 - Б. Преципітин.
 - В. Преципітиноген.
 - Г. Аглютинин.
2. Антиген, що вступає в реакцію аглютинації має назву:
 - А. Преципітат.
 - Б. Преципітин.
 - В. Преципітиноген.
 - Г. Аглютининоген.
3. Імунний комплекс, що утворюється в результаті реакції аглютинації має назву:
 - А. Преципітат.
 - Б. Преципітин.

В. Преципітиноген.

Г. Аглютинат.

4. У реакції аглютинації вступають антигени:
- А. Корпускулярні.
 - Б. Розчинні.
 - В. Нерозчинні.
 - Г. Усі перелічені.
5. Вміст яких імуноглобулінів можна визначити за методом Манчіні:
- А. IgM, IgE та IgA.
 - Б. IgG та IgA.
 - В. IgM, IgG та IgA.
 - Г. Тільки IgM.
6. До якого класу імуноглобулінів відносяться природні гемаглютиніни (ізогемаглютиніни)?
- А. IgM.
 - Б. IgG.
 - В. IgA.
 - Г. IgE.
7. До якого класу імуноглобулінів відносяться імунні гемаглютиніни?
- А. IgM.
 - Б. IgG.
 - В. IgA.
 - Г. IgE.
8. Антитіла якого класу імуноглобулінів проходять через плаценту до плода?
- А. IgM.
 - Б. IgG.
 - В. IgA.
 - Г. IgE.
9. Еритроцити якої групи крові не містять антигенів системи АВ0?
- А. I (0).
 - Б. II (A).
 - В. III (B).
 - Г. IV (AB).
10. Кров якої групи не містить ізогемаглютининів до антигенів А та В?
- А. I (0).

Б. II (A).
В. III (B).
Г. IV (AB).

Список літератури:

1. Вершигора А.Ю. Імунологія / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо та ін. – Київ : Вища школа, 2005. – 599 с. Оновлено 2020.
<https://surl.li/dgkjtz>
2. Іонов І.А. Сучасна імунологія (курс лекцій) І.А. Іонов, Т.Є. Комісова, О.М. Сукач, О.О. Катеринич – Х.: ЧП Петров В.В., 2017. – 107 с.
<https://dspace.hnpu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/d83c7215-7e4e-4d25-bad653fa9aed69/content>
3. Основи імунології : лабораторний практикум / уклад. : К. Г. Гаркава, А. В. Дrajнікова. – К. : НАУ, 2015. – 60 с.
4. Hornbeck P. Double-Immunodiffusion Assay for Detecting Specific Antibodies (Ouchterlony). Current Protocols in Immunology. – 2017. – 116 (1):2.3.1 [doi:10.1002/cpim.18](https://doi.org/10.1002/cpim.18). [PMID 28150863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28150863/). [S2CID 35908711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35908711/).

Електронні та інформаційні ресурси:

1. https://www.tru.ca/_shared/assets/Microbiology_Lab_Safety39696.pdf
2. [https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_\(Lee\)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory](https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_(Lee)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory)
3. <https://www.immunology.org/public-information/what-is-immunology>
4. <https://www.jimmunol.org/>
5. Інструкція з визначення груп крові за системою АВ0. Наказ МОЗ України. URL: <https://ips.ligazakon.net/document/MOZ2277>

Лабораторне заняття 5

Імуноферментний, імунофлуоресцентний та радіоіmunний аналізи. Їх принципи та практичне застосування. Дослідження вмісту антитіл до певного антигену імуноферментним методом

Мета заняття: Ознайомитися з принципом, методичними варіантами та галуззю застосування імуноферментного імунофлуоресцентного та радіо іmunного аналізів; опанувати непрямий метод імуноферментного аналізу ELISA.

I. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Теоретичні відомості:

На початку 70-х років XX сторіччя пошуки простих чутливих методів виявлення і кількісного визначення антигенів та антитіл привели до розробки твердофазного імуноферментного аналізу ELISA (від англ. enzyme-linked immunosorbent assay) – виявлення з використанням імуносорбентів, зв'язаних з ферментами (рис. 5.1). Таким чином, особливістю методів ІФА є використання функціонально активної біологічної молекули ферменту.

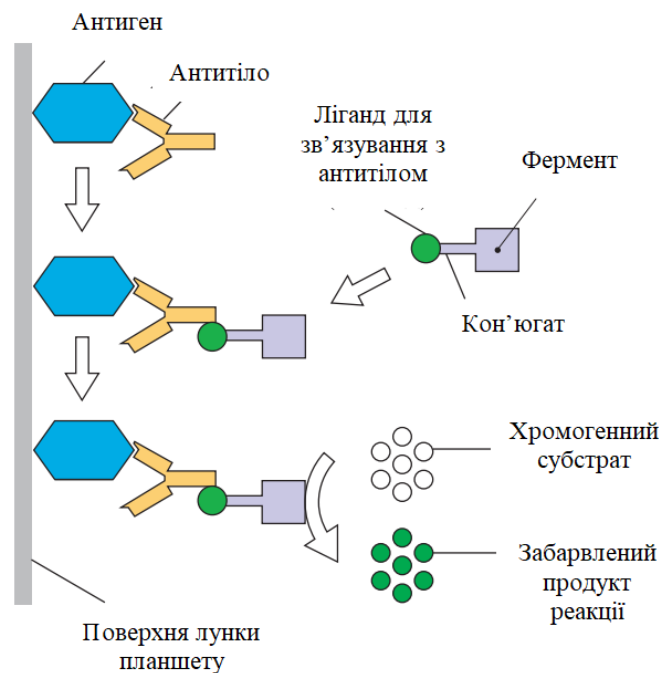


Рис. 5.1. Принцип твердофазного ІФА (ELISA)

Основні принципи твердофазного ІФА (ELISA).

Можливість проведення твердофазного ІФА, незалежно від модифікації, ґрунтується на 4-х принципах:

1. Різні ферменти, найпоширеніші з котрих пероксидаза хрину та лужна фосфатаза, можна ковалентно приєднувати до антигенів або антитіл різними хімічними методами за таких умов, коли обидва компоненти кон'югату зберігають свою біологічну активність (здатність до взаємодії з субстратом, антигенність, антигенв'язуючу активність).

2. Більшість антигенів, у тому числі білки, ліпополісахариди та бактеріальні ліпополісахариди, самовільно сорбуються на поверхні пластику (наприклад, у виямках полістиролової панелі для мікротитрування). Антитіла, що мають білкову природу, також сорбуються на пластику, зберігаючи при цьому антигенв'язуючу активність. Саме на цьому принципі ґрунтується перший етап реакції, що полягає у іммобілізації панелей антигенами або антитілами. Адсорбовані на твердій фазі антигени або антитіла уже не змочуються буфером, який містить детергент, тоді як реагенти, що не зв'язалися, легко видаляються відмиванням.

3. При інкубації на другому етапі в іммобілізованих лунках досліджуваного зразка та стандартних реагентів на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси, що складаються з одного або кількох шарів. Компоненти, що не зв'язалися, на кожному етапі видаляються відмиванням, що дає можливість досягти високої специфічності аналізу у реакції ферменту, який входить до складу кон'югату з індикаторним субстратом.

4. При зв'язуванні кон'югату антитіло-фермент або антиген-фермент з іммобілізованим імунним комплексом активний центр ферменту залишається доступним для взаємодії з субстратом.

Інкубація субстрату з іммобілізованим кон'югатом, як правило, призводить до розвитку кольорової реакції. На певній стадії реакцію зупиняють, а чіткість забарвлення оцінюють візуально, порівнюючи із стандартом, або за оптичною густиною (фотометрія за певної довжини хвилі). Деякі варіанти методу припускають забарвлення самої твердої фази. У цих випадках використовують хромогенні субстрати, що дають продукти у вигляді нерозчинних, іммобілізованих на твердій фазі забарвлених преципітатів.

Реакція характеризується високою специфічністю, яка властива

імунореагентам і чутливістю, що забезпечується дією ферменту.

Всього декілька молекул кон'югованого ферменту, який присутній у системі, здатні розщеплювати безліч молекул субстрату з утворенням продуктів, які легко виявляються, що дає можливість, врешті-решт, реєструвати та обчислювати кількісно взаємодію всього декількох молекул імунореагенту, наприклад, антитіл з гомологічним антигеном.

Матеріали та методичні заходи, які використовуються в ІФА. Як тверду фазу використовують речовини різного хімічного складу: полістирен, поліпропілен, полівініл, гелі декстрину, агарози, поліакриламід, целюлозу, нітроцелюлозу, нейлон. За фізичними ознаками це можуть бути гелі, кульки, листи, диски, спеціальні титраційні панелі. Зв'язуюча поверхня панелей покрита спеціальними реагентами, що сприяють адсорбції антигенів і антитіл.

Зв'язування речовин та клітин з твердою фазою відбувається нековалентно (адсорбція), завдяки утворенню гідрофобних або йонних зв'язків, або ковалентно (кон'югація) ціанбромідом, глутаровим альдегідом, полілізином. Ступінь адсорбції залежить від фізико-хімічних властивостей молекул: ізоелектричної точки, рН, молекулярної маси, конформації, а також від концентрації в розчині, терміну та температури інкубації тощо. Оптимальна концентрація чистих білкових агентів складає 1-10 мкг/мл; полісахаридних – близько 500 мкг/мл.

Ферменти для ІФА повинні задовольняти низку вимог: утримувати в структурі реакційні групи, завдяки яким можливе зв'язування їх з імунореагентами; зберігати високу ферментативну активність у кон'югованому стані протягом тривалого терміну; бути чистими, стабільними в реакційній суміші. Застосовують тільки ті ферменти, котрі розщеплюють субстрати з утворенням продуктів, легко визначаються тим або іншим способом.

Методи твердофазного (ТФ) ІФА адаптовані для роботи з корпускулярними агентами-хромосомами, вірусами, бактеріями (bacto-ELISA), клітинами еукаріот (cell-ELISA). Клітини бактерій можна прикріпити до поверхні пластикових платівок висушуванням.

Після зв'язування будь-якого імунореагенту вільні місця на ТФ блокують, щоб попередити неспецифічне зв'язування з нею імунореагентів на подальших етапах аналізу. Застосовують різноманітні білки та нейонні детергенти: бичачий сироватковий альбумін (1% розчин), желатин (0,2-0,5%-ні розчини), нормальні сироватки (1-5%-ні розчини), бичачий γ -

глобулін (1% розчин), тритон X-100 та твин 20 (0,05-0,5 % розчини).

Методичні варіанти ТФ ІФА (рис. 5.2):

- **ELISA**. Прямий варіант, що передбачає утворення двошарових імунних комплексів.

При здійсненні цієї найпростішої модифікації ІФА лунки панелей сенсibiliзують (іммобілізують) антигенами (антитілами), а потім інкубують антитілами (антигенами) з міченими ферментом. Зв'язування кон'югату, що містить фермент, з твердою фазою відбувається лише у тому разі, коли обидва компоненти системи взаємно комплементарні.

Модифікацією цього варіанту є конкурентний аналіз, у якому АГ(АТ), мічений ферментом, конкурує з неміченим АТ(АГ). У цьому випадку ферментативна активність утвореного комплексу АТ-АГ-Ф (АГ-АТ-Ф) обернено пропорційна кількості Аг(Ат) у досліджуваному зразку/

Наприклад, виявлення сироваткових антитіл до чітко визначеного епітопу антигену по конкуренції з міченими стандартними антитілами, специфічними до цього ж епітопу.

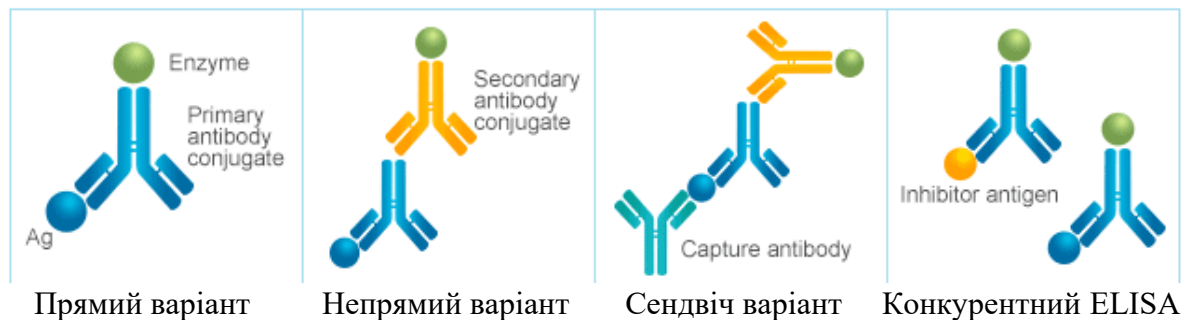


Рис. 5.2. Варіанти твердофазного імуноферментного аналізу ELISA

- **«Сендвіч»-варіанти ELISA.** Відповідно до схеми цього варіанту аналізу антитіла (звичайно моноклональні або високоафінні), адсорбовані на твердій фазі, інкубують з досліджуваним зразком. Після відмивання у лунки вносять мічені ферментом антитіла до того ж антигену і далі проводять усі наступні етапи реакції так само, як і при відтворенні інших описаних модифікацій.

Єдине обмеження цього варіанту полягає у тому, що досліджуваний антиген повинен мати декілька епітопів, які зв'язують антитіла.

- **Непрямий ELISA** для виявлення антитіл та антигенів. Це варіант, найзручніший для повсякденного аналізу сироваток на наявність специфічних антитіл. Найбільше поширення він має в епідеміології

інфекційних захворювань. Для проведення реакції у лунках панелей адсорбують антиген (зазвичай екстракт з бактерій, паразитів та вірусів) і інкубують із зразками сироватки або іншого матеріалу (спинномозкової рідини, молока, слини, витяжки фекалій). Специфічні до антигенів антитіла виявляють за допомоги антиглобулінового кон'югату. Основна перевага методу в “універсальності” кон'югату. Наприклад, один і той самий кон'югат, специфічний до імуноглобулінів людини, може слугувати для виявлення антитіл людини до найрізноманітніших антигенів у будь-яких зразках. Оскільки обидва реагенти, які застосовуються у цьому варіанті ІФА, можуть бути стандартизовані, реакція методично проста і легко контролюється.

Практичне завдання: Провести серодіагностику сифілісу – визначити наявність антитіл до *Treponema pallidum* у сироватці крові людини непрямим методом ELISA (можлива зміна умов практичного завдання в залежності від наявної тест-системи, ІФА для діагностики сифілісу подана для прикладу).

Матеріали та обладнання

Тест-система (рис. 5.3) є набором інгредієнтів для проведення імуноферментного аналізу (ІФА) з метою виявлення специфічних антитіл до збудника сифілісу у сироватці крові людини.



Рис. 5.3. Набір реагентів ІФА до Блідої Трепонемі

1. Антиген трепонемний ультразвуковий, сухий – 1 фл. (5 мл).
2. Антитіла діагностичні проти імуноглобулінів людини, мічені пероксидазою, сухі (кон'югат) – 1 фл. (0,5 мл).
3. Сироватка крові людини, яка має антитіла до *Treponema pallidum*, суха –

позитивна контрольна сироватка – 1 фл. (0,5 мл).

4. Сироватка крові людини, яка не має антитіл до *Treponema pallidum*, суха – негативна контрольна сироватка – 1 фл. (0,5 мл).

5. Сухий біологічно активний концентрат сироватки молока – 4 фл. (по 9 г).

6. Пептон сухий ферментативний для бактеріологічного застосування – 4 фл. (по 6 г).

7. Кислота 5-аміносаліцилова (5-АСК) – 5 фл.

8. Гідропірит – 6 табл. по 1,5 г.

9. Твін-20 або сорбіталь Л-20 детергент 1 фл. – 8 мл.

10. Натрій хлористий (для промиваючого розчину) – 1 пакет (180 г).

11. Натрій вуглекислий кислий (для буферного розчину) – 1 фл. (3,0 г).

12. Натрій вуглекислий (для буферного розчину) – 1 фл. (1,5 г).

13. Натрія гідроокис – 1 фл. (0,4 г).

14. Планшети полістиролові – 4 шт.

Діючим елементом тест-системи є трепонемний ультразвуковий антиген, адсорбований на планшетах. Негативна та позитивна сироватки крові людини слугують для визначення специфічної активності тест-системи. Кон'югат необхідний для виявлення утвореного комплексу «антиген-антитіло». Індикатором імуноферментної реакції є 5-АСК.

Сорбент готують із сухого концентрату сироватки молока та сухого ферментативного пептону. Детергент – поверхнево-активна речовина, додається до 0,9 % розчину хлористого натрію та до сорбенту.

Розчин для приготування антигену готують з вуглекислого натрію та кислого вуглекислого натрію. Розчином для промивання планшетів слугує 0,9%-ний розчин хлористого натрію. Розчином для розведення сироваток слугує сорбент. Розбавлення кон'югату готують у розчині, що містить рівні частини сорбенту та 0,9 % розчину хлористого натрію.

Сорбція розведених сорбентом сироваток крові необхідна під час проведення ІФА для попередження можливих неспецифічних результатів.

Призначення. Тест-система призначена для серодіагностики сифілісу.

Приготування розчинів.

Розчин №1. Карбонатно-фосфатний буферний розчин у концентрації 0,01 моль/л (рН $9,6 \pm 0,2$) готують розчиненням 118 мг вуглекислого натрію з флакону з етикеткою «Натрій вуглекислий безводний» та 346 мг кислого вуглекислого натрію з флакону «Натрій вуглекислий кислий» у 20

мл дистильованої води та наступним доведенням об'єму дистильованою водою до 100 мл. Зберігають не більше 2 тижнів при температурі 4-8 °С.

Розчин №2. Вміст флакону з етикеткою «Антиген трепонемний ультраозвучений, сухий» розчиняють у 5 мл розчину №3 без детергенту. Робочий розчин готують, використовуючи розчин №1, розбавлений як зазначено на етикетці флакону. Залишки вихідного розчину антигену зберігають при температурі мінус 20-16 °С у пробірках по 0,5 мл протягом 2-х місяців.

Розчин №3. 0,9% розчин хлористого натрію готують розчиненням 45 г солі з пакету з етикеткою «Натрій хлористий» у 5 л дистильованої води. Розчин зберігають при температурі 4-6 °С протягом 2-х тижнів. Перед застосуванням додають детергент з розрахунку 0,5 мл на 1 л розчину.

Розчин №4. Вміст флакону з етикеткою «Сироватка крові людини, що містить антитіла до *Treponema pallidum* суха» розчиняють у 0,5 мл стерильної дистильованої води, потім відбирають 0,1 мл і розчином №6 розводять до 1:10. З отриманого розчину відбирають 0,1 мл та розчином №6 розбавляють до 1:20, отримуючи при цьому розбавлення сироватки крові 1:200. Ретельно перемішують. Сорбцію сироватки крові проводять при температурі (37 ± 1) °С протягом 60 хв. Сорбовану сироватку використовують в той же день, не зберігають. Вихідний розчин сироватки крові, що залишився, зберігають при температурі мінус 20-16 °С у пробірках по 0,1 мл протягом 2 місяців.

Розчин № 4А. Вміст флакону з етикеткою «Сироватка крові людини, що не містить антитіла до *Treponema pallidum* суха», розбавляють у 0,5 мл стерильної дистильованої води, після чого відбирають 0,1 мл і розчином №6 розбавляють до 1:20, отримуючи при цьому розбавлення сироватки крові 1:200. Ретельно перемішують. Сорбцію сироватки проводять при температурі (37 ± 1) °С протягом 60 хвилин. Не зберігають. Залишки вихідного розчину сироватки крові зберігають при температурі мінус 20-16 °С у пробірках по 0,1 мл протягом 2 місяців.

Розчин №5. Вміст флакону з етикеткою «Антитіла діагностичні проти імуноглобулінів людини, мічені пероксидазою, сухі (кон'югат)» розводять у 0,5 мл стерильної дистильованої води. Робочий розчин готують, використовуючи розчин, який складається з рівних об'ємів розчинів №6 та №3, містить детергент у розбавленні, яке зазначене на етикетці флакону. Не зберігають. Залишки вихідного розчину кон'югату зберігають при температурі мінус 20-16 °С у пробірках по 0,1 мл протягом

2-х місяців.

Розчин №6. Сорбент. Вміст флакону з етикеткою «Пептон ферментативний, сухий» розчиняють у 150 мл дистильованої води. До отриманого розчину додають вміст флакону з етикеткою «Біологічно активний концентрат сироватки молока, сухий» та 0,75 мл детергенту. Ретельно перемішують. Розчин зберігають при температурі 4-8 °С протягом 3-х діб.

Розчин №7. 0,05 %-ний розчин перекису водню готують з таблетки гідропериту. Для цього таблетку розчиняють у 50 мл дистильованої води (розчин А). Розчин А зберігають не більше 3-х тижнів у темному місці при температурі 4-8 °С. Робочий розчин перекису водню готують, додаючи 0,5 мл розчину А до 9,5 мл дистильованої води. Отримують 0,05% розчин перекису водню, який зберігають не більше 3 днів при температурі 4-8 °С у захищеному від світла місці.

Розчин №8. Вміст флакону з етикеткою «5-аміносаліцилова кислота» розчиняють у 25 мл дистильованої води при температурі 58-62 °С. Якщо використовують роз'ємні планшети з числом лунок не менше 96, то необхідну кількість 5-АСК визначають від необхідної кількості субстрату, розчин №8 при цьому має утримувати 4 масових частини 5-АСК та 5000 масових частин дистильованої води (тобто готують 0,08% водний розчин 5-АСК). Розчин охолоджують до температури 18-22 °С та встановлюють рН $6,00 \pm 0,05$ розчином №10. Розчин №8 готують не раніше, ніж за 30 хвилин до використання, зберігають у темному місці при температурі 18-22 °С.

Розчин №9 (субстратна суміш). Змішують розчин №8 та розчин №7 у відношенні 9:1. Субстратну суміш готують за 10 хвилин до використання при температурі 18-22 °С. Суміш не зберігають!

Розчин №10. Розчин натрію гідроокису у концентрації 0,1 моль/л готують, розчиняючи вміст флакону з етикеткою «Натрію гідроокис» у 10 мл дистильованої води. Зберігають не більше 3-х місяців при температурі 4-8 °С.

Хід аналізу

Для проведення реакції використовують піпетки градуйовані (місткістю 0,1; 0,2; 1; 2; 5 мл) або дозатори піпеткові (місткістю 0,02; 0,1; 0,2; 1 мл). Можна використовувати автоматичні піпетки закордонних виробників «Gilson», «Titertek» або аналогічних підприємств.

1. Планшети виймають з коробки та тричі промивають розчином №3

без детергенту (тобто фізіологічним розчином). Для цього лунки заповнюють розчином, потім планшет перевертають і видаляють рідину з лунок сильним струшуванням, після чого закривають планшет фільтрувальним папером або марлею та витрушують залишки розчину.

2. У лунки планшета вносять по 0,2 мл розчину № 2 у робочому розбавленні (антиген трепонемний ультраозвучений).

3. Адсорбцію антигену на поверхні лунок проводять протягом 18 ± 2 год при температурі 18-22 °С.

4. По закінченню адсорбції видаляють антиген з лунок планшета сильним витрушуванням і відмивають 5 разів розчином №3, що містить детергент, наступним чином: у лунки заливають 0,9 % розчин хлористого натрію, що містить детергент, і витрушують (операцію повторюють 5 разів), після чого закривають планшет фільтрувальним папером або марлею і витрушують залишки розчину.

5. Досліджувані сироватки крові розбавляють у 200 разів розчином №6 та сорбують при температурі 18-22 °С та ретельно перемішують.

У лунки планшета вносять 0,2 мл розчину досліджуваних сироваток у розбавленні 1:200 (по 2 лунки кожної сироватки), по 0,2 мл розчинів №4 (4 лунки), №4а (2 лунки).

6. Планшет витримують у термостаті при температурі 37 ± 1 °С протягом 30 хв.

7. Після витримання планшета в термостаті видаляють витрушуванням рідину з лунок і відмивають планшет 5 разів розчином № 3 з детергентом, як зазначено у пункті 4.

8. У кожну лунку планшета вносять по 0,2 мл розчину № 5 у робочому розбавленні (антитіла діагностичні проти імуноглобулінів людини, мічені пероксидазою, – кон'югат).

9. Планшет витримують у термостаті при температурі (37 ± 1) °С протягом 30 хв.

10. Видаляють рідину з лунок планшета витрушуванням і відмивають 5 разів планшет, вносять по 0,2 мл субстратної суміші (розчин № 9).

11. У кожну лунку планшета вносять по 0,2 мл субстратної суміші (розчин № 9).

12. Планшет витримують 60 хв при температурі 18-22 °С у захищеному від світла місці.

13. У лунках планшета, де пройшла реакція, виникає забарвлення

коричневого кольору різної інтенсивності. У лунках, де проводилось дослідження негативної сироватки, колір субстрату світло-бежевий.

14. Контролі при проведенні імуноферментного аналізу:

а) контроль кон'югату: проведення реакції у зазначеній послідовності, але замість сироватки крові вносять розчин № 6 (2 лунки) та розчин №3 з детергентом (2 лунки). Має бути негативний результат;

б) контроль субстратної суміші: проведення реакції у зазначеній послідовності, але замість кон'югату вносять розчин № 3 з детергентом (2 лунки). Має бути негативний результат;

в) визначення активності субстратної суміші з позитивною контрольною сироваткою (2 лунки), котрий проводять перед внесенням суміші у решту лунок. Різка зміна забарвлення протягом 10 хв означає придатність субстратної суміші. Якщо колір не змінюється або змінюється слабо, необхідно більш ретельне повторне приготування суміші з наступною перевіркою її активності за допомоги позитивної контрольної сироватки крові.

Облік результатів:

Результати реакції обліковують за забарвленням субстратної суміші інструментально, визначаючи поглинання при довжині хвилі 450 нм.

1. Візуальний облік реакції:

- у лунках, в котрі вносили розчин № 3 з детергентом, субстратна суміш має бути безкольоровою або світло-бежевий;
- у лунках, в котрі вносили негативну контрольну сироватку у розбавленні 1:200 (розчин №4а), субстратна суміш забарвлюється у світло-бежевий колір;
- у лунках, у котрі вносили позитивну контрольну сироватку в розбавленні 1:200 (розчин №4), реакція має бути чітко вираженою, субстратна суміш забарвлюється інтенсивно, набуваючи забарвлення від коричневого до темно-коричневого.

Світло-бежевий колір відповідає негативним результатам, бежевий – 1 плюсу, темно-бежевий – 2 плюсам, світло-коричневий – 3 плюсам, коричневий та темно-коричневий – 4 плюсам.

2. Облік реакції за допомогою вертикального спектрофотометра (рідера) типу «Мультискан» або «Уніскан» (або інший наявний):

- оптична густина (ОГ) субстратної суміші у лунках, у котрі вносили розчин № 3 з детергентом, має бути не більше 0,25;
- ОГ субстратної суміші у лунках, у котрі вносили розчин №6, має

бути не більше 0,25;

- ОГ субстратної суміші у лунках, у котрі вносили негативну контрольну сироватку (розчин; 4а), має бути не більше 0,35;

- ОГ субстратної суміші у лунках, у котрі вносили позитивну контрольну сироватку (розчин № 4), має бути не більше 0,9.

Показники рідера відповідають: до 0,35 – негативним результатам; 0,36-0,45 – 1 плюсу; 0,46-0,65 – 2 плюсам, 0,66-0,89 – 3 плюсам, 0,9 та вище – 4 плюсам.

Як при візуальній, так і при інструментальній оцінці, негативними вважають результати до 1 плюса включно, 2 плюси – слабкопозитивна, 3 плюси – позитивна та 4 плюси – різкопозитивна реакція.

Систему вважають специфічно активною при наявності виразної реакції з позитивною контрольною сироваткою крові та відсутністю реакції із негативними контролями (розчин № 3 з детергентом, розчин № 6, негативна контрольна сироватка).

Можливі помилки

До найбільш типових помилок при проведенні імуноферментного аналізу, які призводять до отримання недостовірних результатів, слід віднести: неправильне приготування розчинів, порушення режимів температури та терміну інкубації, невідповідність вимогам значення рН розчинів, погане перемішування розчинів, забруднення лабораторного посуду.

Посуд має бути ретельно вимитим та висušеним у сухожаровій шафі при температурі 140-150 °C протягом 30-50 хв для руйнування біологічно активних субстанцій.

Форма випуску

Тест-система імуноферментна є набором інгредієнтів, упакованим в одну коробку.

Тест-системи зберігають в закритих складських приміщеннях при температурі 2-10 °C 1 рік.

Транспортування здійснюється будь-якими видами критого транспорту при температурі 2-10 °C.

II. ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ

У реакціях цієї групи використовуються антитіла чи антигени, пов'язані з флюорохромами – речовинами, здатними випромінювати світло

певної довжини хвилі при опроміненні їх світлом з іншою довжиною хвилі (наприклад, ультрафіолетом). Чутливість таких реакцій дуже висока, що дає можливість виявляти дуже невеликі комплекси антиген–антитіло за допомогою люмінесцентного мікроскопа. Крім того, застосування кон'югованих з флюорохромом антитіл дає можливість виявляти важко розчинні антигени, наприклад білки зовнішньої цитоплазматичної мембрани клітин або будь-які молекули, міцно пов'язані з міжклітинною речовиною тканин, при мікроскопуванні зрізів. При цьому вдається визначити не тільки наявність антигенів, а й місця їх переважної локалізації в аналізованих зразках, що у деяких випадках є головною метою дослідження.

Найчастіше у подібних реакціях використовують пов'язані з флюорохромом імуноглобуліни. Як добре зв'язуються з білками флюорохромів застосовують флюоресцеїнізотіоціанат (ФІТЦ), тетраметилромадинізотіоціанат (ТРІТЦ), які випромінюють у зеленій частині спектру, і фікоеритрин, який при збудженні світлом такої ж довжини хвилі дає червоне світло. Це дозволяє за необхідності використовувати «подвійне фарбування» та в одному аналізі виявляти різні антигени.

Розрізняють три основні варіанти реакції імунофлюоресценції (РІФ) (рис. 5.4).

Пряма імунофлюоресценція полягає в обробці аналізованого препарату (зріз тканин або мазка, приготованого із суспензії клітин) антитілами, пов'язаними з флуорохромами. Після відмивання препарату від антитіл, що не зв'язалися, його переглядають у люмінесцентному мікроскопі. **Непряма флуоресценція** включає два етапи. Спочатку препарат обробляють звичайними (не міченими) антитілами конкретного виду тварин. Після відмивання проводять обробку кон'югованими з флуорохромом антитілами, специфічними до антигенних детермінант перших антитіл. Відмитий після другого етапу препарат піддають мікроскопуванню. Хоча ця реакція потребує більшого часу на постановку, її чутливість вище, оскільки, як правило, одне перше антитіло зв'язується з кількома другими. Крім того, такий метод дозволяє працювати з дуже різними антигенами, використовуючи один зразок пов'язаних з флуорохромами імуноглобулінів, тобто відпадає необхідність проводити кон'югування з флуорохромом імуноглобулінів кожної новоодержуваної сироватки або моноклональних антитіл.

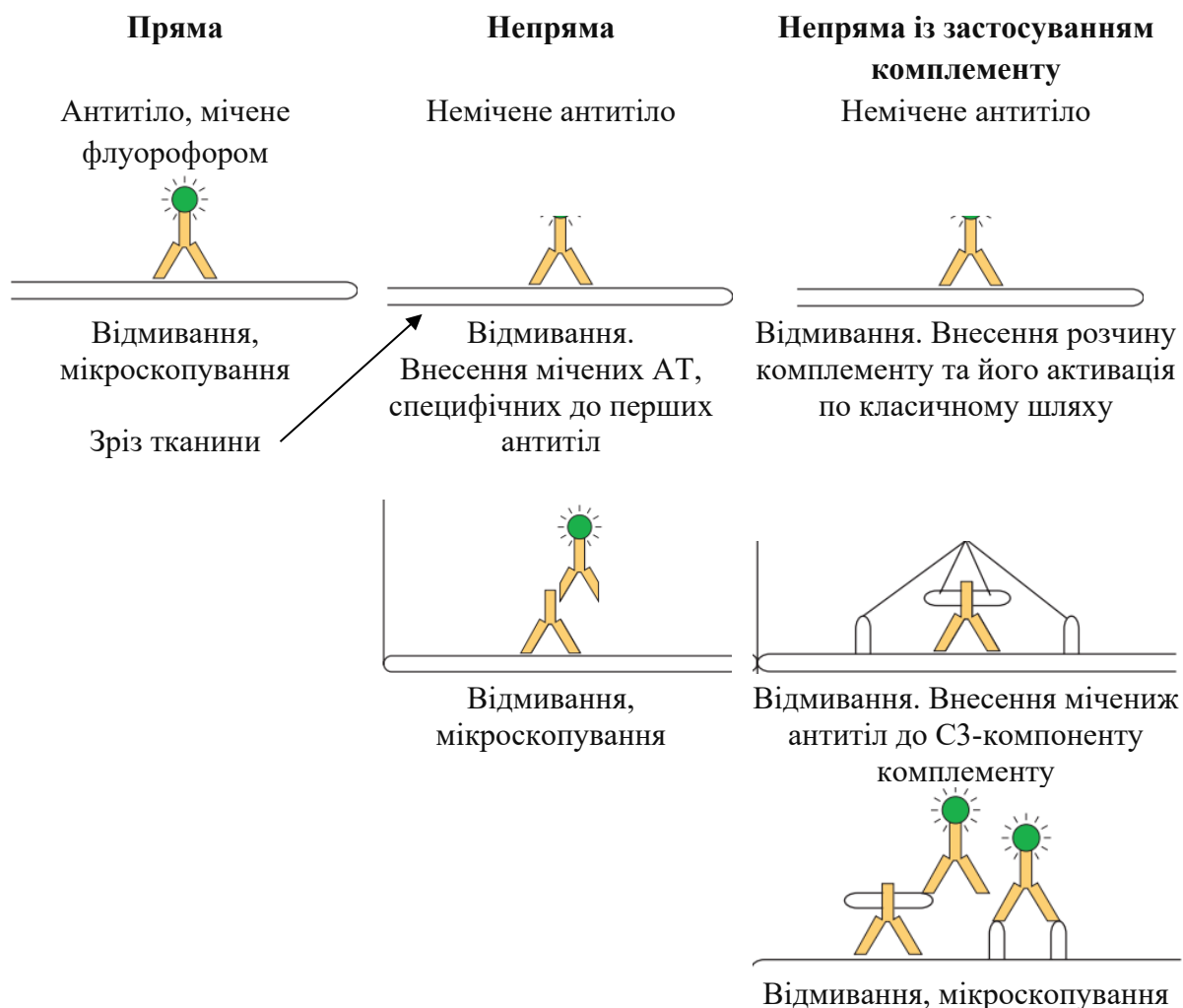


Рис. 5.4. Варіанти імунофлуоресцентного аналізу

Третій варіант – **непряма імунофлуоресценція із застосуванням комплементу** – заснований на тому, що при активації класичним шляхом молекули системи комплементу утворюють комплекси саме там, де є закріплені імуноглобуліни. У цьому випадку необхідні три етапи обробки препарату: антитілами, що «не світяться», комплементом і кон'югованими з флуорохромом імуноглобулінами, специфічними по відношенню до білків системи комплементу.

Недоліками реакцій імунофлуоресценції є неможливість їх застосування до об'єктів, молекули яких можуть флуоресцювати, та невисока точність визначення кількостей аналізованих антигенів.

III. РАДІОІМУННИЙ АНАЛІЗ

Ця група реакцій вважається найчутливішою та високоточною у кількісному відношенні. У таких реакціях застосовують радіоактивно мічені антитіла чи антигени. Як радіоактивну мітку найчастіше використовують ізотопи йоду (I^{131} та I^{125}), що добре зв'язуються з білками, для антитіл та ізотопи водню (H^3) і фосфору (P^{32}) для антигенів небілкової природи. Технічні можливості вимірювання радіоактивного випромінювання дозволяють за допомогою радіоімунологічного аналізу (RIA) виявляти в сечі, крові, ексудатах антигени, присутні в пікограмових кількостях і не тестуються внаслідок цього хімічними методами.

Одним із прикладів застосування RIA можуть бути методики, розроблені для тестування алергічних станів у людини. Метод RAST (від англ. **radioallergosorbent test**) дозволяє визначити наявність та кількість IgE, специфічних до конкретного алергену, у сироватці крові (рис. 5.5).

Сорбція антигену (алергену) на целюлозному диску.

Внесення досліджуваної сироватки, яка може містити IgE. Інкубація. Відмивання незв'язаних антитіл.

Внесення радіоактивно мічених анти-IgE антитіл. Інкубація. Відмивання незв'язаних антитіл.
Вимірювання радіоактивності диску.

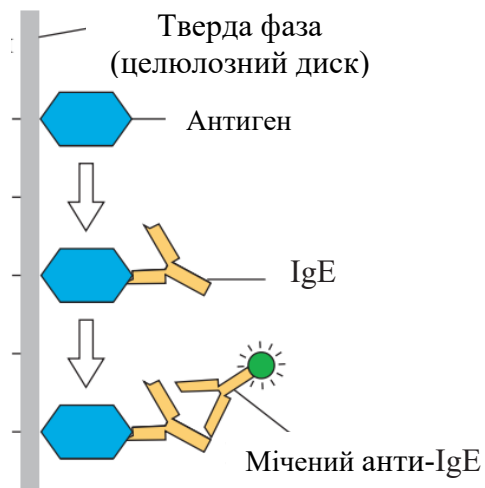


Рис. 5.5. Принципова схема радіоімуного аналізу

Для цього покритий молекулами алергену і захищений від неспецифічного осадження білків твердий носій обробляють аналізованою сироваткою, відмивають від компонентів, що не провзаємодіяли з антигеном, та наносять на нього мічені радіоактивним ізотопом IgG, специфічні по відношенню до IgE. Після ретельного відмивання від радіоактивних антитіл, що не зв'язалися, заміряють радіоактивність твердої фази і роблять перерахунок на кількість IgE.

В даний час існує багато варіантів використання RIA, але їх зазвичай

застосовують тільки у тих випадках, коли інші методи дослідження не дозволяють отримати бажаний результат. Це пов'язано з обов'язковим дотриманням заходів безпеки, необхідних для роботи з радіоактивними речовинами, що й обмежує широке застосування РІА.

Завдання для самостійної роботи

Подивитися навчальні відео Primary and Secondary Antibodies

<https://www.youtube.com/watch?v=qQ0BaZ83ZtY>

Direct ELISA

https://www.youtube.com/watch?v=c-LyVc_GEhk

Indirect ELISA

https://www.youtube.com/watch?v=YIc_3PTpNM8

Sandwich ELISA

<https://www.youtube.com/watch?v=cHSVmzZ84FU>

Питання для перевірки знань:

1. Кон'юговані антигени.
2. Різновиди імуноферментного аналізу.
3. Різновиди імунофлуоресцентного аналізу.
4. Різновиди радіоімуноного аналізу.
5. Принципи проведення твердофазного ІФА.
6. У чому полягає небезпека радіоімуного аналізу.

Тестові завдання для самоконтролю рівня знань:

1. Вкажіть, який метод передбачає застосування мічених антитіл проти комплексу:

А. РІА;
Б. Імуноблотинг;
В. Пряма РІФ;
Г. Антикомплементарна РІФ;
Д. «Сендвіч-метод».
2. До якої частини молекули імуноглобулінів приєднують ферменти,

флуорофори або радіоактивні сполуки?

- А. Fab-фрагменту.
- Б. Fc-фрагменту.
- В. Шарнірної ділянки.
- Г. Легкого ланцюга.

3. В якому варіанті твердофазного ІФА застосовують другі антитіла?
 - А. Прямому та непрямому.
 - Б. Прямому та сандвіч варіанті.
 - В. Непрямому та сандвіч варіанті.
 - Г. У жодному з варіантів.
4. При якому аналізі для візуалізації результату необхідне збудження світлом?
 - А. Імунофлуоресцентном.
 - Б. Радіоімуном.
 - В. Імуноферментном.
5. При якому аналізі для візуалізації результату використовують хромогенні субстрати?
 - А. Імунофлуоресцентном.
 - Б. Радіоімуном.
 - В. Імуноферментном.

Список літератури:

1. Вершигора А.Ю. Імунологія / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо та ін. – Київ : Вища школа, 2005. – 599 с. Оновлено 2020.
<https://surl.li/dgkjtz>
2. Іонов І.А. Сучасна імунологія (курс лекцій) І.А. Іонов, Т.Є. Комісова, О.М. Сукач, О.О. Катеринич – Х.: ЧП Петров В.В., 2017. – 107 с. <https://dspace.hnpu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/d83c7215-7e4e-4d25-bad653fa9aed69/content>
3. Основи імунології : лабораторний практикум / уклад. : К. Г. Гаркава, А. В. Дращікова. – К. : НАУ, 2015. – 60 с.
4. Майкл Р. Барер, Вілл Ірвінг, Ендрю Свонк, Нелюм Перери. Медична мікробіологія. Посібник з мікробних інфекцій: патогенез, імунітет,

лабораторна діагностика та контроль: переклад 19-го англ. видання: у 2 т. Наук. ред. пер. Сергій Климнюк, Валерій Мінухін, Сергій Похил. К.: ВСВ «Медицина», 2020. 434 с.

5. Волощук О. М. Імунологія: навчально-методичний посібник. Чернівці : Чернівецький національний університет, 2021. 128 с.
6. Серологічні методи діагностики бактеріальних та вірусних інфекцій : метод. вказівки до проведення лаб. занять з курсу «Імунологія» / Т. В. Гудзенко, О. Ю. Зінченко, М. Б. Галкін, Г. І. Жумінська, Т. В. Іваниця. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім І. І. Мечникова, 2018. – 42 с.
<https://dspace.onu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/beb612ac-012a-4e0f-8b48-222ea06e8119/content>

Електронні та інформаційні ресурси:

1. https://www.tru.ca/_shared/assets/Microbiology_Lab_Safety39696.pdf
2. [https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_\(Lee\)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory](https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_(Lee)/01%3A_Laboratory_Safety/1.01%3A_Safety_Procedures_for_the_Microbiology_Laboratory)
3. <https://www.immunology.org/public-information/what-is-immunology>
4. <https://www.jimmunol.org/>

Навчальне видання

ІМУНОЛОГІЯ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

до лабораторних занять та самостійної роботи
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
денної форми навчання
спеціальності 091 Біологія та біохімія

Електронне практичне видання

Укладачі:

Філіпова Тетяна Олегівна
Гудзенко Тетяна Василівна
Зінченко Оксана Юріївна
Галкін Микола Борисович

В авторській редакції

Затв. авт. 28.05.2026. Шрифт Times New Roman.
Системні вимоги: операційна система сумісна з програмним забезпеченням
для читання файлів формату PDF.
Обсяг 1,9 МБ. Зам. № 3135.

Видавець:

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Змієнка Всеволода, буд. 2, м. Одеса, 65001, Україна
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 8592 від 23.03.2026 р.
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua