

Koncepce předmětu spec. imunolog. metody Bi 9250C, zimní semestr 2014
Časový rozpis blokového cvičení z předmětu Speciální cvičení z imunologie
16 studentů, 2h/2kredity

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

- a) bezobratlých
- b) obratlovců

Metody: Odběr a zpracování krve (krevní diferenciál), 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: Po.-čt. 15.12.-18.12. 014 od 8.30hod

Po 8:30

Instruktaž: ke cvičení toho dne **1. ALT, 2. krevní roztěr, barvení a příprava séra 3. příprava destiček na ELISA, imunochromatograf. test HIV-v případě času, ruleta** 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; 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

út 8:30

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

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

st 8:30

Instrukce: 1. Test aktivity lymfocytů. 2. Průkaz přítomnosti antigenů erytrocytů ve slinách člověka, v mezičase počítání krevní diferenciál

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.

čt 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 substr. roztoku, inkubace se substrátem, zastavení reakce pomocí H₂SO₄, měření na ELISA-readeru, v mezičase: krevní diferenciál, FI, % fagocytózy.

Pomůcky:

ELISA: blokovací roztok, promývací roztok, promývačka, konjugát, substrátový roztok, substrát, H₂SO₄, ELISA-reader na 492 nm

Pipety, špičky, stojánky, ependorfky

Přehled metodik:

Odběr a zpracování krve, příprava séra, stanovení krevního diferenciálu

Imunodifúze – metoda Manciniová

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

Test aktivity lymfocytů, ATP test

Test aktivity jaterních buněk, ALT test

Rychlý kvalitativní test pro stanovení přítomnosti RSV 1x

Rychlý kvalitativní test pro časné potvrzení těhotenství 3x

Rychlý kvalitativní test pro stanovení přítomnosti HIV viru 16x

Rychlá imunochromatografická metoda stanovení přítomnosti hemoglobinu ve stolici - individuální stanovení 8x

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

Rychlá imunochromatografická metoda stanovení přítomnosti H. pylori ve stolici 2x

Pozorování buněk hemolymfy (hemocyty hmyzu), barvení buněk

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

Průkaz přítomnosti antigenů erytrocytů ve slinách člověka (HIT)

Pozn. Pro učitele: Zajistit funkčnost dařáku