МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ВРЕМЕННАЯ ИНСТРУКЦИЯ

по лабораторной диагностике арбовирусных инфекций и изучению иммуноструктуры населения методом реакции торможения гемагглютинации

Москва — 1968 г.

gost.e-ecolog.ru

Временная инструкция составлена сотрудниками отдела арбовирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
здравоохранения СССР
П. Бургасов
30 августа 1968 г.

ВРЕМЕННАЯ ИНСТРУКЦИЯ

по лабораторной диагностике арбовирусных инфекций и изучению иммуноструктуры населения методом реакции торможения гемагглютинации

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) является ценным методом лабораторной диагностики арбовирусных инфекций и изучения иммуноструктуры населения природных очагов. Однако оценка результатов и сопоставимость данных отдельных исследователей возможны лишь при использовании единой методики постановки реакции. Кроме того, для получения достоверных результатов требуется точное техническое выполнение и тщательная подготовка всех ингредиентов реакции. Рекомендуемый в настоящей инструкции метод в основном соответствует оригинальной технике Кларк и Казалса (Am. Journ. Trop. Med. Hyg, 1958, v. 7, 5, стр. 561—573) с внесением рациональных модификаций и дополнений, апробированных советскими и зарубежными специалистами.

I. СБОР И ХРАНЕНИЕ СЫВОРОТОК КРОВИ

1. Общие правила получения и хранения сывороток крови

Кровь для реакции торможения гемагглютинации берут у людей или животных стерильно. Сыворотку крови отделяют от сгустка обычным способом в асептических условиях и хранят в нативном виде (без консерванта и прогревания) при 4—6°С до момента исследования. При необходимости длительного хранения и повторных исследований сыворотки лучшим способом является замораживание при —50°С. Поскольку повторное замораживание и оттаивание разрушает антитела, рекомендуется разлить сыворотку на несколько небольших порций для одноразового использования каждой из них.

2. Диагностические исследования

Для диагностических целей исследуют парные сыворотки крови больных, взятой на 1—3 и 14—20 дни от начала болезни. Кровь берут стерильно из вены в количестве 5—7 мл и направляют в лабораторию со следующими сопроводительными данными:

а) Лечебное учреждение, направившее кровь,
б) фамилия, имя, возраст и профессия больного,
в) клинический диагноз, наличие лихорадки,
г) день болезни,
д) местность, где проживал или которую посетил больной в течение месяца до заболевания.

Сыворотку крови исследуют с антигенами вирусов, которые могут быть предположительными возбудителями заболевания. Ориентировочными данными являются клинический диагноз и эпидемиологическая ситуация в данной местности. Показателем перенесенного заболевания является прирост титра антител более чем в 4 раза.

При исследовании однократно взятой сыворотки крови интерпретация положительных результатов часто затруднительна. Так у лиц, проживающих на территории природного очага, наличие антител в крови может быть следствием ранее имевшего место контакта с данным вирусом или вирусом одноименной группы. В данном случае диагностическую ценность имеет высокий титр антител (свыше 1 : 320). Рекомендуется также дополнительное исследование в реакции связывания комплемента и нейтрализации.

3. Изучение иммуноструктуры населения

Метод серологической разведки широко используется для изучения распространения арбовирусов в определенной местности. Для этой цели собирают и исследуют на антитела кровь у людей, млекопитающих, птиц и холоднокровных, среди которых может осуществляться циркуляция вируса. Эти исследования могут быть целенаправленными при наличии клинико-эпидемиологических показателей на определенные арбовирусные инфекции. При поисковых исследованиях в местности, откуда еще не поступало сведений об арбовирусах, следует предварительно теоретически оценить по биоценотическим показателям, какой круг инфекций там может оказаться.

II. РЕАКЦИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ И ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Большинство известных арбовирусов обладает способностью агглютинировать эритроциты гусей. Феномен гемагглютинации (РГА) проявляется в свободной от ингибиторов среде при определенном солевом составе и pH буферных растворов и при благоприятной температуре. Ингибиторы гемагглютинации имеют в основном липопротеиновую природу. Они

содержатся в экстрактах органов животных и куриных эмбрионов, в сыворотках крови, образуются в результате метаболизма при размножении вирусов в тканевых культурах. Поэтому антигены и сыворотки, участвующие в реакции, в первую очередь должны быть избавлены от присутствия ингибиторов. С учетом определенных требований подготавливают и другие ингредиенты реакции.

Основные и вспомогательные ингредиенты РГА и РТГА.

1. Антигены
2. Сыворотки
3. Эритроциты гусей
4. Боратный буферный раствор pH 9,0
5. Фосфатные буферные растворы pH 6,0 и 7,0
6. 25% взвесь каолина на боратном буфере pH 9,0
7. Раствор Альзовера.

Для приготовления всех ингредиентов реакции необходимо применять только химически чистые реактивы. Измерение pH должно проводиться с помощью pH-метра (например ЛПУ-01).

1. Антигены

Источником получения гемагглютинирующих (ГА) антигенов являются органы и сыворотка крови зараженных мышей, инфицированные тканевые культуры. Многие арбовирусы являются возбудителями опасных для человека заболеваний, поэтому в широкой практике могут использоваться лишь неинфекционные антигены. Пользование инфекционными антигенами таит и другую опасность — возможность занесения инфекции, ранее не свойственной данной местности, и создание нового природного очага. Для массовых серологических исследований удобны стандартные неинфекционные диагностикумы, которые обеспечивают однотипность условий реакций и полную безопасность работы.

При отсутствии нужных для работы стандартных антигенов прибегают к приготовлению антигенов в лаборатории. В литературе описан ряд способов приготовления антигенов применительно к разным вирусам. Ниже будут приведены только наиболее универсальный метод сахарозо-ацетоновой экстракции и наиболее простой метод — щелочной экстракции получения ГА антигенов из мозга новорожденных мышей.

Все работы по изготовлению антигенов и постановка реакций с инфекционными антигенами должны проводиться при

соблюдении режима работы с особо-опасными инфекциями, предусмотренным соответствующими инструкциями.

Метод щелочной экстракции. Мышей заражают в мозг по 0,02 мл вирусом в разведении 10^{-2}—10^{-3}. Возраст мышей для заражения подбирают в зависимости от их восприимчивости к вирусу и от длительности инкубационного периода инфекции. Обычно используют 4—6 дневных мышей при инкубации 1—2 дня, 3—4-дневных при инкубации 3—4 дня и 1—2-дневных при более длительном инкубационном периоде. Заболевших мышей обескровливают, разрезая ножницами грудную клетку. Затем извлекают мозг. Мозг для приготовления антигена используют немедленно, а при необходимости хранения помещают при —70°С (в контейнеры с сухим льдом). Из мозга по весу готовят 10% суспензию на боратном буферном растворе pH 9,0 и центрифугируют при 10 000 об/мин. на холоду в течение 1 часа. Надосадочная жидкость является антигеном.

Метод сахарозо-ацетоновой экстракции. Ацетон предварительно охлаждают при —20°С, 8,5% раствор сахарозы хранят при 4°С. Весь процесс приготовления антигенов проводят в ледяной бане. Заражение мышей и подготовку мозга делают так же, как для метода щелочной экстракции. Мозг гомогенизируют в 4-х объемах 8,5% сахарозы. Гомогенат по каплям добавляют к охлажденному ацетону при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Ацетон должен быть в пропорции 20 объемов к 1 объему гомогената. Смесь центрифугируют 10 минут при 1800 об/мин. Надосадочную жидкость молочного цвета удаляют. Осадок имеет вид розоватой вязкой массы, плотно прилипшей к стеклу. К осадку добавляют новую порцию ацетона в том же объеме, что и первый раз, оставляют на 1 час для обезвоживания осадка. Через некоторое время осадок надо размешать с помощью стеклянной палочки и получить довольно гомогенную суспензию. Суспензию затем центрифугируют как первый раз. Надосадочную жидкость удаляют, осадок соединяют со свежей порцией ацетона, затем центрифугируют, удаляют ацетон, а осадок высушивают при небольшом отрицательном давлении. Между насосом и сосудом с антигеном должна быть бутыль с дезинфицирующим раствором. К высушенному осадку добавляют боратный буферный раствор pH 9,0 из расчета 2 мл раствора на 1,0 г мозговой ткани и оставляют на 18 часов для экстракции, затем центрифугируют на холоду 1 час при 10 000 об/мин. Надосадочная жидкость является антигеном.

2. Подготовка сывороток крови для РТГА.

Обработка сывороток крови заключается в удалении ингибиторов гемагглютинации и нормальных агглютининов гусиных эритроцитов. Используют в основном два метода удаления ингибиторов: адсорбция каолином и экстракция ацетоном. Оба способа дают практически одинаковые результаты при обработке сывороток крови людей, мышей, морских свинок, кроликов. При работе с сыворотками птиц и при исследовании трупной крови любого вида животных следует пользоваться ацетоновой экстракцией. Сыворотки крови для РТГА нельзя прогревать т к. в результате нагревания выявляются скрытые ингибиторы, к которым особенно чувствительны арбовирусы группы А. Обработку сывороток удобно проводить накануне опыта. Обработанные сыворотки обычно пригодны для использования в течение нескольких дней.

Адсорбция каолином. Цельную сыворотку разводят боратным буфером pH 9,0 в соотношении 1 объем сыворотки и 4 объема буфера (1 : 5) и добавляют равное количество 25% взвеси каолина. Смесь встряхивают в течение 20 минут, затем отделяют каолин центрифугированием 30 минут при 2500 об/мин. В итоге обработанная сыворотка разведена 1 : 10. Обработка проводится при комнатной температуре.

Экстракция ацетоном. Сыворотку разводят 1 : 10 физиологическим раствором и охлаждают в ледяной бане. Затем добавляют охлажденный ацетон из расчета 12 объемов ацетона на 1 объем разведенной сыворотки. Экстракцию проводят в ледяной бане 5 минут при периодическом встряхивании. Образовавшийся преципитат осаждают центрифугированием 5 минут при 2500 об/мин, ацетон удаляют. Обработку ацетоном подобным образом повторяют еще дважды, каждый раз применяя свежую порцию ацетона в таком же объеме, что и первый раз. Осадок высушивают с помощью слабого вакуума и растворяют боратным буфером pH 9,0 до исходного объема, эквивалентного разведению сыворотки 1 : 10.

Удаление нормальных агглютининов гусиных эритроцитов. После удаления ингибиторов сыворотку охлаждают, затем на каждые 5 мл разведенной сыворотки добавляют 0,1 мл осадка гусиных эритроцитов. Адсорбция продолжается 20 минут в ледяной бане при периодическом встряхивании. Эритроциты удаляют центрифугированием 10 минут при 1500 об/мин.

3. Получение и подготовка эритроцитов

Взятие крови и обработка эритроцитов. Источником получения эритроцитов являются гуси-самцы, поскольку отмечено,

что у самок в период яйцекладки поверхностные свойства эритроцитов и их способность агглютинироваться меняются. Кровь у гуся берут из подкрыльцовой вены в шприц, содержащий, 2,0 мл раствора Альзовера. Кровь из шприца переносят затем во флакон с раствором Альзовера из расчета, чтобы на 1 мл взятой крови приходилось 4 мл раствора. Флакон неоднократно встряхивают, чтобы кровь не свернулась. Затем кровь фильтруют через марлевый фильтр. Эритроциты осаждают центрифугированием при 2000 об/мин 15 минут и отмывают три раза физиологическим раствором, центрифугируя каждый раз 15 минут при 2000 об/мин. Хранят в физиологическом растворе при 4°С. Отмытые эритроциты гусей обычно пригодны для использования в течение 6—7 дней. Потемневшие и гемолизированные эритроциты не пригодны. Подготовленные таким образом эритроциты используют для обработки сывороток и для реакций.

Приготовление взвеси эритроцитов. В реакции используют 0,25% взвесь эритроцитов на фосфатном буфере соответствующего pH. Фосфатные буферы со значениями pH от 6,1 до 6,9 получают путем смешивания в разных пропорциях фосфатно-буферных растворов с pH 6,0 и 7,0 (см. табл. 1).

Таблица 1

Схема приготовления фосфатных буферных растворов с условным pH от 6,0 до 7,0

		pH									
Фосфатный буфер	6,0	6,1	6,2	6,3	6,4	6,5	6,6	6,7	6,8	6,9	7,0
		объем раствора в мл									
pH 6,0	10.0	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	—
pH 7,0	—	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0

Буферные растворы, на которых готовят взвеси эритроцитов имеют кислую реакцию. Эритроциты в кислой среде меняют поверхностные свойства и способность агглютинироваться, поэтому взвеси эритроцитов нужно готовить непосредственно перед употреблением.

4. Приготовление вспомогательных растворов

Для постановки РГА и РТГА используют два типа буферных растворов:

а) Боратный буфер pH 9,0 для разведения антигенов и сывороток.

б) Фосфатные буферы различных pH для приготовления взвеси гусиных эритроцитов.

Буферные растворы готовят из химически чистых реактивов:

повареной соли NaCl
борной кислоты H_3BO_3
едкого натра NaOH
одноосновного фосфорнокислого натрия Na_2HPO_4
двуосновного фосфорнокислого натрия NaH_2PO_4.

Приготовление молярных растворов. А. 1,5 М NaCl 87,689 г на 1 л дистиллированной воды.

Б. 0,5 М H_3BO_3 (борной кислоты) — 30,92 г растворяют в 700 мл горячей дистиллированной воды. Раствор охлаждают до комнатной температуры и затем доводят до 1 л дистиллированной водой.

В. Концентрированный раствор едкого натра — NaOH, из которого готовят нормальный раствор перед употреблением. Для этого к 500 г NaOH добавляют 500 мл дистиллированной воды, встряхивают при комнатной температуре. Концентрированную щелочь разводят, добавляя к одной части щелочи 24 части дистиллированной воды и титруют для определения молярности раствора.

Г. Для получения 0,5 М раствора Na_2HPO_4 — 77,99 г Na_2HPO_4 растворяют в 1 л дистиллированной воды.

Д. Для получения 1,0 М раствора NaH_2PO_4 — 138,0 г препарата растворяют в 1,0 литре дистиллированной воды.

Боратный буфер с pH 9,0 — готовят из раствора А, Б и В.

А. 1,5 М NaCl	— 80 мл
Б. 0,5 М H_3BO_3	— 100 мл
В. 1,0 М NaOH	— 24 мл

Смесь трех растворов дистиллированной водой доводят до 1 литра.

Фосфатные буферы. Достаточно приготовить два основных буферных раствора pH 6,0 и 7,0 при соединении которых в различных соотношениях, можно получить растворы с заданными показателями pH.

Фосфатные буферы pH 6,0 и 7,0 готовят из растворов А, Г и Д.

	pH 6,0	pH 7,0
А. 1,5 М NaCl	100	100
Г. 0,5 М Na_2HPO_4	32	240
Д. 1,0 М NaH_2PO_4	184	80

Показатели pH 6,0 и 7,0 этих растворов, как и растворов промежуточных pH являются условными, т. к. достигают указанных значений pH только при соединении с равным объемом боратного буфера pH 9,0. Растворы сохраняют при комнатной температуре. Если в фосфатных буферах при хранении выпадают кристаллы, то перед употреблением необходимо подогреть растворы до полного растворения кристаллов.

Приготовление взвеси каолина. К 100 мл боратного буфера pH 9,0 добавляют при постоянном помешивании 25 г каолина. Полученную массу фильтруют через марлевый фильтр. Эта взвесь может храниться неопределенно долго при 4°С.

Состав раствора Альзовера:

Декстроза безводная (или глюкоза) — 10,25 г
Лимоннокислый натрий ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) — 4,0 г
Лимонная кислота ($H_3C_6H_5C_7 \cdot 7H_2O$) — 0,275 г
Поваренная соль (NaCl) — 2,1 г.

Дистиллированная вода до 500 мл. Раствор стерилизуют фильтрованием через фильтр Зейтца или автоклавированием 10 минут при 110° С.

5. Титрование антигенов в РГА

При работе со стандартными антигенами проверяют титр антигенов в РГА при нескольких показателях pH, близких к оптимальным. Если исследования ведут с неизвестными антигенами, то устанавливают его гемагглютинирующую активность при pH от 6,0 до 7,0. Обычно реакция ставится при 37°С, однако работая с новым антигеном его титруют также при 20° и 4°С. Реакцию учитывают через 30—40 минут при 37° и через 1 час при 20° и 4°С.

Гемагглютинины арбовирусов сохраняются в щелочной среде, поэтому все разведения антигена делают на боратном буферном растворе pH 9,0. Феномен гемагглютинации проявляется при определенных для каждого вируса показателях pH, которые находятся в кислой зоне, поэтому к разведениям антигена на боратном буфере добавляют взвесь эритроцитов в кислом фосфатно-буферном растворе, чтобы в момент контакта эритроцитов с антигеном создалась оптимальная концентрация водородных ионов.

Реакцию ставят в объеме 0,8 мл. Получают ряд нисходящих разведений антигена с коэфициентом 2. Для этого в ряд лунок на пластинах из органического стекла разливают боратный буфер pH 9,0 по 0,4 мл. Затем в первую лунку вносят 0,4 мл антигена, перемешивают и переносят в следующую

лунку 0,4 мл, а из последней лунки удаляют 0,4 мл антигена. Для каждого разведения пользуются отдельной пипеткой. Если антиген заведомо высокого титра, то его начинают титровать с разведения 1 : 10—1 : 40. К каждому разведению антигена добавляют 0,4 мл свежеприготовленной взвеси гусиных эритроцитов в фосфатном буфере заданного pH. Отдельно ставят контроль эритроцитов без антигена. Пластины осторожно встряхивают для смешивания ингредиентов. Для получения более точных результатов, титрование проводят параллельно в двух рядах лунок. Более точные результаты титрования получают при подготовке разведений антигена во вспомогательном ряду пробирок. Разведения делают в объеме не менее 5 мл отдельными пипетками и затем переносят на доски по 0, 4мл. На таблице 2 дан образец протокола РГА.

При отсутствии специфической реакции, эритроциты, оседая, имеют вид компактного осадка. Полная гемагглютинация проявляется в виде однородной пленки эритроцитов, покрывающей дно лунки. При неполной гемагглютинации пленка сочетается с более плотным осадком эритроцитов.

Условные обозначения степени гемагглютинации:

4 и 3 — различная степень интенсивности гемагглютинации
2 — частичная гемагглютинация
1 — следы гемагглютинации
0 — отсутствие гемагглютинации.

Титром антигена считают его разведение, обнаруживающее интенсивную гемагглютинацию (3—4).

Таблица 2

Образец протокола РГА

pH	разведения антигена								
	2	4	8	16	32	64	128	256	512
6,0	4	4	4	4	4	4	4	4	0
6,2	4	4	4	4	4	4	3	2	0

Титр антигена в данном примере 1 : 256 при pH 6,0. Это значит, что 0,4 мл разведения 1 : 256 содержит одну гемагглютинирующую единицу (АЕ).

6. Реакция торможения гемагглютинации

В реакции торможения гемагглютинации титруют сыворотку в различных разведениях при постоянной дозе (8 АЕ) антигена. Реакцию ставят при оптимальном для каждого антигена pH и температуре в объеме 0,8 мл, соединяя сыворотку

и антиген по 0,2 мл, и эритроциты 0,4 мл. Реакция протекает в два этапа. Первый этап — соединение сывороток и антигенов и контакт при 4° С в течение 18—20 часов. Второй этап — добавление эритроцитов, экспозиция при 37°С и чтение результатов. Таким образом для постановки реакции требуется два дня. При диагностических исследованиях сыворотку крови, взятую в остром и реконвалесцентном периоде титруют в одном опыте, чтобы можно было с достоверностью сопоставить титр антител в обоих. При изучении иммуноструктуры населения рекомендуется сначала поставить ориентировочный опыт с сыворотками в разведении 1 : 10 (минимальное разведение сыворотки после обработки) и при положительных результатах исследовать в серийных разведениях.

Приготовление рабочей дозы антигена. Рабочей дозой антигена в РТГА является 8 АЕ в 0,2 мл. Антиген титруют в РГА, как указано выше. Исходя из титра антигена, готовят разведение, содержащее 16 АЕ в 0,4 мл. При соединении с сывороткой в РГА антиген разводится в 2 раза и таким образом в реакции участвует 8 АЕ. Рабочую дозу контролируют дважды. Первый раз перед опытом РТГА и второй раз в конце опыта. На таблице 3 дана схема контрольного титрования рабочей дозы антигена.

Таблица 3

Схема разведения рабочей дозы антигена при контрольном титровании

Ингредиенты в мл	16 АЕ	8 АЕ	4 АЕ	2 АЕ	1 АЕ	0,5 АЕ
Боратный буфер pH 9,0	—	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Разведение антигена, соответствующее 16 АЕ	0,4	0,4	В каждую последующую пробирку переносят по 0,4 мл			
Эритроциты в фосфатном буфере оптимального pH	0,4	0.4	0,4	0,4	0,4	0,4

Контрольное титрование ставят только при оптимальном значении pH. Если приготовленное разведение антигена содержит в 0,4 мл больше 16 АЕ антигена (например 32 АЕ) следует добавить к нему соответствующее количество боратного буфера, т. е. развести. Если 0,4 мл содержат меньше

16 АЕ антигена, необходимо добавить соответствующее количество антигена и снова проверить активность рабочей дозы.

Техника постановки РТГА. В ряду лунок на пластинках готовят ряд последовательных разведений сывороток на боратном буфере pH 9,0 с коэффициентом 2. При исследовании одной и той же сыворотки с несколькими антигенами удобнее и точнее приготовить разведения сывороток во вспомогательном ряду пробирок, а потом перенести в лунки по 0,2 мл. К 0,2 мл сыворотки каждого разведения добавляют по 0,2 мл антигена в рабочей дозе 8 АЕ.

Пластины осторожно встряхивают и ставят в рефрижератор при 4—6°С на 18—20 часов. На следующий день добавляют по 0,4 мл свежеприготовленной взвеси эритроцитов на фосфатном буфере оптимального pH. После встряхивания пластины ставят в термостат при 37°С. Реакцию читают через 30—40 минут.

С целью исключения неспецифических реакций, ставят следующие контроли:

1. Контроль эритроцитов на спонтанную гемагглютинацию в 3-х лунках (к 0,4 мл боратного буфера добавляют 0,4 мл 0,25% взвеси гусиных эритроцитов).

2. Контроль на полноту удаления неспецифических гемагглютининов. К 0,2 мл обработанной сыворотки добавляют 0,2 мл боратного буфера и 0,4 мл 0,25% взвеси эритроцитов.

Если в этих двух видах контроля будет отмечаться агглютинация, реакция не учитывается.

3. Контроль рабочей дозы антигена. В 5 лунок разливают по 0,4 мл боратного буфера. В первую наливают 0,4 мл антигена в рабочей дозе и делают далее двухкратные разведения, перенося отдельными пипетками по 0,4 мл. Для полного соответствия условий, имитирующих основной опыт, антиген соединяют с боратным буфером в два этапа. Из первой лунки переносят антиген в последующие только через 18—20 часов перед добавлением эритроцитов во всю реакцию.

Таким образом в первой лунке должно содержаться 8 АЕ, во второй 4 АЕ, в третьей 2 АЕ, в четвертой 1 АЕ, а в пятой меньше одной АЕ. Доза антигена соответствует 8 АЕ, если при контрольном титровании агглютинация наблюдается в четырех лунках.

Титром сыворотки считают ее наивысшее разведение, которое вызывает полную или почти полную задержку гемагглютинации с 8 единицами антигена. Если оказалось, что в опыте было использовано 4 или 16 единиц, то такую реакцию тоже учитывают. Тогда титр сыворотки трансформируют применительно к 8 АЕ, в случае 16 АЕ увеличивая вдвое, в слу-

чае 4 АЕ уменьшая вдвое. Этот прием допускается, но иногда нет абсолютной зависимости титра сыворотки от дозы антигена, поэтому реакцию лучше повторить.

Положительными считают результаты, если исследуемые сыворотки подавляют РГА в разведении не ниже 1 : 40, слабоположительные, если сыворотки показывают торможение в разведении 1 : 20. Сомнительными считаются результаты, подавляющие гемагглютинацию в разведении 1 : 10.

Таблица 4

Образец протокола РТГА при исследовании парных сывороток с 8 АЕ антигена

День от начала заболевания	разведения сыворотки							
	10	20	40	80	160	320	640	1280
3	0	0	4	4	4	4	4	4
20	0	0	0	0	0	0	0	3

В данном примере титр антител в первой и второй сыворотке соответственно равны 1 : 20 и 1 : 640.

III. МИКРОКАПЕЛЬНЫЙ МЕТОД РГА И РТГА

При массовых серологических исследованиях расход антигенов и сывороток очень велик, поэтому в практику все больше входит метод микрокапельных реакций. Для этой цели можно пользоваться микротитратором Такачи (Венгрия). Прибор состоит из пластин органического стекла с углублениями, объем которых равен 0,15 мл, капельниц и приспособлений для приготовления разведений. Постановка РГА и РТГА с арбовирусами имеет следующие особенности в отличие от описанного выше макрометода.

1. Для разведения антигенов необходимо пользоваться 0,4% раствором альбумина в боратном буфере pH 9,0. Альбумин стабилизирует гемагглютинины и предотвращает неспецифическую агглютинацию эритроцитов. Можно пользоваться для этой цели альбумином из крови человека, изготавливаемым в Московском ин-те им. Мечникова. Так как альбумин имеет обычно кислую реакцию, то сначала готовят 4% раствор на боратном буфере pH 9,0; доводят pH до 9,0 2 М раствором NaOH, контролируя pH-метром, а затем делают рабочий 0,4% раствор.

2. Реакцию ставят в объеме 4-х капель. В РЮГА соединяют по 2 капли антигена с 2 каплями взвеси эритроцитов. В РТГА антиген и сыворотки соединяют по 1 капле, а эритроциты по 2 капли.

3. Эритроциты используют в концентрации 0,33%.

4. Поскольку с уменьшением объема ингредиентов повышаются требования в отношении точности разведений, рекомендуется разведения антигенов и сывороток делать во вспомогательном ряду пробирок и затем переносить на доски.

Применение микрокапельного метода позволит уменьшить расход антигенов и сывороток в 8—10 раз.

Ч 76338 от 26/IX-68 г. Объем 1 п. л. Зак. 2109 Тир. 500
gost.e-ecolog.ru
Типография Министерства здравоохранения СССР