

СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР  
Институт клинической иммунологии

МЕТОДИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО  
ПО ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА ЛОКАЛЬНОГО ГЕМОЛИЗА  
И СТАТИСТИЧЕСКОМУ ОЦЕНИВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ

ДЛЯ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ  
учреждений

НОВОСИБИРСК - 1988

Методические рекомендации составлены сотрудниками  
лаборатории регуляции иммунитета Института клинической  
иммунологии СО АМН СССР и предназначены для сотрудников  
научно-исследовательских учреждений.

Составители: профессор, д.м.н. В.А.Козлов, м.н.с. О.Т.Ку-  
даева, м.н.с. Е.Н.Наумова, Т.В.Елисеева.

Рецензенты: с.н.с., к.м.н. А.В.Шурлыгина, к.м.н. Е.Р.Черных.

Рекомендованы к изданию Ученым советом Института клини-  
ческой иммунологии СО АМН СССР 04.10.88 г.

В настоящее время в иммунологических исследованиях широко распространённым методом характеристики гуморального иммунного ответа является определение количества антителообразующих клеток (АОК) путём локального гемолиза. Однако значение этого показателя, служащего интегральной оценкой иммунологического состояния организма, находится в большой зависимости от деталей постановки метода и сильно варьирует даже в однородных группах, что часто затрудняет статистическую обработку полученных результатов. В настоящем руководстве приводятся некоторые рекомендации по стандартизации и статистическому оцениванию данных при использовании двух наиболее распространённых модификаций метода локального гемолиза для определения количества АОК, продуцирующих антитела класса IgM при ответе на тимусзависимый антиген - эритроциты барана (ЭБ) у мышей разных линий - широко применяемом объекте иммунологических экспериментальных исследований.

## I. Животные.

В настоящее время выведено и поддерживается много линий инбредных мышей, отличающихся по уровню ответа на тот или иной конкретный антиген, в частности, и на ЭБ.

К низкоотвечающим на ЭБ относятся мыши линии C57BL/6. После иммунизации в селезёнке животных этой линии на пике ответа определяется примерно  $10^4$  АОК.

Высокий тип ответа на ЭБ демонстрируют мыши линий SWA, BALB/c, а также гибриды первого поколения SWA C57BL/6. Уровень ответа у мышей этих генотипов составляет примерно

$10^5$  АОК на селезёнку.

В опытах используются мыши обоего пола, но иммунный ответ самцов приводит к появлению в селезёнке несколько большего количества АОК по сравнению с самками той же линии.

Обычно в опытах используют молодых животных 2-ухмесячного возраста. Показано, что количество АОК в селезёнке, образующихся в ответ на иммунизацию, возрастает на начальных этапах онтогенеза. К старости наступает снижение величины гуморального иммунного ответа на тимусзависимый антиген и у мышей в возрасте 24 месяцев количество АОК в селезёнке составляет примерно 10% от уровня ответа молодых животных.

На начальных стадиях онтогенеза имеется корреляция между возрастом животного и массой его тела, так что в стандартных условиях мышей можно подбирать в однородные группы по массе тела. Обычно используются мыши с массой 18-20 г.

## 2. Иммунизация.

Оптимальной дозой при иммунизации мышей эритроцитами барана является  $2 \cdot 10^8$  ЭБ (это количество ЭБ соответствует 0,5 мл 2% взвеси ЭБ). Значительно меньшие или большие дозы приводят к развитию сниженного ответа.

Наиболее часто используют внутривенный и внутрибрюшинный способы иммунизации. Пути антигена в организме при этих способах поступления в организм отличаются между собой. При введении антигена внутривенно большая его часть обнаруживается в печени и селезёнке, причём антителопродукенты образуются, в основном, в селезёнке. При внутрибрюшинном спо-

собе иммунизации часть антигена поступает через лимфатические сосуды в грудной проток, другая часть захватывается макрофагами в брюшной полости, при этом выраженная плазмоцитарная реакция наблюдается со стороны лимфоидной ткани брюшной полости. Количество АОК, формирующихся в селезенке, при этом способе оказывается меньше, чем при внутривенной иммунизации той же дозой антигена.

Динамика образования антителопродуцентов у мышей разных линий отличается, поэтому необходимо перед началом эксперимента определить время, когда наступает пик ответа. Для мышей низкоотвечающей линии C57BL/6 показано более медленное нарастание и снижение ответа, количество АОК можно определять у них на 4 и 5 сутки. Мыши высокоотвечающих генотипов формируют максимальное количество АОК на 4 сутки после иммунизации, затем их количество резко снижается.

Имеются суточные колебания в количестве АОК. Показано, что для выявления максимального ответа лучше иммунизацию и тестирование проводить в раннее светлое время.

Максимальный разброс результатов в однородных группах наблюдается при проведении экспериментов в весенний период.

### 3. Характеристика метода локального гемолиза.

Метод определения количества антителообразующих клеток локальным гемолизом предложен в 1963 году Н.К.Ерне и А.А. Нординым. Принцип метода заключается в следующем. Иммунные лимфоциты инкубируются с эритроцитами, которыми проводили иммунизацию, в тонком слое агара. Секретируемые иммунными лим-

фоцитами антитела диффундируют в окружающее пространство и фиксируются на эритроцитах. Добавление комплемента вызывает лизис эритроцитов с присоединёнными антителами и вокруг лимфоцитов, выделивших антитела, образуются прозрачные зоны гемолиза, число которых можно сосчитать.

В зависимости от среды, применяемой для инкубации клеток с эритроцитами, используют два основных варианта этого метода: в геле по Н.К.Ерне и А.А.Нордину и в жидкой среде по А.Дж.Каннингхему и А.Сценбергу.

### 3.1. Выделение клеток селезёнки.

Мышей забивают дислокацией позвоночника, селезёнки забивают во флакончики со средой, расстригают ножницами, многократно пропускают через шприц с иглой, фильтруют через металлическую сеточку.

Ядродержащие клетки, если необходимо знать их количество, подсчитывают в камере Горяева. Непосредственно перед помещением клеток в агар или камеры их разводят до необходимой концентрации таким образом, чтобы количество образующихся АОК было порядка 100, так как большее количество затрудняет точный подсчёт, а меньшее количество увеличивает разброс результатов.

Все процедуры с клетками проводят на льду.

Для забуферивания всех инкубационных сред, применяемых при выделении клеток и постановки методов, используют трис-НС1 буфер, 0,2 М, рН=7,4 при 37°C; конечная концентрация буфера составляет 0,01 М.

### 3.2. Приготовление суспензии эритроцитов.

ЭБ - широко используемый тимусзависимый антиген. Для локального гемолиза необходимы ЭБ, выдержанные в течение недели при  $+4^{\circ}\text{C}$ , так как свежие ЭБ устойчивы к иммунному гемолизу, что приводит к заниженному значению результатов.

ЭБ хранят при  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение месяца с консервантом следующего состава: 6 г глюкозы и 4,5 г борной кислоты растворяют в 100 мл физиологического раствора; 15 мл консерванта добавляют к 100 мл дефибринированной крови барана.

Для постановки метода ЭБ трижды отмывают раствором Хэнкса. Для определения количества АОК методом локального гемолиза в геле готовится суспензия ЭБ концентрации  $5 \cdot 10^8$  ЭБ/мл, для метода в жидкой среде -  $4 \cdot 10^9$  ЭБ/мл.

### 3.3. Источник комплемента.

При изучении иммунного ответа мышей на ЭБ в качестве источника комплемента для выявления АОК используется сыворотка морской свинки. Обычно применяют препараты высушенной сыворотки морской свинки (Пермский НИИ вакцин и сывороток). Непосредственно перед постановкой метода сухой препарат разводят раствором Хэнкса.

Для улучшения процессов гемолиза и выявления максимального количества антителопродукторов используют свежую или свежзамороженную сыворотку морской свинки. Рекомендуется забирать кровь у нескольких животных (не менее трёх). Ретракцию сгустка проводят при  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение 1,5 час., центрифугирование выполняют также при охлаждении, чтобы уменьшить падение

активности комплемента. Сыворотку от нескольких животных пулируют, затем проводят адсорбцию эритроцитами барана (0,2 мл отмытых ЭБ добавляют к 1,0 мл сыворотки и инкубируют в течение 1 часа при +4°C, периодически помешивая). Хранят при -18°C не более месяца.

#### 3.4. Метод локального гемолиза в агаре.

Для определения количества АОК в агаре смешивают на водяной бане при +45°C 300 мкл расплавленного агара (1,12%), 100 мкл суспензии ЭБ ( $5 \cdot 10^8$  ЭБ/мл) и 100 мкл клеточной суспензии, предварительно разведённой до необходимой концентрации. Смесь быстро перемешивают и распределяют по дну пластиковой чашки Петри диаметром 40 мм. Чашки инкубируют 2 часа при +37°C, затем на поверхность слоя агара наносят 300 мкл сыворотки морской свинки, предварительно разведённой в 4 раза. Чашки инкубируют 45 мин. при +37°C. После инкубации чашки помещают в холодильник на +4°C. Подсчёт зон гемолиза проводят на следующий день.

Необходимо отметить некоторые детали постановки метода, которые имеют определённое значение для выявления максимального количества АОК этим методом и стандартизации процедуры.

Большое значение имеет марка применяемого агара. Обычно используют очищенный агар для культур тканей или агарозу (фирмы "Difco", "Serva", "Pharmacia"). Однако хорошие результаты получаются также с очищенными препаратами отечественного агара (Владивосток).

Для постановки метода локального гемолиза в агаре можно



пользоваться стеклянными и пластиковыми чашками Петри. В настоящее время отечественная промышленность (ЛЗМП, Ленинград) выпускает пластиковые чашки Петри, которые более удобны в работе, чем стеклянные. В зависимости от диаметра чашки (90 или 40 мм) готовят необходимый объём инкубационной смеси (2,5 мл для чашек диаметром 90 мм и 0,5 мл для чашек диаметром 40 мм). Соответственно на них наносят разный объём компонента: 2,0 мл для первых и 0,3 мл для вторых.

Использование чашек диаметром 40 мм более удобно, к тому же это снижает расход реактивов, однако при этом подсчёт зон гемолиза несколько затруднён по сравнению с чашками большего диаметра, так как и в том, и в другом случае нежелательно наносить такое количество клеток, которое даёт менее 50-100 зон гемолиза, так как это приводит к значительному разбросу результатов.

Подсчитывать количество зон гемолиза можно в тот же день, можно оставлять чашки в холодильнике на  $+4^{\circ}\text{C}$  и подсчитывать на следующий день. При определении количества АОК в тот же день необходимо дать чашкам постоять при комнатной температуре не менее двух часов для лучшего проявления зон гемолиза, так как подсчёт зон гемолиза непосредственно после инкубации в термостате приводит к занижению результатов.

При раславлении агара высвобождаются сульфатированные полисахариды, которые связывают ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  снижая активность компонента. Для уменьшения антикомплементарного действия агара и, соответственно, улучшения процессов гемолиза в агар добавляют ДЭАЭ-декстран (0,5 мг/мл), что приводит к увеличению количества выявляемых антителопродуцентов.

Для улучшения процессов гемолиза вместо высушенных препаратов сыворотки можно использовать свежую или свежезамороженную сыворотку морской свинки. Однако при определении АОК в агаре применение свежих препаратов сыворотки эффективно только в случае нейтрализации антикомплементарной активности агара ДЭАЭ-декстраном. При выполнении этих условий выявляется в зависимости от линии мышей на 60% - 300% больше антителопродуцентов.

### 3.5. Метод локального гемолиза в жидкой среде.

Эта модификация метода была предложена А. Дж. Канингхемом и А. Сценбергом в 1965 году для устранения вязкой поддерживающей среды (гели агара, агарозы), которая затрудняет процессы диффузии антител и требует нагревания клеток, хотя и кратковременного, до довольно высокой температуры (+45°C).

Для обеспечения стабильного неподвижного слоя авторы использовали очень тонкие камеры, приготавливаемые приклеиванием покровных стёкол к предметному стеклу при помощи двусторонней липкой ленты. Так как объём такой камеры невелик, для подсчёта не менее 100 АОК заполняют 3 камеры на одном предметном стекле.

В Советском Союзе В. И. Калединым и соавторами было предложено использовать камеры, сделанные из двух предметных стёкол, склеенных смесью воска с парафином вдоль продольных сторон. Объём таких камер составляет примерно 0,2 мл и вполне достаточен для определения ста и более зон гемолиза.

Для определения АОК в жидкой среде готовят инкубацион-

ную смесь: 300 мкл среды, 100 мкл суспензии ЭБ ( $4 \cdot 10^9$  ЭБ/мл), 100 мкл сыворотки морской свинки, предварительно разведённой в 1,5 раза, и 500 мкл клеточной суспензии. Компоненты перемешивают и смесь заливают в стеклянные камеры, фиксируя их объём, что необходимо для последующего пересчёта количества антителопродуцентов во всей селезёнке. Камеры помещают в термостат и инкубируют 75 мин. при  $+37^{\circ}\text{C}$ . После инкубации подсчитывают зоны гемолиза под бинокулярной лупой (увеличение  $\cdot 42$ ).

Подсчёт зон гемолиза в камерах можно проводить через 3–4 часа, но не более, после инкубации.

Для максимального выявления количества АОК в этой модификации метода также показано использование свежей сыворотки морской свинки в качестве источника комплемента, что увеличивает количество определяемых АОК до 50%.

Для улучшения протекания процессов гемолиза и, следовательно, выявления наиболее полно всех антителопродуцентов можно рекомендовать проводить инкубацию клеток с тест-эритроцитами в гипосмотической среде. Гипосмотичность среды в этом случае достигается добавлением некоторого количества дистиллированной воды в инкубационную смесь (до 10% объёма). Эта процедура приводит к небольшому повышению количества АОК (до 10%), а также к увеличению диаметра образующихся зон гемолиза, что облегчает подсчёт и, вероятно, позволяет выявить даже "бляшки" небольшого диаметра. К такому же эффекту приводит инкубация камер при  $+39^{\circ}\text{C}$  вместо  $+37^{\circ}\text{C}$ : увеличивается количество определяемых антителопродуцентов и возрастает диаметр образуемых ими зон гемолиза.

Подсчёт зон гемолиза можно проводить на меньшем увели-

чении, чем 42, но большое увеличение позволяет увидеть в центре каждой "бляшки" антителообразующую клетку, что облегчает возможность отдифференцировать "ложные" БОК, т.е. зоны, возникающие вследствие каких-либо дефектов стекла, загрязнений и т.д.

### 3.6. Одновременное определение количества АОК двумя вариантами метода локального гемолиза.

Определение количества АОК одновременно двумя вариантами метода локального гемолиза - в агаре и в жидкой среде - показывает, что определение количества АОК в жидкой среде отличается большей чувствительностью, то есть позволяет выявлять "добавочное" количество антителопродуцентов, по-видимому, в связи с более благоприятными условиями постановки метода, с отсутствием ряда причин, мешающих секреции антител и гемолизу. Применение некоторых дополнительных условий обычно приводит к увеличению количества АОК, выявляемых в геле, однако и в этих случаях метод в жидкой среде оказывается более чувствительным.

Показано, что метод в агаре позволяет выявлять АОК, которые синтезируют антитела пониженной авидности, но с повышенной гемолизирующей способностью. АОК, выявляемые только методом в жидкой среде, характеризуются, напротив, продукцией более авидных антител со сниженной способностью активировать систему комплемента. Эти "добавочные" АОК могут быть посчитаны как разность между количеством АОК в жидкой среде (общее количество АОК) и АОК, которые могут быть выявлены и в агаре ("основ-

ные" АОК).

Кроме avidности и гемолизирующей способности синтезируемых антител, "основные" и "добавочные" АОК отличаются по ряду других свойств. Так, "основные" АОК относятся к популяции менее активно пролиферирующих антителопродуцентов, чем "добавочные" АОК. Имеется определённая связь между величиной "добавочной" популяции антителопродуцентов и силой развивающегося впоследствии IgG-ответа. Кроме того, "основные" и "добавочные" АОК характеризуются разной чувствительностью к иммунорегулирующим воздействиям.

Соотношение "основных" и "добавочных" АОК отличается у мышей разных линий, что необходимо учитывать при выборе метода. Так, мыши низкоотвечающей линии С57BL/6 развивают гуморальный ответ на ЭБ, представленный преимущественно "основными" АОК, тогда как у мышей высокоотвечающих генотипов СВА, ВА1В/с, F<sub>1</sub> (СВА×С57BL/6) хорошо выражены обе популяции антителопродуцентов, так что определение у них силы ответа по количеству АОК в агаре приведёт к значительному снижению результатов.

Относительное содержание "основных" АОК максимально на начальных стадиях иммунного ответа, тогда как доля "добавочных" АОК возрастает со временем после иммунизации, что также необходимо учитывать при выборе того или иного варианта метода для определения количества АОК в конкретных опытах.

Учитывая, что в формировании гуморального иммунного ответа принимают генетически детерминированное участие две популяции АОК, отличающиеся по свойствам продуцируемых антител, пролиферативному потенциалу, динамике появления, спосо-

бам регуляции, роли в иммунитете, для более полной информации может быть рекомендовано применение одновременного определения количества АОК двумя вариантами метода. При этом можно считать, что значительное содержание "добавочной" популяции у высокоотвечающих мышей и низкое - у мышей со слабым типом ответа, увеличение доли "добавочных" АОК в процессе как первичного, так и вторичного ответов, а также определённая связь антителопродукторов этого вида с величиной развивающегося в дальнейшем IgG-ответа свидетельствуют об определяющей роли "добавочных" АОК в формировании полноценного иммунного ответа сильного типа.

Одновременное определение количества АОК двумя вариантами метода, характеризую величины "основной" и "добавочной" популяций и соотношение между ними, оказывается особенно обоснованным при изучении воздействий с коррегирующим влиянием на иммунную систему, что следует из разной чувствительности популяций к иммунорегуляторам. В этом случае использование метода в агаре может не выявить изменений гуморального ответа, если они затрагивают только "добавочные" АОК. Определение общего количества АОК (АОК в жидкой среде) свободно от этого недостатка, но число АОК в этом случае ничего не говорит о характере ответа, его возможном дальнейшем развитии и может относительно нивелировать происходящие сдвиги при неизменной "основной" популяции антителопродукторов. Необходимо подчеркнуть, что при одновременном определении количества АОК двумя вариантами используется метод в агаре без применения реагентов, снимающих его антикомплементарную активность.

#### 4. Статистическое оценивание результатов.

Так как количество образующихся антителопродуцентов значительно варьирует даже в однородных группах, это часто затрудняет статистическую обработку полученных результатов.

Ошибка метода локального гемолиза достаточно велика и составляет 20% для агара и 10% для жидкой среды. Для снижения разброса данных определение количества АОК проводят всегда в двух параллельных пробах. Для более достоверных выводов проводят по 2-3 повтора одного и того же опыта в разные дни. При определении количества АОК в жидкой среде достаточно меньшего количества мышей, чем в случае с агаром:  $n = 10$  для жидкой среды и  $n = 30$  для агара. Значение необходимого  $n$  не зависит от линии мышей, но меняется при разных способах иммунизации: внутрибрюшинное введение антигена даёт больший разброс результатов по сравнению с внутривенным и требует большего количества животных.

Необходимым требованием проведения экспериментов является постановка контроля в день опыта, т.е. одна из групп обязательно должна быть контрольной: иммунизированной безо всяких дополнительных воздействий для определения уровня ответа в данный день, при данных условиях, с данными реагентами, данным исследователем.

Изучение распределения признака (количество АОК на пике ответа при иммунизации оптимальной дозой тимусзависимого антигена) у мышей низко- и высокоотвечающих линий показало, что оно далеко от нормального закона и не может быть удовлетворительно аппроксимировано известными законами распределений.

Таким образом, для оценивания данных, полученных методом локального гемолиза, рекомендуется применение непараметрических критериев: критерий Вилкоксона, Манна и Уитни для сравнения средних значений выборок,  $\lambda$  критерий Колмогорова и Смирнова для сравнения формы распределения двух выборок, критерий Вилкоксона для сравнения связанных выборок, H-критерий Краскела и Валлиса для оценивания однородности выборки, полученной из данных опытов, проведённых в разные дни, ранговый критерий корреляции Спирмена и другие. Тонкие различия могут быть выявлены с помощью точного метода Фишера.

Непараметрические критерии характеризуются меньшей мощностью по сравнению с параметрическими, но это справедливо лишь для признаков, подчиняющихся нормальному закону распределения. В случае показателей, распределение которых далеко от нормального и не аппроксимируется к нему какими-либо преобразованиями, непараметрические критерии оказываются более мощными, т.е. позволяют выявить достоверные различия в тех случаях, когда это не улавливается параметрическими критериями, в частности, t-критерием Стьюдента.

При первичном иммунном ответе количество АОК при внутривенном и внутрибрюшинном способах иммунизации обычно определяют в селезёнке. Для нивелирования различий, обусловленных многими причинами, в том числе и разным размером животных, часто количество АОК в селезёнке относят к содержанию ядросодержащих клеток в селезёнке. Возможно, в каких-то экспериментальных условиях и для каких-либо специальных целей это и имеет смысл, однако в качестве интегральной оценки гуморального иммунного ответа более обоснованно оперировать



величиной популяции антителопродуцентов во всей селезёнке. Без определения клеточных типов среди всей популяции спленоцитов, видов лимфоцитов и т.п. сам по себе показатель количества АОК на  $10^6$  любых ядродержащих клеток селезёнки вряд ли имеет какой-то смысл в качестве параметра иммунной системы. Более того, некоторые воздействия могут снижать клеточность селезёнки, не влияя на величину гуморального иммунного ответа. Опираясь на показатель  $n\text{АОК}/10^6$  мы в этом случае получаем неверный результат: увеличение ответа. Ошибочный вывод можно сделать и в некоторых ситуациях, приводящих к увеличению количества клеток в селезёнке, но не затрагивающих ответ на конкретный антиген: в этом случае мы получим мнимое снижение ответа. Кроме того, распределение этого показателя ( $n\text{АОК}/10^6$  клеток селезёнки) также далеко от нормального закона распределения, т.е. его применение не даёт никаких технических преимуществ.

Для стабилизации результатов необходимо добиваться стандартизации животных (возраст, пол, условия содержания) и используемых реагентов, а также тщательного выполнения условий постановки опыта и метода. Соблюдение этих требований приводит к достаточной стабильности и сравнимости данных, полученных разными сотрудниками, особенно в случае фенотипически более устойчивых мышей-гибридов, определение количества АОК в селезёнке у которых практически не отличается в разных руках.

### Рекомендуемая литература.

1. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. - Л.: Из-во Ленинградского университета, 1975.
2. Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. - М.: Наука, 1983.
3. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. - Л.: Медицина, 1978.
4. Закс Л. Статистическое оценивание. - М.: Статистика, 1976.
5. Здродовский П.Ф. Проблемы инфекции, иммунитета и аллергии. - М.: Государственное из-во медицинской литературы, 1963.
6. Зигль Э., Бем Э. Метод локального гемолиза в геле // Иммунологические методы. - М.: Мир, 1979.
7. Каледин В.И., Матиенко Н.А., Волкова А.И. Камера для учёта антителообразующих клеток в реакции Эрне-Нордина // Лаб. дело. - 1975. - №2. - С. 112.
8. Кудаева О.Т. Гетерогенность В-лимфоцитов на уровне антителопродукторов. - Автореферат диссерт. к.б.н., Новосибирск, 1988.
9. Лефковитс И., Козенца У. Исследование антителообразующих клеток методом локального гемолиза в геле // Методы исследований в иммунологии. - М. Мир, 1981.

Подписано к печати 29. II. 1988г. МН 14188  
Зак. 681 Объем I п.л. Тир. 300 экз.

Отпечатано на ротационном участке СО АМН СССР

ОТРЫВНОЙ ЛИСТ

учета эффективности использования  
материалов методических рекомендаций

Направить по адресу: 630091, Новосибирск-91, ул. Ядрицкая, 14  
ИКИ СО АМН СССР

1. Методические рекомендации: "Методическое руководство по применению метода локального гемолиза и статистическому оцениванию результатов"
2. Утверждены Ученым советом Института клинической иммунологии СО АМН СССР 4 октября 1988 года.
3. Результаты, изложенные в методических рекомендациях, используются в \_\_\_\_\_  
(организация, отдел, лаборатория)

с " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 198\_\_ г.

4. В разработке каких научных и научно-прикладных проблем используются данные методические рекомендации, эффект от их использования.
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_

5. Замечания и пожелания:

Подпись \_\_\_\_\_

(должность, Ф.И.О. заполнившего лист)