МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ

Всесоюзный научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по лабораторной диагностике болезни Ньюкасла и классической чумы птиц (гриппа птиц)

г. Покров—1972 г.

gost.e-ecolog.ru

«Методические указания по лабораторной диагностике болезни Ньюкасла и классической чумы птиц (гриппа птиц)» разработаны специалистами Всесоюзного научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии МСХ СССР.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по лабораторной диагностике болезни Ньюкасла и классической чумы птиц (гриппа птиц)

(Рекомендованы Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 1 февраля 1972 года)

1. Болезнь Ньюкасла (синоним-псевдочума) птиц и классическая чума птиц (синоним-грипп птиц) — высококонтагиозные болезни птиц, сопровождающиеся высокой летальностью. Ввиду большого сходства клинических признаков, патологических изменений и эпизоотических данных обеих инфекций их точно дифференцировать можно только лабораторными методами

Необходимость типирования возбудителей этих болезней связана с особенностью их специфической профилактики.

2. Лабораторная диагностика болезни Ньюкасла и классической чумы птиц проводится путем:

I. Выделения возбудителя в развивающихся куриных эмбрионах.

II. Постановки биопробы на птице.

III. Типирования выделенного вируса в реакциях задержки гемагглютинации, нейтрализации и связывания комплемента.

IV. Постановки дополнительных тестов. (см. схему 1).

I. Выделение возбудителя

3. Для выделения вирусов болезни Ньюкасла и классической чумы птиц требуется следующее:

—исследуемый материал —больная птица или трупы свежепогибших птиц, или селезенка (печень, мозг, почки, легкие) от них;

—физиологический раствор pH 7,0—7,3;

—стерильные ступки с пестиками;

—стерильный речной или стеклянный песок;

—стерильные пробирки бактериологические или пенициллиновые флаконы;

—стерильные пипетки на 1 и 5 мл;
—стерильные шприцы на 1 мл;
—термостат или инкубатор на 37°С;
—лабораторная центрифуга типа ЦЛ-1 или ЦЛ-3;
—лотки для куриных эмбрионов;
—овоскоп.

4. Из селезенки (печени, легких, мозга, почки) готовят 10%-ную суспензию на физиологическом растворе с соблюдением правил асептики. Для этого из исследуемого материала делают навеску в 1 г, помещают ее в стерильную ступку и растирают с небольшим количеством речного или стеклянного песка до получения гомогенной массы и затем добавляют 9 мл физиологического раствора, содержащего 100 ед/мл тетрациклина и 1:10 000 теомерсана (0,1 г на 1000 мл физраствора). Полученную массу еще раз тщательно растирают в ступке и переносят пипеткой в пробирку или пенициллиновый флакон.

Для освобождения взвеси от крупных частиц суспензию подвергают центрифугированию при 3000 об/мин. 15 минут или отстаиванию при температуре от 0 до 4°С два часа.

В дальнейшем используют только надосадочную жидкость.

5. Из полученной надосадочной жидкости делают дополнительно разведение 1:1000 на физиологическом растворе.

Исследуемым материалом в разведениях 1:10 и 1:1000 заражают по 6 куриных эмбрионов (всего 12 эмбрионов).

Для заражения используют чистые куриные эмбрионы с белой скорлупой в возрасте 10 дней.

Перед заражением эмбрионы овоскопируют, отмечают пугу, положение зародыша, бессосудистую зону на боковой поверхности хориоаллантоисной оболочки. Затем эмбрионы обрабатывают спиртом с 0,1%-ным содержанием настойки йода и фламбируют.

Инструменты и шприцы перед работой стерилизуют кипячением и помещают в стерильные чашки Петри.

Для заражения эмбриона копьем в скорлупе пробивают отверстия в центре пуги и сбоку в бессосудистой зоне. Через боковое отверстие на глубину 0,2—0,3 мм инокулируют разведения в объеме 0,1—0,2 мл. Можно заражать эмбрионы и через пугу. Отверстия заливают расплавленным парафином. Зараженные эмбрионы помещают в термостат при температуре 37°С и овоскопируют 2 раза в день.

Погибшие эмбрионы вскрывают в день гибели, а оставшиеся живыми через 56-72 часа после заражения охлаждают при 4°С в течение 12 часов и также вскрывают.

Перед вскрытием эмбрионов пугу обрабатывают 0,1%-ным

спиртовым раствором настойки иода и фламбируют. После этого, ножницами, с изогнутыми браншами, направленными вверх, отделяют пугу, затем пинцетом снимают подскорлупную оболочку, делают надрыв хориоаллантоисной оболочки и пастеровской пипеткой отсасывают аллантоисную жидкость.

При вскрытии учитывают изменения эмбрионов. Характерными признаками поражения эмбрионов вирусом болезни Ньюкасла или классической чумы птиц считается гибель эмбрионов через 20—76 часов в зависимости от вирулентности штамма вируса, с наличием множественных кровоизлияний на темени, теле и лапках зародыша.

От зараженных эмбрионов собирают аллантоисную жидкость в стерильные пробирки (из каждого разведения отдельно), которую проверяют на гемагглютинирующую активность и отсутствие бактериального загрязнения высевом на МПБ и МПА.

6. Если вирус обнаружен в разведениях 1:10 и 1:1000, следует считать причину гибели птицы установленной после того, как будет типирован возбудитель.

7. Типирование вируса болезни Ньюкасла и классической чумы птиц проводят в реакциях задержки гемагглютинации и как исключение в реакциях нейтрализации и связывания комплемента.

II. Постановка биопробы

8. Постановку биопробы проводят только в сомнительных случаях (при отсутствии клинических признаков и патологоанатомических изменений у птиц или при выделении вируса из гомогенатов исследуемых органов только в разведении 1:10).

Биопробу проводят на неиммунной к болезни Ньюкасла или классической чуме птице того же возраста и породы, на которой установлено заболевание.

Перед постановкой биопробы птиц проверяют на отсутствие в крови антигемагглютининов (см. раздел III).

Четырем птицам (у которых не обнаружено в крови антигемагглютининов) внутримышечно вводят 10%-ную суспензию исследуемых органов или аллантоисную вируссодержащую жидкость. За зараженной птицей устанавливают наблюдение в течение 10 дней.

9. При наличии в исследуемом материале вирулентного вируса болезни Ньюкасла птица заболевает через 3—7 дней после заражения и погибает через 1—5 дней после начала заболевания, при классической чуме птица заболевает через 1—5 дней после заражения и погибает через 10—72 часа после проявления клинических признаков заболевания.

10. При отрицательном результате биопробы зараженные птицы должны оставаться живыми. При гибели хотя бы одной из 4 зараженных птиц биопроба считается положительной,при условии выделения вируса, как изложено в разделе I.

III. Типирование выделенного возбудителя в реакциях задержки гемагглютинации, нейтрализации и связывания комплемента

11. Реакцию задержки гемагглютинации (РЗГА) применяют: для идентификации выделенного вируса, обладающего гемагглютинирующей активностью с заведомо известной эталонной диагностической сывороткой и при исследовании сывороток крови переболевшей или вакцинированной птицы с эталонным диагностическим антигеном.

Для постановки РЗГА требуется следующее:

—эталонные диагностические антисыворотки к вирусам болезни Ньюкасла и классической чумы птиц;

—эталонные диагностические антигены вирусов болезни Ньюкасла и классической чумы птиц;

—исследуемый гемагглютинирующий вирус или парные сыворотки от переболевших или вакцинированных птиц;

—физиологический раствор pH 7,0—7,3;

—1%-ные и 5%-ные суспензии эритроцитов кур;

—доски из плексигласа или бактериологические пробирки;

—пипетки на 1 и 5 мл.

В начале готовят диагностические антигены и сыворотки для работы. С этой целью в ампулы, содержащие антиген и сыворотки, добавляют по 1 мл стерильной дистиллированной воды или физиологического раствора и пипетируют до полного растворения содержимого, после чего готовые (растворенные) антиген и сыворотку переносят в отдельно взятые пробирки, в которые предварительно внесены по 9 мл физиологического раствора.

Приготовление 1%-ной и 5%-ной суспензии эритроцитов кур. В качестве доноров для получения эритроцитов используют петухов породы белый леггорн в возрасте от 6 месяцев до 1 года. Для отбора доноров проводят пробное взятие эритроцитов и испытание их на агглютинабильность. Петухов, эритроциты которых в контролях с физиологическим раствором показали отрицательные результаты, а с антигеном—положительные, отбирают для дальнейшей работы.

Взятие крови у петухов проводят следующим способом: ножницами делают надрез верхушки одного из зубцов гребня и набирают 50-100 капель крови, после чего кровоточащее ме-

сто прижигают раскаленным металлом (ручкой скальпеля или пинцета).

Кровь собирают в баночку с бусами, слегка смоченными физиологическим раствором, или в баночку, увлажненную 2,5%-ным раствором лимоннокислого натрия (1/3 на 2/3 объема крови). При сборе крови баночку с бусами непрерывно встряхивают до полного дефибринирования. Полученную взвесь эритроцитов фильтруют через 3-слойный марлевый фильтр и 3-кратно отмывают физиологическим раствором, осаждая на центрифуге в течение 15 минут при 1000 об/мин.

Из осадка отмытых эритроцитов готовят 1%-ную и 5%-ную взвесь в физиологическом растворе. Готовую взвесь хранят при 4° не более пяти суток.

12. Перед постановкой РЗГА ставят реакцию гемагглютинации, которая основана на способности вирусов болезни Ньюкасла и классической чумы птиц вызывать склеивание (агглютинацию) эритроцитов. Реакция гемагглютинации является подготовительным этапом для постановки реакции задержки гемагглютинации.

РГА используется с целью определения наличия вируса в исследуемом материале и его титрования.

Гемагглютинины входят в состав вирусной частицы (вириона) и могут содержаться в следующих инфицированных вирусом материалах: аллантоисной и амниотической жидкостях, оболочках и органах куриного эмбриона; в легких, печени и селезенке погибшей птицы, в жидкой и клеточной фракциях культур ткани.

Гемагглютинирующей активностью, кроме вирусов, обладают также некоторые штаммы различных видов бактерий и микоплазм.

В связи с этим с особой осторожностью следует подходить при оценке положительной РГА в бактериологически нестерильных материалах. Неспецифическая гемагглютинация может быть вызвана и изменением pH раствора.

Для постановки РГА используют эритроциты кур, лошади и многих других видов млектопитающих и птиц. Спектр гемагглютинации служит характеристикой биологической активности вируса и штаммов. Вирулентные штаммы вируса болезни Ньюкасла не вызывают агглютинацию эритроцитов лошади, чем отличаются от вируса классической чумы птиц, который способен агглютинировать их в высоких разведениях.

Для постановки РГА готовят двукратные разведения вируссодержащего материала, начиная с 1:2 до 1:2048 (1:2560), а при необходимости и выше. Для чего в ряд лунок (или про-

бирок) наливают физиологический раствор в объеме 0,5 мл. Затем с помощью пипетки объемом 1 мл в первую лунку вносят 0,5 мл вируса, трехкратно пипетируют и переносят в третью... и т. д. Из последней пробирки 0,5 мл разведенного материала удаляют, и во все лунки (пробирки) добавляют по 0,5 мл 1%-ной взвеси эритроцитов. Обязательно ставится контроль на возможность спонтанной агглютинации эритроцитов (к 0,5 мл физиологического раствора добавляют 0,5 мл 1% эритроцитов). После этого доски с лунками (или штатив с пробирками) встряхивают и оставляют при температуре 16—22°С. Учет реакции проводят через 30, 45 и 60 минут, а при использовании эритроцитов млекопитающих— через 60, 90 минут (после оседания эритроцитов в контроле) (см. схему 2).

Положительную реакцию гемагглютинации оценивают крестами (от одного до трех) по форме осадка эритроцитов. Трехкрестовая реакция определяется интенсивной и быстрой агглютинацией эритроцитов, которые осаждаются не только на дне, но и на стенках пробирки, образуя «зонтик». Двухкрестовая реакция характеризуется менее интенсивной агглютинацией, при которой на стенках пробирки заметны агглютинированные эритроциты.

Однокрестовая реакция определяется наличием незначительной агглютинации эритроцитов на дне пробирки.

В случае отрицательной реакции, так же как и в контроле, эритроциты оседают под действием тяжести, образуя на дне пробирки диск с ровными краями.

За титр вируса принимают наибольшее его разведение, при котором еще четко наблюдается агглютинация эритроцитов.

Для постановки ориентировочной РГА на хорошо вымытые предметные стекла (или чашки Петри) наносят каплю 5% эритроцитов и каплю вируссодержащего материала, тщательно перемешивают (покачиванием или пастеровской пипеткой) и наблюдают за появлением хлопьев агглютинированных эритроцитов.

13. После того, как определена гемагглютинирующая активность исследуемого материала, переходят к постановке РЗГА.

РЗГА основана на способности специфических антител нейтрализовать гемагглютинирующую активность вирусов. Эта реакция высоко специфична. Постановке основной реакции предшествует определение рабочей дозы антигена-вируса (см. схему 3). Рабочая доза вируса берется в 2-4-кратной концентрации (2-4 ГАЕ) по отношению к титру вируса (схема 2). Например, если титр гемагглютинации равен разведению 1:256 (1 ГАЕ), то рабочая доза будет 1:128 (2 ГАЕ) или 1:64

(4 ГАЕ). Для ее приготовления необходимо взять 63 мл физиологического раствора и добавить к нему 1 мл исходного вируссодержащего материала. После этого следует поставить контроль рабочей дозы.

Для этого в пять лунок (пробирок) разливают по 0,5 мл физиологического раствора и проводят титрование рабочей дозы антигена. В первую лунку (пробирку) вносят 0,5 мл рабочей дозы, трижды пипетируют и переносят во вторую и т.д.; из пятой (последней) пробирки после пипетирования удаляют 0,5 мл. В каждую из пяти лунок (пробирок) добавляют по 0,5 мл 1%-ной взвеси эритроцитов кур. При правильном выборе рабочей дозы антигена в первой и во второй лунках (пробирках), содержащих 2 и 1 ГАЕ будет наблюдаться полная агглютинация эритроцитов (зонтик), в третьей, содержащей 1/2 ГАЕ, иногда может наблюдаться нечеткая агглютинация при отрицательном результате в четвертой и пятой лунках (пробирках). Если результаты контрольного опыта не совпадают с указанными, то рабочую дозу доводят до указанной активности (развести физ. раствором или добавить антигена), после чего контроль дозы ставят вновь.

Для идентификации вновь выделенных штаммов в реакции задержки гемагглютинации используют эталонные диагностические иммунные сыворотки.

14. С диагностической (ретроспективной) целью или с целью установления напряженности иммунитета используют парные сыворотки переболевшей или вакцинированной птицы для обнаружения увеличения титра антител.Пробы сывороток крови берут в первые дни болезни или перед вакцинацией и спустя 14 дней после нее (или выздоровления).

Для постановки реакции сыворотку, предварительно прогретую при 60°С 30 минут, разводят с коэффициентом 2, начиная с 1:10 (0,1 мл сыворотки и 0,9 мл физиологического раствора). Необходимое для опыта количество сыворотки рассчитывают, исходя из количества используемых в РЗГА антигенов. На каждый антиген необходимо иметь 1 мл разведенной 1:10 сыворотки.

15. С целью уменьшения возможности ошибки, разведение сыворотки готовят в одном ряду пробирок, из которых ее затем переносят в параллельные ряды лунок (пробирок) в объеме по 0,25 мл. После того, как сыворотка будет разнесена по лункам (пробиркам) в них добавляют по 0,25 мл соответствующего антигена, содержащего2—4 ГАЕ. Приготовленный комплекс (антиген+антитело) встряхивают и ставят при температуре 18—22°С на контакт. Через 30 минут во все пробирки до-

бавляют по 0,5мл 1%-ных эритроцитов кур, снова встряхивают и оставляют при той же температуре. РЗГА читают через 30, 40 ,45 минут (схема 4).

16. Для проверки специфичности РЗГА необходимо поставить контроль на способность сыворотки спонтанно агглютинировать эритроциты. С этой целью к 0,25 мл сыворотки (2-3 лунки), взятой в разведении 1:10, добавляют 0,25 мл физиологического раствора и 0,5 мл 1%-ной взвеси эритроцитов. Если сыворотки не обладают агглютинирующей способностью, то в лунках эритроциты выпадают в осадок, как и в контроле.Если же в лунках наблюдается агглютинация, то сыворотку необходимо обработать эритроцитами. Для этого к разведенной 1:5 сыворотке добавляют равный объем 50%-ной взвеси эритроцитов (для истощения используют тот же вид эритроцитов, с которыми ставится РЗГА). Смесь встряхивают и оставляют на 30 минут при температуре 4°С, затем центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин.,отсасывают надосадочную жидкость (теперь сыворотка разведена 1:10) и повторно проверяют на спонтанную агглютинацию.

17. Оценку результатов РЗГА проводят по отсутствию или наличию агглютинации эритроцитов. Если в обследуемых разведениях сыворотки содержатся антитела (антигемагглютинины), специфически тормозящие гемагглютинацию, то антиген теряет способность агглютинировать эритроциты. В этом случае в первых 3-х—8-ми лунках или выше (в зависимости от активности антисыворотки) гемагглютинация отсутствует. В последних лунках (пробирках), где находятся большие разведения сыворотки (мало антител), будет наблюдаться полная агглютинация эритроцитов.

За титр сыворотки считают то ее наивысшее разведение, которое полностью еще задерживает гемагглютинацию.

18. Титрование возбудителя считается завершенным, а причина болезни или формирование иммунитета доказанными:

а) если эталонная диагностическая сыворотка тормозит гемагглютинирующую активность идентифицируемого штамма вируса в пределах целого или 1/2—1/8 ее титра с гомологичным эталонным диагностическим антигеном;

б) если частное от деления титра сыворотки, взятой через 14 дней, на титр сыворотки, взятой в начале заболевания или до вакцинации, соответствуют четырем и выше.

Постановка реакции нейтрализации (РН)

19. В случаях, когда гемагглютинирующая активность идентифицируемого штамма не подавляется ни одной из эталон-

ных сывороток, необходимо исключить двойную инфекцию (содержание в одном исследуемом материале вируса болезни Ньюкасла и классической чумы птиц. Для этого необходимо поставить реакцию нейтрализации.

К постановке реакции нейтрализации прибегают также в случаях, когда исследуемый материал обладает слабой гемагглютинирующей активностью (1:2—1:4).

РН ставят для определения антигенного соответствия вируса к сыворотке. Это родство устанавливают по способности сыворотки подавлять, (нейтрализовать) инфекционную активность вируса (способность вируса размножаться в чувствительной модели).

РН проводится в два этапа:

—первый этап—в пробирках, где контактируют смесь вируса с сывороткой при 37° 60 минут;

—второй этап—путем заражения полученной смесью куриных эмбрионов для учета нейтрализации вируса.

РН учитывают по результатам заражения куриных эмбрионов, в которых хорошо размножаются вирус болезни Ньюкасла и классической чумы птиц.

При помощи РН можно определить родство:

а) вируса к известной эталонной диагностической сыворотке;

Для типирования неизвестного вируса используют эталонную диагностическую антисыворотку, полученную на эталонный штамм и обладающую специфической нейтрализующей активностью (индекс не ниже 1000);

б) сыворотки к известному эталонному диагностическому антигену.

Для установления наличия специфических антител в крови вакцинированной или переболевшей птицы реакцию ставят с парными сыворотками (см. раздел РЗГА) и с известным диагностическим эталонным штаммом.

20. Техника постановки РН (схема 5) с вычислением индекса заключается в следующем: готовят 10-кратные разведения вируса (4,5 мл физиологического раствора и 0,5 мл вируса) в пределах его титра. После этого по 0,5 мл каждого разведения переносят в ряд пробирок (или несколько рядов, в зависимости от количества используемых на один вирус сывороток). Затем в каждую пробирку добавляют равный объем (0,5 мл) предварительно разведенной 1:10 диагностической (или же испытуемой) гипериммунной сыворотки. В контрольный ряд добавляют нормальную сыворотку.

Смесь вируса с сывороткой выдерживают при 37°С 60 минут и вводят в объеме 0,2 мл в аллантоисную полость 10-суточным куриным эмбрионам (4 куриных эмбриона на каждое разведение).

Зараженные куриные эмбрионы инкубируют при 37°С в течение 72 часов, после чего проводят учет нейтрализации. Для этого все зараженные эмбрионы овоскопируют, учитывают погибшие эмбрионы, а живые помещают при 4°С на 12—16 часов. После этого все эмбрионы вскрывают (живые и мертвые), берут из них аллантоисную жидкость и испытывают на гемагглютинирующую активность.

21. РН считается положительной, если испытуемый вирус не проявил биологической активности (не вызвал гибели эмбрионов и не обладал гемагглютинирующими свойствами) в смеси с эталонной диагностической сывороткой, но сохранил ее с нормальной сывороткой.

Для того, чтобы вычислить индекс нейтрализации (схема 6), устанавливают титр вируса с эталонной (или испытуемой) и нормальной сыворотками. После этого определяют разницу в титрах между нормальной и эталонной. Если она составляет два разведения и выше, то РН считается положительной.

22. В тех случаях, когда в предварительных опытах РЗГА дала сомнительные или отрицательные результаты, необходимо повторить реакцию с вирусом, полученным после РН из эмбрионов, зараженных смесью эталонной сыворотки с вирусом в наивысшем разведении, но еще обладающего гемагглютинирующей активностью.

23. Если гемагглютинирующая активность вируса, полученного после нейтрализации, не подавляется эталонной диагностической сывороткой к вирусу болезни Ньюкасла, то результаты выделения и идентификации возбудителя болезни Ньюкасла считают отрицательными.

24. Если гемагглютинирующая активность исследуемого вируса, полученного после нейтрализации,подавляется эталонной диагностической сывороткой к вирусу классической чумы птиц в титре 1/16 или ниже, или не подавляется совсем, необходимо провести идентификацию неизвестного штамма в РСК и по дополнительным тестам.

25. Для идентификации штаммов в РСК их необходимо направить в МВА или ВНИИВВиМ, уведомив об этом Главное управление ветеринарии.

IV. Дополнительный лабораторный тест для идентификации штаммов вируса классической чумы птиц с помощью диагностических препаратов.

26. К 0,5 мл гемагглютинирующей экстраэмбриональной жидкости добавляют 0,25 мл диагностического раствора А и 0,25 мл раствора Б (растворы А и Б—химические эталонные препараты, входящие в диагностические наборы, предназначенные для идентификации штаммов вируса гриппа птиц).

Смесь вируса с раствором А и Б выдерживают при 37°С 60 минут, после чего проводят титрование на гемагглютинирующую активность (раздел III).

27. Если после обработки вирус утратил гемагглютинирующую активность (или имеет в пределах 1:4—1:8), то его идентифицируют как возбудитель классической чумы птиц.

28. Все результаты исследований по идентификации возбудителя заносят в специальный рабочий журнал.

Ответственный за выпуск, зав. лабораторией ВНИИВВиМ. Кандидат биологических наук Г. САФОНОВ.

Схема 1

Выделение и типирование возбудителей болезни Ньюкасла и классической чумы птиц (гриппа птиц)

Исследуемый патологический материал — 10% суспензии селезенки (можно печени и мозга)

1. РГА с 1% эритроцитами кур

2. РЗГА с эталонными диагностическими сыворотками. Типирование закончено

3. Если п. 1 отрицателен, выделяют вирус на куриных эмбрионах в разведениях 1:10, 1:1000.

4. РГА с аллантоисной культурой вируса и 1% эритроцитами кур.

5. РЗГА с эталонными диагностическими сыворотками. Типирование закончено.

6. Если п. 5 не внес ясности, поставить РЗГА с аллантоисной культурой, обработанной идентифицирующими растворами А и Б. Типирование закончено.

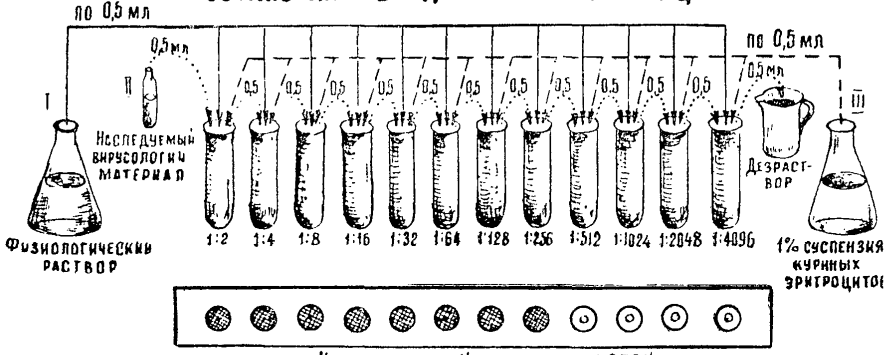
7. Если п. 6 не внес ясности, исключить двойную инфекцию постановкой РН с эталонными диагностическими сыворотками.

8. Постановка РЗГА (п. 6) с вирусом, полученным после РН. Типирование закончено.

9. Если вирус не выделен в разведении 1:1000. Постановка биопробы

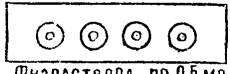
Схема 2

Постановка реакции гемагглютинации



Учет реакции / титр вируса 1:256 /

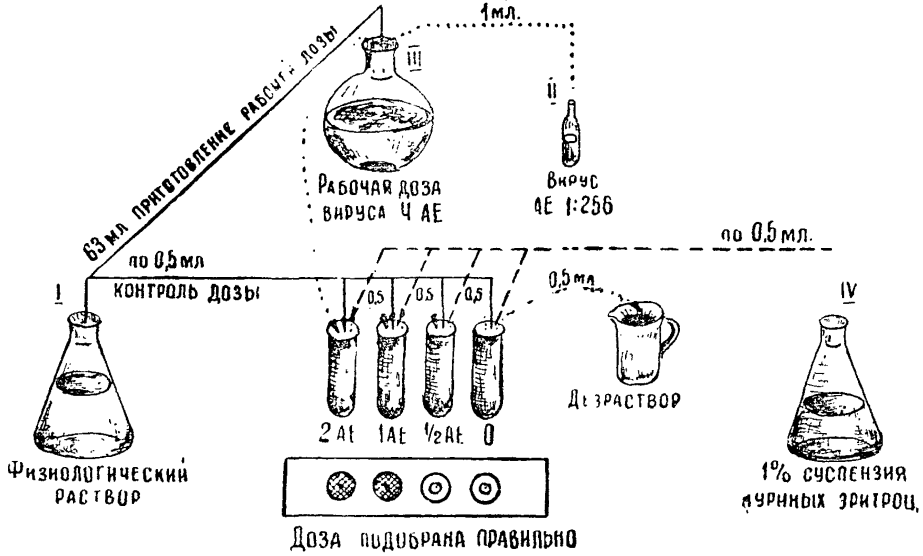
Контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию



Физраствора по 0,5 мл.
Эритроцитов по 0,5 мл.

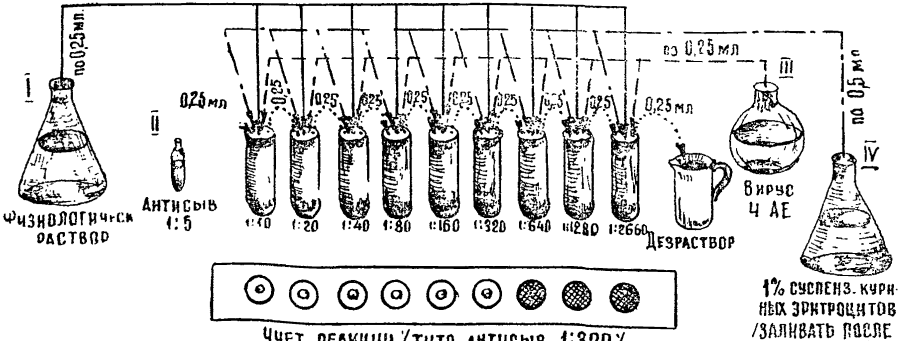
Схема 3

Приготовление рабочей дозы антигена



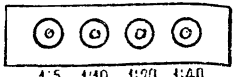
Постановка реакции задержки гемагглютинации

Схема 4



Учет реакции /титр антисыв 1:320/

Контроль антисыв на спонтанную агглютинацию



1:5 1:10 1:20 1:40

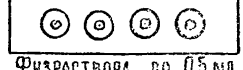
Физраствора по 0,25 мл
Антисыворотки по 0,25 мл
Эритроцитов по 0,5 мл

Контроль дозы



2АЕ 1АЕ 0,5АЕ 0

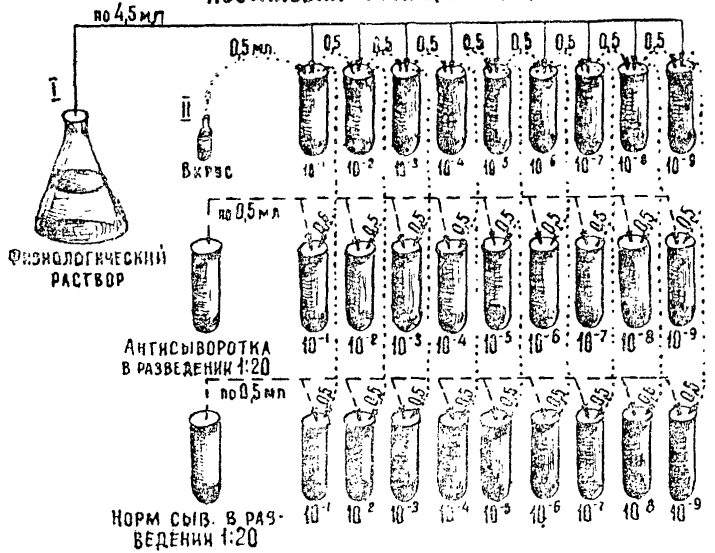
Контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию



Физраствора по 0,5 мл
Эритроцитов по 0,5 мл

Схема 6

Постановка реакции нейтрализации



Контакт 1 час при t = 37°с

Схема 6

Учет реакции нейтрализации

Сыворотки	Разведения вируса									Титр вируса в присутствии сыворотки (в ℓg)	Индекс нейтрализац. (в ℓg)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}		
Сыворотка иммунная	+	+	0	0	0	0	0	0	0	2,0	6,0
	+	+	0	0	0	0	0	0	0		
	+	0	0	0	0	0	0	0	0		
	+	0	0	0	0	0	0	0	0		
Сыворотка нормальная	+	+	+	+	+	+	+	+	0	8,0	
	+	+	+	+	+	+	+	+	0		
	+	+	+	+	+	+	+	0	0		
	+	+	+	+	+	+	+	0	0		

Индекс нейтрализации (в ℓg) $8,0 - 2,0 = 6,0$

\+ – эмбрионы погибшие

0 – эмбрионы живые

gost.e-ecolog.ru