СПРАВОЧНИК

•

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

•

ВИРУСНЫЕ, РИККЕТСИОЗНЫЕ И ПАРАЗИТАРНЫЕ БОЛЕЗНИ

Под редакцией Б. И. АНТОНОВА

МОСКВА АГРОПРОМИЗДАТ 1987

gost.e-ecolog.ru

Методика постановки реакции диффузионной преципитации (РДП) для серологической диагностики инфекционной анемии лошадей

(Рекомендована 5 мая 1977 г.)

1. Введение.

1.1. Реакция диффузионной преципитации в геле — специфический лабораторный метод, основанный на обнаружении антител к вирусу инфекционной анемии лошадей в сыворотке крови при остром, хроническом и латентном течении инфекции.

1.2. Специфические преципитирующие антитела появляются в крови животных через 2—6 нед после инфицирования и сохраняются на протяжении длительного времени (более 7 лет).

2. Компоненты реакции.

2.1. Для проведения исследований необходимы: преципитирующий антиген; положительная преципитирующая сыворотка; испытуемые сыворотки; очищенный агар «Дифко»; боратный буферный раствор, pH 8,6.

2.2. Антиген и положительная сыворотка представляют собой стерильные лиофилизированные препараты, расфасованные в ампулы и не содержащие активного вируса. На каждой ампуле указывают рабочее разведение антигена или сыворотки. Лиофилизированные препараты сохраняют в холодильнике при температуре 4 °С. Срок годности препаратов — 2 года. Он может быть продлен после проверки активности антигена и сыворотки в РДП. Сухие препараты растворяют дистиллированной водой, а рабочие разведения готовят на боратном буфере.

После растворения диагностикумы сохраняют при минус 10 °С в течение 10 дн.

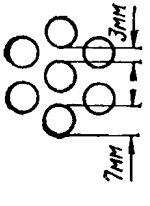
2.3. Испытуемые сыворотки получают от исследуемых лошадей в количестве 5—6 мл. Их консервируют мертиолятом 1 : 10 000 или путем добавления антибиотиков — пенициллина и стрептомицина по 1000 ЕД/мл и хранят при температуре 4—8 °С. Сыворотки без консерванта хранят в замороженном состоянии.

2.4. Боратный буфер готовят по следующей прописи: едкий натр ($NaOH$) — 2 г; борная кислота (H_3BO_3) — 11 г; вода дистиллированная до 1 л. Раствор имеет pH 8,6.

Используются для реакции химические реактивы «чистые для анализа» (ЧДА).

2.5. Для приготовления агарового геля используют агар «Дифко» и боратный буфер (pH 8,6).

1 %-ный и 2 %-ный агар готовят путем кипячения или автоклавировния (без давления) в течение 5 мин.



В чашку Петри диаметром 9—10 см сначала вносят 5 мл горячего 2 %-ного агара и дают ему застыть. Затем, не сдвигая чашек с места, во избежание неравномерного распределения агара, вносят 15 мл (охлажденного до 60 °С) 1 %-ного агара и после застывания среды приступают к вырезанию лунок. Лунки вырезают только в слое 1 %-ного агара с помощью металлического пробойника диамет-

Рис. 1. Трафарет для размещения лунок в РДП.

ром 7 мм. Одна лунка должна располагаться в центре и шесть — по окружности на расстоянии 3 мм от центральной лунки и друг от друга (рис. 1). Для того чтобы лунки были расположены на равных расстояниях, под чашку необходимо подкладывать трафарет (см. рис. 1 и 2) или пользоваться специально изготовленным пробойником из 7 жестко закрепленных трубочек. Агаровые пробки удаляют иглой, пинцетом или канюлей, соединенной с вакуумной установкой. Необходимо избегать удаления и повреждения нижнего 2 %-ного слоя агара или расслоения слоев.

Если в лунках накапливается влага, то ее отсасывают пипеткой перед внесением реагентов.

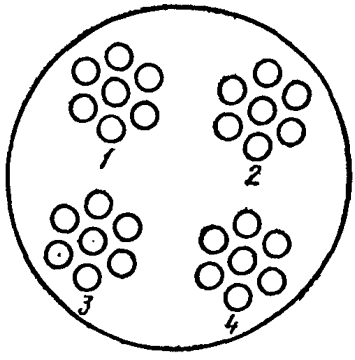


Рис. 2. Трафарет для расположения лунок в чашке Петри:

1, 2, 3, 4 — лунки с испытуемыми сыворотками.

3. Постановка реакции.

3.1. Используют 2 схемы заполнения лунок. Первая — в центральную лунку вносят микропипеткой 0,05—0,06 мл антигена. В три периферических лунки, через одну, закапывают 0,05—0,06 мл положительной сыворотки. Оставшиеся три свободных лунки заполняют с помощью тонко оттянутой пастеровской пипетки исследуемыми сыворотками. При этом в одной чашке Петри исследуют 12 проб сыворотки (рис. 3).

3.2. В случае проведения массовых исследований может быть использована вторая схема заполнения лунок, которая позволяет в одной чашке одновременно использовать 16 проб. В центральную лунку вносят антиген, в две периферические, диаметрально противоположные лунки — контрольную положительную сыворотку и в оставшиеся четыре — испытуемые сыворотки (рис. 4).

Для каждой пробы сыворотки используют отдельную пастеровскую пипетку.

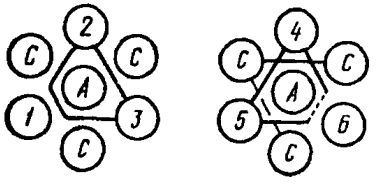


Рис. 3. Схема заполнения лунок для одновременного исследования в одной чашке Петри 12 проб сыворотки.

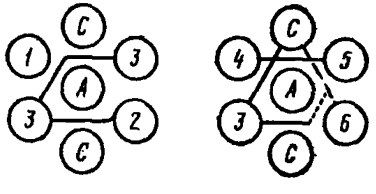


Рис. 4. Схема заполнения лунок для одновременного исследования в одной чашке Петри 16 проб сыворотки:

A — лунки с антигеном; *C* — лунки с контрольными положительными сыворотками; *1, 2, 3, 4, 5, 6* — лунки с испытуемыми сыворотками.

3.3. Необходимо обращать особое внимание на правильность заполнения лунок. Антиген и сыворотки вносят с таким расчетом, чтобы у верхнего края лунки образовался несколько вогнутый мениск и жидкость не растекалась по поверхности агара.

После заполнения лунок чашки Петри закрывают крышками и помещают во влажную камеру при температуре 18—25 °С.

4. Учет реакции.

4.1. Реакцию учитывают через 48—72 ч. Чашки просматривают на темном фоне в косонаправленном пучке света. Для этой цели используют осветитель ОИ-19. Реакцию учитывают по контрольной линии преципитации, но если она отсутствует или слабо выражена, то исследование необходимо повторить. Контрольные линии преципитации должны быть четкими, расположенными посредине между лунками с антигеном и контрольной положительной сывороткой.

4.2. Существенный сдвиг контрольных линий преципитации при правильном заполнении лунок является показателем снижения активности диагностикумов. В этом случае сухой препарат (антиген или сыворотку) растворяют в 2 раза меньшем объеме дистиллированной воды и проверяют в РДП в разведении 1 : 1,25; 1 : 1,5; 1 : 1,75. За рабочее разведение принимают то разведение диагностикума, которое дает четкую линию преципитации, расположенную посредине между лунками с антигеном и контрольной положительной сывороткой.

4.3. Оценка результатов реакции.

Отрицательная — контрольные линии продолжаются в сторону лунки с испытуемой сывороткой без изгибов или с небольшим изгибом в сторону контрольной положительной сыворотки (рис. 3 и 4, лунка *3*).

Положительная:

а) между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном образуется полоса преципитации, которая соединяется с контрольной линией (рис. 3 и 4, лунка *1*);

б) линия преципитации отсутствует, но контрольные линии образуют вблизи с испытуемой сывороткой изгиб, направленный в сторону антигена — слабоположительная сыворотка (рис. 3 и 4, лунка *2*);

в) контрольные линии укорачиваются со стороны лунки с испытуемой сывороткой, в отдельных случаях контрольные линии полностью растворяются, что свидетельствует о высоком титре антител (рис. 3 и 4, лунка *6*). Более различимые преципитации будут образовываться, если эти пробы развести 1 : 4 или 1 : 8 и повторить реакцию.

Сомнительная реакция — слабый изгиб контрольной линии плохо просматривается; образуются интенсивные неспецифические линии или ореол вокруг лунок, что затрудняет учет реакции.

От животных, давших сомнительную реакцию, через 2—3 нед берут кровь и исследование повторяют. Пробы сыворотки, давшие при повторном исследовании отрицательный результат, считают отрицательными. При получении повторной сомнительной реакции результат исследования считают положительным.

Неспецифическая преципитация образуется с некоторыми пробами сыворотки, особенно полученными от старых лошадей. Признаком неспецифической реакции является перекрещивание линий преципитации с контрольными (рис. 3 и 4, лунки *5* и *4*). В одной и

той же пробе сыворотки могут быть специфические и неспецифические антитела.

4.4. При образовании интенсивного ореола вокруг лунок, затрудняющего учет реакции, эти пробы сыворотки исследуют повторно, добавив к агару 5 % хлористого натрия. Для этого к 100 мл буфера добавляют 5 г химически чистого хлористого натрия.

4.5. Жеребят, полученных от положительно реагирующих в РДП кобыл, исследуют после отъема в возрасте 6—8 мес.

4.6. Результаты реакции регистрируют в специальных журналах, которые должны быть прошнурованы, пронумерованы и скреплены печатью учреждения.

gost.e-ecolog.ru