

Koncepce předmětu spec. imunolog. metody Bi 9250C, zimní semestr 2011  
**Časový rozpis blokového cvičení z předmětu Speciální cvičení z imunologie**  
12 studentů, 2h/2kredity

Pomůcky s sebou: Přezůvky a plášť, protokoly, svačina  
V praktickém cvičení se budeme zabývat testy sledujícími aktivitu IS

- a) bezobratlých
- b) obratlovců

**Metody: Odběr a zpracování krve, hemolymfy; Imunodifúze - Ouchterlonyho modifikace; ELISA - stanovení přítomnosti protilátek proti B.b.s.l. (*Borrelia afzelii, garinii, sensu stricto*); Test aktivity lymfocytů; rychlá imunochromatografická metoda stanovení přítomnosti Ag nebo Ab; test ALT (stanovení aktivity jaterního enzymu), Pozorování buněk hemolymfy (hemocyty hmyzu); Test aktivity fagocytózy pomocí fagocytovaných částic u hemocytů hmyzu; Průkaz přítomnosti antigenů erytrocytů ve slinách člověka – nepřímá hemaglutinace (HIT).**

Termín: 7.2.-10.2. 12 od 8.30hod

Úterý 8:30

Instruktaž ke cvičení, 9.45 odběr krve z prstu, krevní roztěr  
příprava destiček na ELISA - Et OH, promývání destiček, zjišťování konc. antigenu, ředění Ag a napipetování na destičku; mezitím imunodifúze; v mezičase barvení roztěrů a krevní diferencíál; ruleta

Pomůcky:

ELISA: 6 destiček a dvě už hotové, Ag už sonifikované, albumin, činidla na kalibraci, vazebný roztok, lednička

Předání pokynů a protokolů na imunochromatografický test

Imunodifúze: pipety, skla na imunodifúzi, vlhké komůrky, nůžky

Odběr krve: rukavice, ependorfky, stojánek, skla na roztěr, desinfekce, jehly, souprava na barvení

Pipety, špičky, odpadní nádoba, stojánky, ependorfky, papírky na ruletu

Středa 8:30

Instruktaž, ELISA: odstranění Ag a promytí, napipetování vazebného roztoku s kaseinem, inkubace s kaseinem, promytí destiček; v mezičase zpracování krve na sérum,

ALT test, imunochromatografický test, odběr hemolymfy z larev *Zavijče* voskového, kultivace s MSHP částicemi a sledování fagocytárních schopností hemolymfy, barvení rozměrů a pozorování pod mikroskopem hemocytů, počítání FI a % F, krevní diferencíál

Pomůcky:

ELISA: blokovací-vazebný roztok s kaseinem, promývací roztok, promývačka

ALT: sérum, ELISA reader s filtrem 340 nm

Fagocytóza: Leukodif, MSHP, larvy, sklíčka na roztěry, termostat, malé epiny, pinzety, nůžky

Pipety, špičky, odpadní nádoba, stojánky, ependorfky, teplotní lázeň

Čtvrtek 8:30

Instruktaž. Test aktivity lymfocytů. Průkaz přítomnosti antigenů erytrocytů ve slinách člověka, v mezičase krevní diferencíál, fagocytóza hemocytů.

Pomůcky: Komerční séra (EXBIO Olomouc) anti-A (IgM) monoklonální1, anti-B (IgM) monoklonální, lektin anti-H; náplav diagnostických erytrocytů A,B,O; destičky s otvory,

fyzilogický roztok 0,85% (0,15 mmol/l) NaCl, vodní lázeň na 100 C°, vortex, stojánky na zkumavky, štítky, fixy,

Pátek 8:30

samotná ELISA

ředění sér, rozložení vzorků na destičku, příprava zředěných sér: inkubace destičky se séry (naředit konjugát), promytí destičky, nanesení konjugátu, inkubace s konjugátem (nachystat substrátový roztok s OPD), promytí a nanesení substr. roztoku, inkubace se substrátem, zastavení reakce pomocí H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, měření na ELISA-readeru, v mezičase: krevní diferenciál, FI, % fagocytózy.

Pomůcky:

ELISA: blokovací roztok, promývací roztok, promývačka, konjugát, substrátový roztok, substrát, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ELISA-reader na 492 nm

Pipety, špičky, stojánky, ependorfky

### **Přehled metodik:**

**Odběr a zpracování krve, příprava séra, stanovení krevního diferenciálu**

**Imunodifúze - Ouchterlonyho modifikace**

**ELISA - stanovení přítomnosti protilátek proti B.b.s.l.**

**Test aktivity lymfocytů**

**Rychlá imunochromatografická metoda stanovení přítomnosti hemoglobinu ve stolici - individuální stanovení**

**Rychlá imunochromatografická metoda stanovení *Helicobacter pylori* - individuální stanovení**

**Rychlá imunochromatografická metoda stanovení *Chlamydia trachomatis* - individuální stanovení**

**Pozorování buněk hemolymfy (hemocyty hmyzu), barvení buněk**

**Test aktivity fagocytózy pomocí MSHP částic u fagocytů hmyzu, barvení buněk**

**Průkaz přítomnosti antigenů erytrocytů ve slinách člověka (HIT)**