

КОПИЯ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Руководителя

Россельхознадзора



Е.А. Непоклонов

21 ноября 2006 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора диагностического для постановки реакции связывания комплемента (РСК) при листериозе

(организация-производитель:- Государственное научное учреждение ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров, Владимирская обл.)

### I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор диагностический для постановки реакции связывания комплемента (РСК) при листериозе.

2. Набор предназначен для обнаружения комплементсвязывающих антител в сыворотках крови животных, подозреваемых в заражении листериозом.

3. В состав набора входят:

- антиген листерий цитоплазмальный инактивированный сухой – 10 ампул по 1 см<sup>3</sup>.

- сыворотка листериозная позитивная - 2 флакона по 20 см<sup>3</sup> сыворотки в рабочем разведении.

4. По внешнему виду антиген представляет собой сухую пористую массу желтовато-белого цвета, сыворотка - прозрачная жидкость соломенно-желтого цвета.

5. Компоненты набора выпускают:

- антиген листерий цитоплазмальный инактивированный сухой - по 1,0 см<sup>3</sup> в стеклянных ампулах вместимостью 3,0 или 5,0 см<sup>3</sup>, герметически

- сыворотку листериозную позитивную - по 20,0 см<sup>3</sup> во флаконах вместимостью 20,0 см<sup>3</sup>, закупоренных резиновыми пробками и обкатанных алюминиевыми колпачками.

6. На каждую ампулу и флакон с компонентами наклеивают этикетку с указанием: наименования препарата, объема препарата в см<sup>3</sup>, количества доз в ампуле, рабочего разведения, номера серии, даты изготовления (месяц, год).

7. На каждую коробку набора наклеивают этикетку или типографским способом наносят информацию с указанием: наименования организации-производителя (и) или её товарного знака, адреса, названия набора, перечня компонентов, входящих в набор, количества ампул и флаконов каждого компонента в наборе, номера серии, номера контроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения и обозначения настоящего СТО. В коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

8. Набор, без этикеток, с нарушением целостности ампул, изменением цвета или с истекшим сроком годности утилизируют кипячением в течение 30 мин.

9. Набор хранят на предприятии-изготовителе, у потребителя и транспортируют всеми видами транспорта при температуре от 2 °С до 8 °С в сухом темном месте. Замораживание препаратов набора не допускается.

10. Срок годности составляет 24 месяца со дня изготовления. Набор по истечении срока годности не применяют.

## II. ПРИНЦИП МЕТОДА

11. Метод основан на выявлении свободного компонента в реакционной смеси. Если антиген связывается специфическим антителом, то компонент адсорбируется этим комплексом и наблюдается задержка

гемолиза. В случае несоответствия антигена и антител, комплемент остается в свободном состоянии и вовлекается в реакцию между гемолитической сывороткой и чувствительными эритроцитами, следствием чего является гемолиз различной интенсивности вплоть до полного лизиса эритроцитов. Степень гемолиза оценивают в крестах: 0 – полный гемолиз (осадок отсутствует); + - частичный гемолиз (лизис 75% эритроцитов), ++ - частичный гемолиз (лизис 50% эритроцитов); +++ - частичный гемолиз (лизис 25% эритроцитов); ++++ - отсутствие гемолиза (осадок эритроцитов).

12. Каждая упаковка набора рассчитана на исследование 800 проб сывороток крови.

### III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

#### 13. Подготовка биологического материала

Исследуют сыворотки крови животных, подозреваемых в заражении листериозом. Если РСК проводят в течение 24 ч после отбора проб, образцы сывороток хранят при температуре 4 °С. При более длительном хранении образцы замораживают при минус 20 °С. Перед исследованием замороженные образцы быстро (в течение 5-10 мин) размораживают на водяной бане при температуре 37 °С. В случае выпадения осадка пробы обязательно осветляют центрифугированием 10 мин при 2000g. Затем испытуемые и контрольные сыворотки крови в течение 30 мин инактивируют при (60±1) °С - сыворотки кроликов, при (58±1) °С - сыворотки лошадей и овец, при (56±1) °С - сыворотки КРС и свиней.

#### 14. Подготовка компонентов реакции

Все компоненты реакции готовят в необходимом количестве.

14.1. 0,85%-ный физиологический раствор химически чистой поваренной соли выдерживают не менее 30 мин при температуре 37 °С.

14.2. Готовят рабочее разведение антигена листериозного цитоплазменного сухого - ампулу с антигеном растворяют в  $20 \text{ см}^3$  физиологического раствора.

14.3. Сыворотку листериозную позитивную, готовую к применению, предварительно инактивируют.

14.4. Отрицательную и испытуемые сыворотки крови животных (того же вида животных), после предварительной инактивации разводят 1:10 физиологическим раствором.

14.5. Гемолитическую сыворотку (гемолизин) - разводят физиологическим раствором до рабочего разведения указанного на этикетке.

14.6. Комплемент сухой для РСК, разводят физиологическим раствором в рабочем разведении, который устанавливают в день постановки реакции путем титрования в бактериолитической и гемолитической системах по стандартной методике.

14.7. Готовят гемолитическую систему - к равному объему 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана на физиологическом растворе приливают равный объем гемолитической сыворотки в рабочем разведении и ставят в водяную баню при  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  на 30 мин.

## 15. Постановка реакции связывания комплемента

### 15.1. Основные условия постановки реакции.

Реакцию ставят на физиологическом растворе, общий объем -  $1,0 \text{ см}^3$  всех компонентов. Испытуемые сыворотки исследуют в разведении 1:10 с антигеном и без антигена (вместо антигена используют физиологический раствор) в объеме  $0,2 \text{ см}^3$ . В пробирки с исследуемыми и контрольными сыворотками вносят антиген в рабочем разведении или физиологический раствор в объеме  $0,2 \text{ см}^3$ . Затем вносят комплемент в объеме  $0,2 \text{ см}^3$  и ставят пробирки на водяную баню, время связывания комплемента в бактериолитической системе 20 минут - при  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , после чего в пробирки вносят гемолитическую систему в объеме  $0,4 \text{ см}^3$  и переносят пробирки вновь на водяную баню на 20 минут - при  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ .

### 15.2. Основные контроли главного опыта:

- реакция с заведомо отрицательной и двумя положительными листериозными сыворотками в разведении 1:10 (с антигеном и без антигена).
- контроль антикомплиментарности и гемотоксичности антигена – без комплемента и с комплементом.
- контроль гемолитической системы с комплементом и без комплемента.
- контроль комплемента в двойной дозе с эритроцитами без гемолитической сыворотки.

15.3. Результаты реакции оценивают визуально два раза по степени задержки гемолиза эритроцитов в крестах по следующей схеме:

- первый раз - после извлечения штатива из водяной бани;
- второй раз - через 14-18 часов выдерживания проб при комнатной температуре.

Реакцию считают: положительной - при задержке гемолиза эритроцитов на 3-4 креста; сомнительной - при задержке гемолиза эритроцитов на 2 креста; отрицательной - при задержке гемолиза на один крест или полном гемолизе эритроцитов.

15.4. Сыворотки, давшие сомнительную реакцию, подлежат повторному исследованию. Для повторного исследования пробы сывороток берут через 2-3 недели после первого исследования. При повторном получении сомнительной реакции результат исследования считают отрицательным.

## IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

16. При работе с компонентами набора следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с ветеринарными препаратами.

17. Все работы необходимо проводить в соответствующей спецодежде с

18. На рабочем месте запрещается принимать пищу, пить и курить. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

19. Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии. Юридический и почтовый адрес - 601120, Владимирская область, г. Покров.

Рекомендовано к регистрации и применению ФГУ «ВГНКИ». ПВР- 1-3.6/01715

