

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

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

Москва — 1968 г.

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. Рекомендательный 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.

1. 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 антигена, 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 рН 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 рН 9,0
5. Фосфатные буферные растворы рН 6,0 и 7,0
6. 25% взвесь каолина на боратном буфере рН 9,0
7. Раствор Альзера.

Для приготовления всех ингредиентов реакции необходимо применять только химически чистые реактивы. Измерение рН должно проводиться с помощью рН-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°C (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°C , 8,5% раствор сахарозы хранят при 4°C . 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 бутылка 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 боратым буфером рН 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 боратым буфером рН 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°C. 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 рН. Фосфатные буферы со значениями рН от 6,1 до 6,9 получают путем смешивания в разных пропорциях фосфатно-буферных растворов с рН 6,0 и 7,0 (см. табл. 1).

Таблица 1

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

		рН										
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												
рН 6,0	10,0	9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	—	
рН 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 рН 9,0 для разведения антигенов и сывороток.

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

Буферные растворы готовят из химически чистых реактивов:

поваренной 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 рН 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 рН 6,0 и 7,0 при соединении которых в различных соотношениях, можно получить растворы с заданными показателями рН.

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

	рН 6,0	рН 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 рН 6,0 и 7,0 этих растворов, как и растворов промежуточных рН являются условными, т. к. достигают указанных значений рН только при соединении с равным объемом боратного буфера рН 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 рН 9,0 добавляют при постоянном помешивании 25 г каолина. Полученную массу фильтруют через марлевый фильтр. Эта взвесь может храниться неопределенно долго при 4°C.

Состав раствора Альзовера:

Декстроза безводная (или глюкоза) — 10,25 г
Лимоннокислый натрий ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) — 4,0 г
Лимонная кислота ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) — 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°C.

5. Титрование антигенов в РГА

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

Гемагглютинины арбовирусов сохраняются в щелочной среде, поэтому все разведения антигена делают на боратном буферном растворе рН 9,0. Феномен гемагглютинации является при определенных для каждого вируса показателях рН, 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 коэффициентом 2. Для этого в ряд лунок на пластинах из органического стекла разливают боратный буфер рН 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 рН. 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 0,4 мл. 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

рН	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 рН 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 рН 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. Вторым этапом — 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 иммунной структуры 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 рН 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 рН	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Контрольное титрование ставят только при оптимальном значении рН. 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 рН 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°C на 18—20 часов. На следующий день добавляют по 0,4 мл свежеприготовленной взвеси эритроцитов на фосфатном буфере оптимального рН. После встряхивания пластины ставят в термостат при 37°C. 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 двукратные разведения, перенося отдельными пипетками по 0,4 мл. Для полного соответствия условий, имитирующих основной опыт, антиген соединяют с боратым 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 рН 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 рН 9,0; доводят рН до 9,0 2 М раствором NaOH, контролируя рН-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.

№ 76338 от 26/IX-68 г.

Объем 1 н. л.

Зак. 2109

Тир. 500

Типография Министерства здравоохранения СССР