

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора препаратов для диагностики блютанга реакцией длительного связывания компонента (РДСК)

(Утверждена заместителем руководителя Россельхознадзора от 3 марта 2009г.)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор препаратов для диагностики блютанга реакцией длительного связывания компонента (РДСК).
2. Набор предназначен для выявления антител к вирусу блютанга в сыворотках крови восприимчивых животных в реакции длительного связывания компонента (РДСК).
3. В состав набора входят:
 - контрольный (положительный) антиген (КАг⁺) – 2 ампулы;
 - контрольный (отрицательный) антиген (КАг⁻) – 2 ампулы;
 - контрольная (положительная) сыворотка (КС⁺) – 2 ампулы;
 - контрольная (отрицательная) сыворотка (КС⁻) – 2 ампулы.
4. По внешнему виду компоненты представляют собой сухую пористую массу, антигены – белого или желтоватого цвета, сыворотки – светло-коричневого.
5. Компоненты набора выпускают в стеклянных ампулах соответствующей вместимости, герметически запаянных под вакуумом. В одной ампуле содержится по 0,5 или 1,0 см³ сухого препарата.
6. На каждую ампулу должна быть наклеена этикетка с указанием краткого наименования препарата, объема, рабочего разведения, номера серии, срока годности и условий хранения.
7. На каждую коробку набора должна быть наклеена этикетка с указанием наименования организации-производителя и/или её товарного знака, адреса, наименования набора, номера государственной регистрации, перечня и количества препаратов входящих в состав набора, номера серии и контроля, даты изготовления (месяц, год), срока годности, условий хранения, обозначения СГО и надписи «Для животных». В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.
8. Ампулы с препаратами набора укладывают в коробки картонные с наличием гнезд или перегородок, обеспечивающих их неподвижность и целостность.
9. Набор хранят в сухом темном месте при температуре не выше 8°С. Допускается хранение набора при минусовой температуре (ниже минус 20°С). Транспортируют набор любыми видами транспорта с соблюдением тех же температурных режимов. Срок годности набора – 12 месяцев со дня изготовления. По истечению срока годности набор не должен применяться.
10. Препараты набора без маркировки, с нарушением целостности ампул, изменением цвета, консистенции или с истекшим сроком годности утилизируют кипячением в течение 30 мин.

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, компонент остается в свободном состоянии и вовлекается в реакцию между гемолитической сывороткой и сенсibilизированными эритроцитами, следствием чего является гемолиз различной интенсивности вплоть до полного лизиса эритроцитов. Таким образом, положительный результат реакции характеризуется задержкой гемолиза, а отрицательный – полным гемолизом. 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).

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

12. Подготовка проб сывороток крови.

Для выявления антител исследуют сыворотки крови животных, подозреваемых в заражении вирусом блютанга. Для получения сыворотки пробы крови выдерживают 1 ч в термостате при (37±0,5)°С до образования сгустка. После чего сгусток обводят спицей пробирки с пробями, помещают в камеру бытового холодильника на 10-14 ч. Сыворотку отделяют, при необходимости осветляют центрифугированием и используют для исследования. Оптимальный объем сыворотки для последования – 1,5-2,0 см³. Оптимальная тара для транспортировки – пластиковые пробирки с крышками объемом 2,0 см³.

12.1. Если РДСК проводят в течение 24 ч после отбора проб, образцы сывороток хранят при температуре (4±2)°С. При более длительном хранении образцы замораживают при минус (20±5)°С. Перед исследованием замороженные образцы быстро (в течение 5-10 мин) размораживают на водяной бане при температуре (37±0,5)°С. В случае выпадения осадка пробы обязательно осветляют центрифугированием 10 мин при 2000 об/мин.

12.2. Для транспортировки пробирки укладывают в полиэтиленовый пакет и помещают в термос со льдом. Термос снаружи обрабатывают 5%-ным раствором едкого натра или осветленным 20%-ным раствором хлорной извести, помещают в металлический контейнер, опечатывают и доставляют прочным в лабораторию с сопроводительным документом.

13. Контрольные сыворотки разводят физиологическим раствором (ФР), pH 7,2-7,4, до объема, указанного на этикетке. Исследуемые сыворотки с признаками контаминации посторонней микрофлорой и гемолизованные сыворотки для исследования непригодны.

14. Подготовка оборудования и материалов для проведения исследований

В качестве дополнительного оборудования и материалов необходимы автоматические пипетки одно- и многоканальные на 0,05-0,25 см³ с накопчиками, планшеты полистироловые плоскостные, холодильник бытовой, центрифуга лабораторная настольная любого типа, водяная баня с температурой нагрева (37±0,5)°С и (58±2)°С, термостат с температурой нагрева (37±0,5)°С, пипетки градуированные вместимостью 2,0; 5,0; 10,0 см³, пробирки Флоринского, хлорид натрия, вода дистиллированная. Также необходимы гемолизин и компонент биофабричного производства.

15. Подготовка компонентов реакции

15.1. Готовят разведения сывороток на ФР. Испытуемые сыворотки крови животных разводят 1:10 (0,1 см³ сыворотки + 0,9 см³ ФР), контрольные (КС⁺ и КС⁻) – до рабочего разведения, указанного на этикетке. Затем испытуемые и контрольные сыворотки крови в течение 30 мин инaktivируют на водяной бане при (58±2)°С.

15.2. Контрольные антигены (КАг⁺ и КАг⁻) разводят ФР до рабочего разведения, указанного на этикетке.

15.3. Гемолитическую сыворотку (гемолизин) разводят ФР и используют в четырехкратном титре. Так, при титре гемолизина 1:3000, его рабочее разведение 1:750. Не рекомендуется использовать гемолизин с титром ниже, чем 1:2000.

15.4. Компонент сухой для РДСК разводят ФР в рабочем разведении, которое устанавливают в день постановки реакции путем титрования по схеме Смородинцева, описанной ниже.

Титрование компонента проводят перед каждой постановкой реакции.

Готовят вспомогательный ряд разведений компонента с коэффициентом 1,2. Для этого берут 14 пробирок. В первую наливают 5,4 см³, а в остальные по 1,0 см³ ФР. Вносят в первую пробирку 0,6 см³ неразведенного компонента и тщательно перемешивают. Таким образом, в первой пробирке получают разведение компонента 1:10. Из первой пробирки переносят 5,0 см³ во вторую, из второй 5,0 см³ в третью и т.д., получая ряд возрастающих разведений компонента от 1:10 до 1:61,9.

Схема разведения и титрования компонента

Схема 1

Компоненты (в см ³)	Номера пробирок														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Физраствор	5,4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
Компонент	0,6	Последовательно переносят во все пробирки по 5,0 см ³													
Полученное разведение	1:10	1:12	1:14,4	1:17,3	1:20,7	1:24,9	1:29,9	1:35,8	1:43,0	1:51,5	1:61,9	1:74,3	89,2	107,0	
Компонент в разведениях	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
ФР	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
Гемолитическая система	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
Водяная баня при (37,0±0,5) в течение 15-20 мин															
Результат титрования	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++	

Обозначения: 0 – полный гемолиз; ++, + – частичный гемолиз; ++++ – отсутствие гемолиза. Титр компонента в данном случае – 1:42,9, что соответствует одной гемолитической единице.

Для определения титра компонента, каждое разведение его переносят по 0,1 см³ в соответствующую пробирку основного ряда, добавляют в каждую по 0,2 см³ ФР и 0,2 см³ гемолитической системы. Пробирки встряхивают и помещают на 15-20 мин в водяную баню при температуре (37,0±0,5)°С, после чего проводят учет результатов (Схема 1).

Титром компонента в гемолитической системе считают предельное его разведение, в котором наблюдают полный гемолиз. В данном примере это разведение 1:42,9 (пробирка №9). В главный опыт берут 2 единицы компонента (согласно схеме Смородинцева), т.е. разведение, соответствующее 4-ой пробирке влево от последней пробирки с полным гемолизом – пробирка №5 – разведение 1:20,7 (1,0 см³ компонента + 19,7 см³ ФР).

15.5. Гемолитическая система – к равному объему 2%-ной взвеси эритроцитов барана на ФР приливают равный объем гемолитической сыворотки в рабочем разведении и

первую пробирку добавляют 0,1 см³ КАг⁺ в рабочем разведении, в каждую вторую - 0,1 см³ КАг⁺ в рабочем разведении, в третью - 0,1 см³ ФР (контроль на антикомплементарность) и в четвертую - 0,2 см³ ФР (контроль на гемотоксичность). Во все пробирки, кроме четвертых, вносят по 0,1 см³ компонента в рабочем разведении и реакцию помещают на холод при температуре (4±2) °С на 18-20 ч. Затем пробирки выдерживают в течение 15-20 мин при комнатной температуре и в каждую вносят по 0,2 см³ гемолитической системы. Пробирки встряхивают и помещают в водяную баню при (37±0,5) °С на 25±5 мин.

Одновременно с главным опытом ставят следующие контроли: контрольных (КС* и КС**) сывороток в рабочем разведении по схеме главного опыта - на антикомплементарность.

Схема постановки главного опыта и контролей представлена в схеме 2.

16.2. Учет результатов

16.2.1. Результаты реакции считают действительными при следующих показателях контролей:

- задержка гемолиза - в пробирке с КС* и КАг⁺ и в контроле на гемотоксичность;
- полный гемолиз - в пробирках с КС* и КС* без антигенов (контроль за антикомплементарность сывороток) и с КАг⁺; с КС* и КАг⁺.

Схема 2

№ п/п	Компоненты реакции	№№ пробирок				Контроли								
						КС*				КС**				
		1	2	3	4*	1	2	3*	4**	1	2	3*	4**	
1	Испытуемая сыворотка в разведении 1:10	0,1	0,1	0,1	0,1									
2	КС* в рабочем разведении					0,1	0,1	0,1	0,1					
3	КС* в рабочем разведении									0,1	0,1	0,1	0,1	
4	КАг ⁺ в рабочем разведении	0,1				0,1				0,1				
5	КАг ⁺ в рабочем разведении		0,1				0,1				0,1			
6	ФР			0,1	0,2			0,1	0,2			0,1	0,2	
7	Комплект в рабочем разведении	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1		
18-20 часов при температуре (4±2) °С														
8	Гемолитическая система	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
в водяную баню при (37±0,5) °С на 25±5 мин														

- * - контроль на антикомплементарность
- ** - контроль на гемотоксичность

16.2.2. Реакцию оценивают в крестах (по п. 11) и считают:

- положительной - при задержке гемолиза эритроцитов на 3-4 креста в пробирке с исследуемой сывороткой и КАг⁺, а также в контроле на гемотоксичность (пробирки №1 и 4) и полном гемоллизе в пробирках № 2 и 3;
- сомнительной - при задержке гемолиза на 2 креста;
- отрицательной - при задержке гемолиза на 1 крест или полном гемоллизе эритроцитов.

16.2.3. При получении сомнительных результатов сыворотку крови от таких животных исследуют повторно через 14-21 день. При повторном получении сомнительной реакции сыворотки исследуют твердофазным иммуноферментным анализом, используя коммерческие наборы.

16.3. Реакцию связывания компонента на холоде можно ставить микрометодом в планшетах полистироловых плоскодонных, объем компонентов реакции соответственно уменьшают в 2 раза, общий объем - 0,25 см³ всех компонентов.

Контрольные (КС*, КС**) сыворотки, контрольные (КАг⁺, КАг⁻) антигены и комплект вносят в рабочем разведении. Испытуемые сыворотки вносят в лунки планшета в разведении 1:10 в объеме 0,05 см³.

Схема постановки главного опыта и контролей микрометодом представлена в схеме 3.

Схема 3

	H	G	F	E	D	C	B	A	
1	КС*	КС*	КС	КС	С1	С1	С2	С2	+ 0,05 см ³ КАг ⁺ + 0,05 см ³ компонента
2	КС*	КС*	КС	КС	С1	С1	С2	С2	+ 0,05 см ³ КАг ⁺ + 0,05 см ³ компонента
3	КС*	КС*	КС	КС	С1	С1	С2	С2	+ 0,05 см ³ ФР + 0,05 см ³ компонента
4	КС*	КС*	КС	КС	С1	С1	С2	С2	+ 0,1 см ³ ФР
5	С3	С3	С4	С4	С5	С5	С6	С6	+ 0,05 см ³ КАг ⁺ + 0,05 см ³ компонента
6	С3	С3	С4	С4	С5	С5	С6	С6	+ 0,05 см ³ КАг ⁺ + 0,05 см ³ компонента
7	С3	С3	С4	С4	С5	С5	С6	С6	+ 0,05 см ³ ФР + 0,05 см ³ компонента
8	С3	С3	С4	С4	С5	С5	С6	С6	+ 0,1 см ³ ФР
9	С7	С7	С8	С8	С9	С9	С10	С10	+ 0,05 см ³ КАг ⁺ + 0,05 см ³ компонента
10	С7	С7	С8	С8	С9	С9	С10	С10	+ 0,05 см ³ КАг ⁺ + 0,05 см ³ компонента
11	С7	С7	С8	С8	С9	С9	С10	С10	+ 0,05 см ³ ФР + 0,05 см ³ компонента
12	С7	С7	С8	С8	С9	С9	С10	С10	+ 0,1 см ³ ФР

Примечание:

С1, С2 и т.д. - сыворотки, исследуемые в разведении 1:10

Планшет закрывают крышкой и помещают в холодильник на 18-20 ч при температуре (4±2) °С. Затем планшет выдерживают 15-20 мин при комнатной температуре и в каждую лунку вносят по 0,1 см³ гемолитической системы, встряхивают и помещают в термостат при (37±0,5) °С на (25±5) мин.

16.4. Учет результатов

16.4.1. Результаты реакции считают действительными при следующих показателях контролей:

- задержка гемолиза - в лунках с КС* и КАг⁺ (лунки G1 и H1) и в контроле на гемотоксичность (ряды № 4, 8, 12);
- полный гемолиз - в лунках контрольных сывороток (КС* и КС*) с КАг⁺ (лунки H2, G2, F2 и E2) и без антигенов (лунки H3, G3, F3 и E3 - контроль на антикомплементарность сывороток); а также в лунках с КС* и КАг⁺ (F1 и E1).

16.4.2. Реакцию оценивают в крестах (по п. 11) и считают:

- положительной - при задержке гемолиза эритроцитов на 3-4 креста в лунках с исследуемой сывороткой и КАг⁺ и полном гемоллизе в рядах № 2 и 3 (3 и 7; 10 и 11);
- сомнительной - при задержке гемолиза на 2 креста в лунках с исследуемой сывороткой и КАг⁺;
- отрицательной - при задержке гемолиза на 1 крест или полном гемоллизе эритроцитов в лунках.

Далее - как описано в п. 16.2.3.

17. При работе с компонентами набора следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с ветеринарными препаратами, а при выделении вируса биотерма соблюдать требования, предусмотренные в Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

18. Все работы необходимо проводить в биологической лаборатории, оснащенной соответствующим оборудованием.

19. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

Заместитель директора ГНУ ВИИИ

Россельхозакадемия

С.А. Коп...

