Предмет: «Эпизоотология и инфекционные болезни животных с основами микробиологии и вирусологии»

Лабораторная работа № 5

Тема: Постановка серологических реакций: преципитации, агглютинации, РБП, СК, РИД.

Цель: Сформировать умения и навыки по постановке серологических реакций

Время выполнения: 4 часа

Место проведения: аудитории 426, 419, серологический отдел ветлаборатории.

Дидактическое и методическое обеспечение: Физраствор в колбах, пипетки пастеровские, кусочки кожи (от незаразного трупа) сибиреязвенная преципитирующая и нормальная сыворотки. Сибиреязвенный антиген стандартный, спиртовки, фарфоровые ступки с пестиками. Набор для постановки Роз-Бенгал пробы, набор диагностикумов, сывороток, антигенов.

Охрана труда на рабочем месте (отдельная инструкция)

Порядок и последовательность выполнения работы:

1. Внеурочная подготовка

1.1. Самостоятельно подготовиться к лабораторной работе.

Изучение теоретического материала по учебникам Эпизоотология с микробиологией: учеб./В.В.Максимович и др; -Минск: РИПО, 2017 стр.177-178

Эпизоотология и инфекционные болезни: учеб./В.В.Максимович и др; -Минск: РИПО, 2015 стр.17-18

1.2. Подготовьте рабочую тетрадь.

1.3. Изучите инструкцию по охране труда

2.Работа в лаборатории.

2.1.Пройдите входной контроль.

2.2.Подготовьте рабочее место и оборудование для работы.

2.3.Изучите методические указания и выполните задания:

Задание № 1. Изучите методику постановки реакции преципитации (РП).

Задание № 2. Изучите методику постановки реакции агглютинации с бруцеллёзным Роз-бенгал антигеном (РБП).

2.4. Оформите выполненную работу в тетрадь.

2.5. Пройдите выходной контроль.

2.6. Приведите в порядок рабочее место.

3. Вопросы входного контроля: Google-тест

4. Методические указания по выполнению работы:

Задание № 1. Изучите методику постановки реакции преципитации (РП).

Серологические реакции. Методы обнаружения антител в сыворотках крови животных или человека и методы выявления антигенов с помощью известных сывороток получили название серологических реакций, характеризующихся высокой чувствительностью и специфичностью. Эти реакции — реальное проявление взаимодействия между антигеном и антителом. В зависимости от характера проявления указанного взаимодействия антитела разделяют на коагулирующие (агглютинины, преципитины), лизирующие (бактериолизины, гемолизины), нейтрализующие (антитоксины, вируснейтрализующие антитела).

Обнаружение в сыворотке крови или других жидкостях организма специфических антител к определенному патогенному микробу говорит о развивающейся или перенесенной инфекции, а в ряде случаев — о наличии иммунитета. Серологические реакции широко используют в диагностике многих болезней животных. Особое значение имеет серологическая диагностика хронических и латентных инфекций, при которых выделение возбудителя затруднено.

Реакция преципитации (РП) основана на взаимодействии двух прозрачных жидкостей, одна из которых содержит антиген (преципитиноген), другая — антитело (преципитин). При наличии двух специфических компонент происходит их соединение и на границе жидкостей образуется преципитат в виде беловатого диска (кольца).

В ветеринарной практике реакцию преципитации ставят при исследовании материала на сибирскую язву (кожи, шерсть, паренхиматозные органы, последние особенно в стадии загнивания). Реакцию можно ставить горячим или холодным способами. Разница между ними состоит в приготовлении антигена. Все компоненты, входящие в реакцию, должны быть совершенно прозрачны. В связи с этим необходима фильтрация антигена и сыворотки.

Присланные на исследование пробы патологического материала перед постановкой реакции стерилизуют в автоклаве.

Приготовление компонентов. Для приготовления преципитиногена присланный кусочек кожи измельчают; 1 г измельченной кожи кипятят в 10 мл Физраствора (в пробирке) 30—40 мин в водяной бане (горячий способ) или растирают в ступке с песком, заливают 0,3%-ным карболизированным физраствором в ношении 1:10 и настаивают 16—18 ч при комнатной температуре (холодный способ). После этого экстракты фильтруют до полной прозрачности через асбестовую вату.

Преципитирующую сибиреязвенную сыворотку готовят на биофабриках. Непосредственно перед постановкой реакции ее следует профильтровать.

Постановка реакции. Реакцию преципитации ставят методом наслаивания или подслаивания. Для постановки реакции используют чисто вымытые, прозрачные сухие преципитационные пробирки (уллентутекские) размером: длина 5—7 см, диаметр 0,5—0,6 см.

Мерной пипеткой, а при массовых исследованиях — пипеткой Флоринского, наливают в пробирки по 0,2—0,3 мл преципитирующей сибиреязвенной сыворотки. После этого пастеровской пипеткой осторожно по стенке наслаивают на сыворотку испытуемый экстракт в таком же количестве, как и сыворотку. Затем пробирку

ставят в штатив. При использовании метода подслаивания в пробирку наливают 0,2—0,3 мл используемого экстракта, после этого пастеровской пипеткой осторожно (опустив ее на дно пробирки) подслаивают преципитирующую сыворотку в таком же количестве. Реакцию оценивают путем просмотра пробирок на темном фоне при проходящем свете. Реакция считается положительной, если в течение первых 15 мин с момента постановки реакции на границе соприкосновения жидкостей образуется серовато-белый диск (кольцо).

- Положительную реакцию (ясно выраженное кольцо) отмечают знаком +;
- сомнительную реакцию (нерезкое кольцо) отмечают знаком ±;
- отрицательную реакцию (отсутствие кольца) знаком - (минус).

Непосредственно перед постановкой реакции необходимо проверить ее компоненты.

Для этого ставят контроли:

1) сибиреязвенный антиген + преципитирующая сибиреязвенная сыворотка — реакция должна быть положительной;

2) сибиреязвенный антиген + нормальная сыворотка лошади — реакция должна быть отрицательной;

3) физраствор + преципитирующая сибиреязвенная сыворотка — реакция должна быть отрицательной.

В настоящее время применяют также реакцию преципитации в агаровом геле.

Задание № 2. Изучите методику постановки реакции агглютинации с бруцеллёзным Роз-бенгал антигеном (РБП).

Пластинчатую реакцию агглютинации с бруцеллезным роз бенгал антигеном применяют при исследовании сыворотки крови у крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, свиней, верблюдов, северных оленей. Ее преимущества перед классической реакцией агглютинации состоят в простоте и быстроте выполнения. Для постановки реакции пригодны прозрачные сыворотки, без эритроцитов.

Бруцеллезный антиген для пластинчатой РА — это взвесь в буферном растворе клеток Br. abortus штамма № 19, инактивированных нагреванием и фенолом и окрашенных бенгальской розовой в малиново-розовый цвет. При отсутствии этого антигена можно использовать для занятий обычный бруцеллезный антиген для РА и РСК (РДСК).

Ставят реакцию на чистых металлических эмалированных пластинках или израсцовых плитках с лунками при температуре 18—30° С. На бортиках пластинки против каждой лунки записывают номер испытуемой сыворотки. В начале работы ставят контроль антигена с негативной и позитивной агглютинирующими сыворотками в тех же дозах, а также контроль на спонтанную агглютинацию (к 0,03 мл антигена добавляют 0,03 мл физраствора).

Исследуемые сыворотки крови в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки при помощи специального шприца-полуавтомата или микропипетки. При исследовании сыворотки крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов и свиней в каждую лунку рядом с сывороткой вносят пипеткой 0,03 мл (две капли) антигена, а при исследовании сыворотки крови овец, коз и северных оленей — 0,015 мл (одну каплю). Затем антиген тщательно смешивают с каждой каплей сыворотки активными движениями до получения однородной смеси, распределяя ее при этом по всей поверхности лунок.

Пластину покачивают 4 мин, затем учитывают реакцию, слегка наклонив пластину. Агглютинацию, которая происходит позже, не учитывают.
Реакцию считают положительной при наличии выраженной агглютинации окрашенных бруцелл антигена в виде хлопьев розового цвета на белом фоне лунки. Если смесь остается гомогенной (агглютинация отсутствует) — реакцию считают отрицательной.
Все сыворотки, с которыми получена положительная РБП в тот же или на другой день исследуют в РА и РСК (РДСК). Оценку «сомнительная» дают только при положительной РБП и отрицательных РА и РСК - Во всех остальных случаях результаты оценивают как положительные.
Сыворотки крови, с которыми в РБП получен отрицательный результат дополнительно путем РА и РСК не исследуют. Животных, давших сомнительную реакцию повторно исследуют РБП, РА и РСК (РДСК) через 15—30 дней. В случае положительного или сомнительного результата при повторном исследовании сывороток диагностическая оценка считается положительной.

5. Вопросы выходного контроля:

5.1. Что такое серологические реакции и их значение в диагностике скрытых инфекций.
5.2. В чём сходство и в чём различие искусственного активного и пассивного иммунитета.
5.3. Какие контроли ставят непосредственно перед постановкой реакции преципитации.
5.4. Методика постановки реакции преципитации (РП).
5.5. Методика постановки реакции агглютинации с бруцеллёзным Роз-бенгал антигеном (РБП)

Литература:

1. Учебник Эпизоотология с микробиологией: учеб./В.В.Максимович и др; -Минск: РИПО, 2017 стр.177-178.
2. Эпизоотология и инфекционные болезни: учеб./В.В.Максимович и др; -Минск: РИПО, 2015 стр.17-18.
3. Электронный образовательный ресурс: Эпизоотология goreglad.blogspot.com