

Koncepce předmětu spec. imunolog. metody Bi 9250C, zimní semestr 2015  
**Časový rozpis blokového cvičení z předmětu Speciální cvičení z imunologie**  
14 studentů, 2h/2kredity

Pomůcky s sebou: Přezůvky a plášť, protokoly, svačina,

Poznámky: k protokolu nutno přiložit fotky – vzít foťák či mobil; většina úloh bude probíhat ve dvojicích, proto je nutno se navzájem domluvit ještě před zahájením cvičení

V praktickém cvičení se budeme zabývat testy sledujícími aktivitu IS

a) bezobratlých

b) obratlovců

**Metody: Odběr a zpracování krve (krevní diferenciál), Odběr a zpracování hemolymfy; Imunodifúze - Manciniová modifikace, popř. Ouchterlony; 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: út.-pá. 9.2.-12.2. 016 od 8.30hod

út 8:30

**Instruktaž:** ke cvičení toho dne **1. krevní roztěr, barvení a příprava séra**

**3. příprava destiček na ELISA, imunochromatograf. test HIV-v případě času, ruleta na imunochromatografické testy** postupný odběr krve z prstu, ELISA - Et OH, promývání destiček, zjišťování koncentrace antigenu, ředění Ag, kalibrační křivka a napipetování na destičku; v mezičase barvení roztěrů a krevní diferenciál; ruleta na imunochromatografický test, zpracování krve na sérum,

**Pomůcky:**

ELISA: připravené A volné destičky, Ag už sonifikovaný, albumin, činidla na kalibraci, vazebný roztok, lednička, et-OH

Předání pokynů a protokolů na imunochromatografický test- ruleta

ALT: sérum, ELISA reader s filtrem 340 nm, epiny, destičku

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

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

st 8:30

**Instruktaž: 1. ALT 2. imunodifúze, 3. odběr hemolymfy z larev Zavíječe voskového, kultivace se škrobovými částicemi a sledování fagocytárních schopností hemolymfy, barvení skel a prohlížení pod mikroskopem 4. imunochromatografické testy**

ELISA-pokračování: odstranění Ag a promytí, napipetování vazebného roztoku s kaseinem, inkubace s kaseinem, promytí destiček; v mezičase imunochromatografické testy, mezitím **imunodifúze;**

odběr hemolymfy z larev Zavíječe voskového, kultivace se škrobovými částicemi a sledování fagocytárních schopností hemolymfy, barvení roztěrů a pozorování pod mikroskopem hemocytů, počítání FI a % F, krevní diferenciál – dokončení

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

**Pomůcky:**

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

Fagocytóza: Leukodif, roztok škrobových zrn, larvy, sklíčka na roztěry, termostat, malé epiny, pinzety, nůžky, stříkačky a jehly

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

čt 8:30

**Instruktaž: 1. Test aktivity lymfocytů. 2. Průkaz přítomnosti antigenů erytrocytů ve slinách člověka, v mezičase počítání krevní diferencíál**

Pozorování buněk hemolymfy (hemocyty hmyzu), barvení buněk -dokončení

Test aktivity fagocytózy pomocí škrobových zrn u fagocytů hmyzu, barvení buněk - dokončení

**Pomůcky:** Komerční séra (EXBIO Olomouc) anti-A (IgM) monoklonální1, anti-B (IgM) monoklonální, lektin anti-H monoklonální; náplav diagnostických erytrocytů A,B,O; destičky s otvory, fyziologický roztok 0,85% (0,15 mmol/l) NaCl, vodní lázeň na 100 C°, vortex, stojánky na zkumavky, štítky, fixy.

pá 8:30

**Instruktaž: 1. 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 diferencíál, 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 imunochromatografických metod:**

**Rychlý kvalitativní test pro časně potvrzení těhotenství 1x**

**Rychlý kvalitativní test pro stanovení přítomnosti HIV viru 14x**

**Rychlá imunochromatografická metoda stanovení přítomnosti hemoglobinu ve stolici - individuální stanovení 3x**

**Rychlý test ze slin pro odhad hladiny alkoholu v krvi 2x**

**Rychlá imunochromatografická metoda stanovení přítomnosti H. pylori ve stolici 3x**

**Rychlá imunochromatografická metoda stanovení přítomnosti S. pneumoniae v moči 3x**

**Rychlý kvalitativní test pro stanovení přítomnosti Treponema pallidum**