

**Інструкційно - технологічна картка
для проведення лабораторного заняття № 6
з навчальної дисципліни: "Епізоотологія з мікробіологією".**

Тема заняття. Постановка серологічних реакцій.

Місце проведення: лабораторія епізоотології з мікробіологією.

Тривалість заняття: 90 хв.

Мета проведення заняття.

Набути практичних навичок по постановці серологічних реакцій – реакції аглютинації, преципітації та імунодифузії.

Матеріальне оснащення робочого місця.

Шматочки шкіри, фізрозчин, мірні піпетки по 1мл, пастерівські піпетки, преципітуюча сироватка, сироватка нормальна, азбестова вата, бактеріологічні пробірки, спиртівки, штатив.

Правила охорони праці.

Під час проведення лабораторного заняття необхідно пам'ятати:

1. Виконувати роботу, передбачену завданнями.
2. Працювати в сандязі та дотримуватись правил особистої гігієни.
3. З інструментами та скляним посудом працювати обережно, щоб запобігти травмуванню.
4. Екстракти, сироватки – не пробувати на смак, при попаданні на шкіру змити проточною водою.
5. Хімічний посуд тримати над вогнем за допомогою тримача, отвори пробірок не направляти на себе або на сусідів.
6. По закінченню роботи ретельно вимити руки з милом і прибрати робоче місце.

Методичні вказівки щодо виконання і оформлення.

Здобувачі освіти ознайомлюються з теоретичними основами РП, РА, РІД, РПБ, засвоюють методику і техніку постановок реакцій, їх облік, з'ясовують при діагностиці яких інфекційних захворювань вони застосовуються. Техніку постановки і оцінку реакції записують у зошит та роблять відповідні малюнки.

Зміст і послідовність виконання завдання:

1. Ознайомитись з технікою проведення РП (реакції преципітації), провести облік реакції.
2. Ознайомитись з технікою проведення РА (реакції аглютинації), провести облік реакції.
3. Ознайомитися з постановкою РІД (реакції імунодифузії).
4. Ознайомитися з постановкою РБП (розбенгалпробою).

Після виконання завдання студент повинен:

Знати	Вміти
1. Техніку постановки РП та її облік. 2. Техніку постановки РА та її облік. 3. Схему постановки РІД та РБП.	1. Приготувати екстракт шкіряної сировини. 2. Поставити РП і провести її облік. 3. Поставити РА і провести її облік. 4. Поставити РІД та РБП.

Захист практичних завдань. Перевірка робочих зошитів.

1. З якою метою проводять постановку серологічних реакцій?
 1. Для чого проводять РП і РА?
 2. Які компоненти треба взяти для проведення реакції преципітації?
 3. Які компоненти треба взяти для проведення реакції аглютинації?
 4. Для чого фільтрують проби?
 5. Як проводять облік реакції преципітації?
 6. Як оцінюють реакцію аглютинації?
 7. Охарактеризуйте методику постановки РІД.
 8. Охарактеризуйте методику постановки РПБ.

Домашнє завдання:

1. Постой В.П. Епізоотологія з мікробіологією. - К.: Вища освіта, 2006. С. 92 - 96.
2. Горбань М.І. Епізоотологія з мікробіологією. – К.: Вища школа. С. 29 – 39.
3. Литвин В.П., Євтушенко А.Ф., Радіонов М.Т. та ін.: За ред. Литвина В.П. Практикум із загальної епізоотології. – К.: НАУ, 2003. С. 26 – 27.
4. Ярчук Б.М., Паска М.М., Корнієнко Л.Є. та ін.: За ред. Ярчука Б.М. Практикум із загальної епізоотології. – Біла Церква.: БДАУ. С.52 – 55.

Хід виконання:

1. Ознайомитись з технікою проведення РП (реакції преципітації), провести облік реакції.

Реакція преципітації основана на взаємодії 2 прозорих рідин, одна з яких має антиген (преципімоген), а друга антитіло (преципітин). При наявності 2-х специфічних компонентів проходить їх сполучення і на межі рідин утворюється преципітат у вигляді білуватого диску (кільця).

Реакцію преципітації застосовують при дослідженні на сибірку (шкіряної та хутряної сировини не забійного походження) та патологічного матеріалу (печінки, селезінки та інших органів і тканин трупів, що розклалися).

Для того, щоб поставити дану реакцію треба:

- 1) приготувати екстракти проб шкіряної сировини;
- 2) профільтрувати приготовлений екстракт і преципітуючу сироватку;
- 3) поставити РП методом нашарування або підшарування.

Реакцію преципітації можна ставити гарячим або холодним способом. Різниця між ними буде у приготуванні антигену. Всі компоненти, які входять в реакцію повинні бути прозорими. Проби патологічного матеріалу, прислані на дослідження стерилізують в автоклаві (при тиску пари 1,5 атм. 30 хв.)

Приготування компоненту.

1. Для приготування антигену пробу шкури подрібнюють ручним або автоматичним способом; 1 г подрібненої проби заливають 10 мл фізрозчину і кип'ятять в пробірці 30 – 40 хв (гарячий спосіб) або ж проби заливають екстрагуючою рідиною (у скляних баночках місткістю 50 мл) при температурі 9 – 15 °С, екстрагують 16-20 годин (холодний спосіб);
2. Екстракти проб фільтрують за допомогою скляних лійок діаметром 39 мм крізь суху азбестову вату (набивати вату у лійки треба так, щоб дістати прозорі екстракти проб шкіряної сировини протягом 1-2 год.

Постановка реакції.

Для постановки реакції застосовують чисто вимиті, прозорі, сухі преципітуючі пробірки (Уленгутівські) розміром: довжина 5 – 7 см, діаметр 0,5 – 0,6 см, а також: прозору преципітуючу сибіркову сироватку. Мірною піпеткою в уленгутівські пробірки вносять по 0,25 - 0,3 мл преципітуючої сибіркової сироватки. На сироватку обережно, по стінці пробірки, нашаровують у тій же кількості прозорий екстракт проб шкур, ставлять у штатив. При використанні методу підшарування в пробірку наливають 0,2 - 0,3 мл. екстракту, а тільки тоді пастерівською піпеткою обережно, опустивши її на дно пробірки. Підшаровують преципітуючу сироватку в тій же кількості. При з'єднанні компонентів треба стежити, щоб сироватка і екстракт не змішувались і щоб межа між ними була різко виражена.

Для того, щоб перевірити компоненти, ставлять контрольні проби:

1. Сибірковий антиген + преципітуюча сироватка – реакція позитивна ;
2. Сибірковий антиген + нормальна сироватка тварин – реакція негативна;
3. Фізрозчин + преципітуюча сибіркова сироватка – реакція негативна.

Облік реакції – проводять макроскопічну, розглядаючи вміст пробірки на фоні чорного паперу при денному світлі біля вікна.

Реакція позитивна – якщо на протязі 15 хв. з моменту постановки реакції на межі стикання преципітуючої сироватки з екстрактом досліджуваних проб утвориться яскраво виражений диск сировато - білого кольору.

Сумнівна - диск слабо виражений, помутніння у вигляді хмарки. Реакцію позначають так: позитивна (+), сумнівна (\pm), негативна (-).

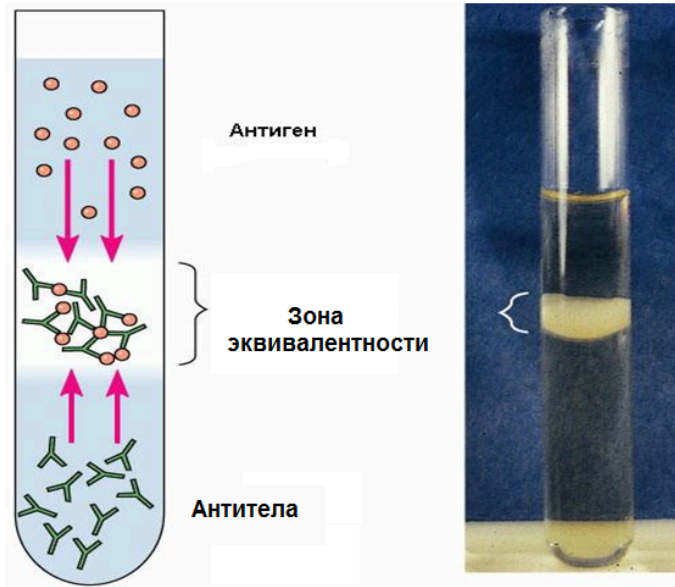


Рис. 1. Схема постановки реакції преципітації.

2. Ознайомитись з технікою проведення РА (реакції аглютинації), провести облік реакції.

Реакція аглютинації - основана на взаємодії бактеріальних клітин (аглютиногенів) та антитіл (аглютинінів).

Розрізняють дві фази реакції:

- 1) невидима - при якій відбувається склеювання бактеріальних клітин під дією антитіл;
- 2) видима - випадання бактерій, що склеїлися в осад під дією електролітів (кухонна сіль).

РА застосовують для діагностики бруцельозу с.г. тварин. Найбільш поширений є класичний або пробірковий метод.

Щоб поставити реакцію користуються свіжими негемолізованими сироватками крові, які не мають гнильного запаху, плісені і значної коагуляції білку.

Реакцію аглютинації на бруцельоз ставлять у (титрах) чотирьох розведеннях: у свиней, овець, кіз, оленів і собак - 1:25, 1:50, 1:100, 1: 200 МО (міжнародних одиниць); у великої рогатої худоби, коней і верблюдів -1:50, 1:100, 1: 200. 1:400 МО.

Реакція аглютинації ставиться в об'ємі 1 мл кожного розведення сироватки.

Щоб мати необхідні розведення досліджуваних сироваток, користуються методом основного і послідовного розведення або розливу сироваток.

Для розведення кожної досліджуваної сироватки в штатив ставлять 4 пробірки. Реакцію ставлять в об'ємі 1 мл. Розливають сироватки різними способами.

Облік реакції.

Після додавання до досліджуваних і контрольних сироваток антигену пробірки ретельно струшують і ставлять у термостат при температурі 37 - 38° С на 16-20 годин, а потім витримують при кімнатній температурі одну годину. Якщо термостата нема, дозволяється витримувати пробірки при кімнатній температурі протягом двох діб, після чого обліковують реакцію, при чому спочатку в контролі, а потім уже (при правильному контролі) - реакцію в пробірках з досліджуваними сироватками. Оцінюють реакцію аглютинації в хрестах.

++++ (4 хрести) - повне просвітлення рідини, мікробні тіла осіли на дно пробірки у вигляді перевернутої парасольки, яка при струшуванні розбивається на пластівці та грудочки -100% аглютинація.

+++ (3 хрести) - те ж саме явище, що при чотирихресній реакції, але рідина має неповне просвітлення (легка опалесценція рідини) - 75% аглютинація.

++ (2 хреста) - просвітлення рідини і перевернута парасолька виражені слабо – 50% аглютинація.

+ (1 хрест) - відсутність або незначне просвітлення рідини, відсутня або слабо виражена перевернута парасолька, при струшуванні рідини помітна невелика кількість пластівців і грудочок.

- (знак мінус) - відсутність просвітлення рідини і пристінного осаду у вигляді перевернутої парасольки на дні пробірки. Бруцели можуть осідати на дно пробірки, але при струшуванні осад легко розбивається в рівномірну суспензію і рідина стає мутною.

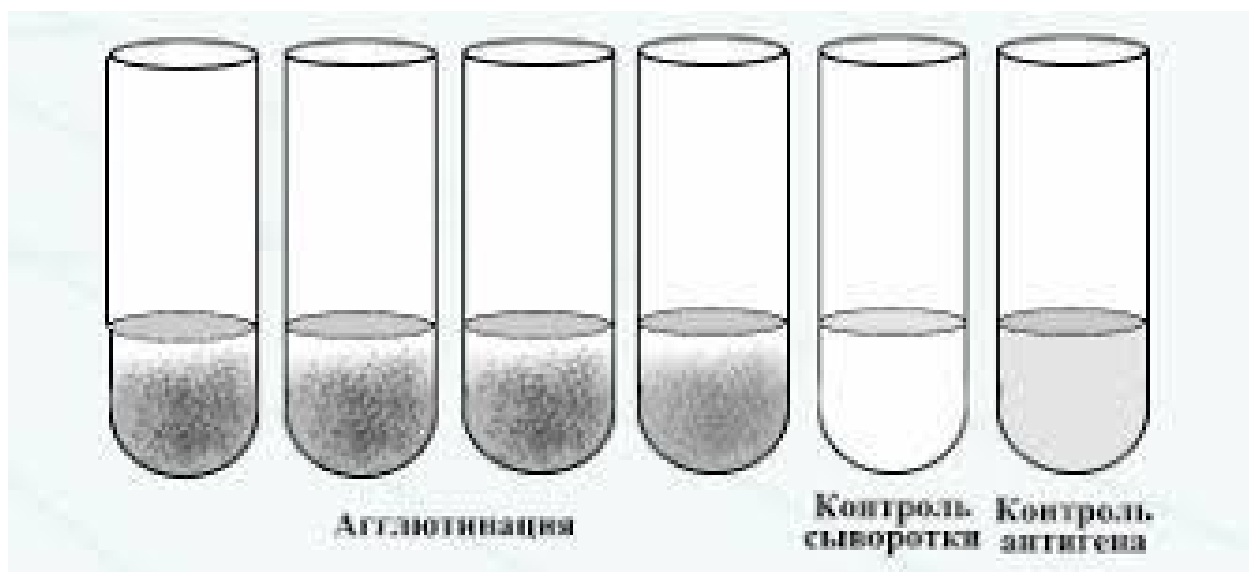


Рис. 2. Схема реакції аглютинації.

3. Ознайомитися з постановкою РІД (реакції імунної дифузії).

Реакція імунної дифузії (РІД) – серологічний метод діагностики ЛВРХ, що базується на виявленні в сироватці крові тварин антитіл до одного із двох структурних білків ВЛВРХ. Специфічні антитіла виявляються в РІД вже через 3–16 тижнів після інфікування тварин ВЛВРХ, тобто значно раніше ніж гематологічні зміни, і зберігаються пожиттєво. РІД-позитивних тварин вважають інфікованими ВЛВРХ.

РІД – достатньо специфічний, відносно дешевий та простий у виконанні діагностичний метод, що рекомендований Міжнародним Епізоотичним Бюро (МЕБ) як рутинний тест з виявлення антитіл до ВЛВРХ. Результати досліджень проб сироваток крові в РІД приймаються до уваги країнами – членами Світової організації торгівлі при здійсненні експортно - імпорتنих операцій, а також при проведенні аналізу ризику. В багатьох країнах світу РІД є базисним методом досліджень в державних програмах по боротьбі з лейкозом великої рогатої худоби.

Серологічно на лейкоз досліджують сироватку крові від тварин у віці 6 міс. та старше. Для постановки РІД використовують діагностичний набір в склад якого входять:

- 1/ специфічний антиген вірусу лейкозу ВРХ.
- 2/ специфічна позитивна сироватка крові до вірусу лейкозу.
- 3/ негативна сироватка крові ВРХ.

До кожного набору прикладається відповідна інструкція по його застосуванню.

4. Ознайомитися з постановкою РБП (розбенгалпробою).

Ця реакція проводиться при дослідженні на бруцельоз.

Реакцію проводять на сухих металевих емальованих пластинках. У лунку пластинки вносять 0,03 мл досліджуваної сироватки, до неї додають 2-і краплі антигену. Реакцію аглютинації обліковують протягом 4-х хвилин після змішування сироватки з антигеном. Антиген для РБП - це суспензія інактивованих нагріванням і дією фенолу бруцел у буферному розчині, які зафарбовані бенгальським рожевим. Реакцію рахують позитивною за наявності вираженої аглютинації зафарбованих бруцел у вигляді дрібних і великих пластівців рожевого кольору, які чітко виділяються на білому фоні лунки.