

Koncepce předmětu spec. imunolog. metody Bi 9250C, zimní semestr 2021  
**Časový rozpis blokového cvičení z předmětu Speciální cvičení z imunologie**  
9 studentů, 2h/2kredity

Pomůcky s sebou: přezůvky a plášť, protokoly, mobil na focení, flešku, svačinu  
V praktickém cvičení se budeme zabývat testy následujícími metodami aktivity IS

- a) bezobratlých
- b) obratlovců

**Použité metody: odběr a zpracování krve (krevní diferenciál), odběr hemolymfy; ELISA (imunoenzymová analýza)– 1. stanovení přítomnosti protilátek proti B.b.s.l. (*Borrelia afzelii, garinii, sensu stricto*), 2. stanovení přítomnosti protilátek proti COVID-19; test aktivity a cytotoxicity lymfocytů; rychlá imunochromatografická metoda stanovení přítomnosti Ag nebo Ab; test stanovení aktivity jaterního enzymu ALT; pozorování buněk hemolymfy (hemocyty hmyzu); test aktivity fagocytózy pomocí fagocytovaných částic u hemocytů hmyzu; příprava preparátu roztěrem střev klíštěte; průkaz přítomnosti antigenů erytrocytů ve slinách člověka – nepřímá hemaglutinace (metoda HIT).**

Termín: út.-pá. 8. – 11.2. od 8.30hod do cca 15-16hod

út 8:30

**Instruktaž:** ke cvičení toho dne **1. krevní roztěr, barvení a příprava séra**  
**2. příprava destiček na ELISA, chystání antigenu na destičky** **3. stanovení jaterního enzymu ALT** **4. imunochromatografický test HIV, losování na další imunografické testy.**  
Dětailně: postupný odběr krve z prstu, ELISA - Et OH, promývání destiček, zjišťování konc. antigenu, ředění Ag, kalibrační křivka a napipetování na destičku; v mezičase barvení roztěrů a krevní diferenciál; stanovení ALT, losování 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, stojánek, skla na roztěr, desinfekce, jehly, souprava na barvení-Leukodif, pipety, špičky, odpadní nádoba, stojánky, ependorfky, papírky na losování

st 8:30

**Instruktaž: 1. imunochromatografické testy** **2. test aktivity a cytotoxicity lymfocytů, ATP test** **3. odběr hemolymfy z larev zavíječe voskového**

**Detailněji: 1. imunochromatografické testy** **2. test aktivity a cytotoxicity lymfocytů, ATP test** **3. odběr hemolymfy z larev zavíječe voskového, kultivace se škrobovými částicemi a sledování fagocytárních schopností hemolymfy, barvení skel a prohlížení hemocytů pod mikroskopem, počítání FI a % F, krevní diferenciál; 4. příprava preparátu ze střev klíštěte** **5. úprava destiček na ELISA -pokračování: odstranění Ag a promytí, napipetování vazebného roztoku s kaseinem, inkubace s kaseinem, promytí destiček;**

**Pomůcky:**

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.

ELISA: blokovací-vazebný roztok s kaseinem, promývací roztok, koloidní stříbro 50 ppm, promývačka, kit na měření aktivity a cytotoxicity lymfocytů - ATP test

Čt: 8.30

### **Instrukce – metoda HIT**

Detailněji: metoda HIT - průkaz přítomnosti antigenů krevního systému AB0 ve slinách člověka  
Pomůcky: Komerční diagnostika (EXBIO Olomouc) anti-A (IgM) monoklonální, anti-B (IgM) monoklonální, anti-H monoklonální; náplav diagnostických erytrocytů A, B, 0; bromelin, pufrovaný fyziologický roztok 0,85% (0,15 mmol/l) NaCl, destičky na odečítání výsledků, vodní lázeň na 100 C°, centrifuga, zkumavky, stojánky na zkumavky, pipety, špičky, rukavice!, roztok ajatinu, nádobky na odpad, fixy.

Pá 8:30

### **Instrukce: 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 substrátového 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. Dokončování metod, kontrola výsledků

#### **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 - podrobně:**

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

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

**ELISA - stanovení přítomnosti protilátek proti COVID-19**

**Turbidimetrické stanovení přítomnosti enzymu ALT neboli test aktivity jaterních buněk, ALT test**

**Test aktivity a cytotoxicity lymfocytů, ATP test**

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

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

**Příprava preparátu ze střev klíštěte**

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

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

**Dále výběr z dalších testů**

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

**Rychlá imunochromatografická metoda stanovení přítomnosti Helicobacter pylori ve stolici**

**Rychlý test pro stanovení Streptococcus A (pyogenes) ve stěru hrdla**

**Rychlý test pro stanovení Streptococcus pneumoniae v moči**