



УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора
Е.А. Непоклонов
"30" 11/01/09 2006 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению антигенов ящурных штаммоспецифических сухих
для серологических реакций
(Организация-производитель: ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, п. Юрьевец)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Антигены ящурные штаммоспецифические сухие для серологических реакций представляют собой инактивированные и высушенные суспензии клеточных культур, инфицированных вирусом ящура соответствующего штамма.
2. По внешнему виду любой антиген представляет собой сухую пористую аморфную массу серо-белого, желтого или розового цвета, расфасованную в ампулы (флаконы) по 1,0 см³. Содержимое ампулы при добавлении изотонического раствора хлорида натрия (рН- 7,0-7,1) или дистиллированной воды должно растворяться в 1,0 см³ в течение 1-2 мин.
3. На ампулы (флаконы) с антигеном наклеивают этикетку с наименованием препарата, титра в РСК, объема, номера серии, даты изготовления и срока годности.
4. Этикетированные ампулы (флаконы) упаковывают в картонные коробки, где указывают наименование и товарный знак предприятия-изготовителя, полное наименование препарата, обозначение ТУ, типовую и штаммовую (вариантную) принадлежность, номер серии и контроля, количество ампул (флаконов) и количество препарата в коробке, титр в РСК, дату изготовления (месяц, год), условия хранения, срок годности. Внутри коробки вкладывают инструкцию по применению.
5. Срок годности - 24 месяца с даты изготовления.
6. Антигены хранят в организации-производителе и у потребителя в сухом темном месте при температуре от 4 до 8⁰ С в коробках заводской упаковки или транспортной таре. Антигены транспортируют всеми видами транспорта в соответствии с «Правилами перевозок скоропортящихся грузов и багажа», действующими на данном виде транспорта.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

7. Антигены предназначены для контроля специфических ящурных сывороток и антительных диагностических препаратов, используемых для идентификации штаммов вируса ящура, а также при ретроспективной диагностике ящура для выявления антител в сыворотке крови вакцинированных, переболевших или подозреваемых в переболевании животных.
- Антигены с активностью (титром) 1:4-1:12 предназначены для применения в реакции связывания комплемента (РСК), а с активностью 1:16 и выше – в реакции угнетения связывания комплемента (РУСК), диффузионной преципитации (РДП), радиальной иммунодиффузии (РРИД), пассивной гемагглютинации (РПГА), эритроиммунного анализа (РЭМА).
8. Реакция связывания комплемента протекает в два этапа: на первом этапе участвуют антигены и антитела (один из них заранее известен), а также комплемент морской свинки. При соответствии антигена и антител их комплекс связывает комплемент, что выявляют на втором этапе с помощью индикаторной системы, представляющей собой смесь эритроцитов барана и антисыворотки к ним (гемолизин). Если комплемент связался с комплексом

антиген-антитело, то не происходит лизиса эритроцитов (положительная реакция). При отрицательной реакции несвязанный комплемент способствует гемолизу, по которому судят о результатах реакции.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

9. Приготовление компонентов реакции

Физиологический раствор (ФР) – 0,85%-ный раствор химически чистой поваренной соли в дистиллированной воде, рН 7,0-7,1.

2%-ная взвесь эритроцитов барана

Кровь барана дефибрируют, фильтруют через марлю, центрифугируют 10 мин при 2000-3000 об/мин. Надосадок отсасывают, а к осадку приливают 8-10-кратное количество ФР, все тщательно перемешивают и снова центрифугируют, как указано выше. Эту операцию проводят до тех пор, пока жидкость в надосадке будет бесцветной. По окончании отмывания эритроцитов жидкость над осадком тщательно отсасывают пипеткой, а из осадка эритроцитов готовят 2%-ную взвесь, для чего к 2,0 см³ эритроцитов добавляют 98,0 см³ ФР.

Титрование гемолизина

Гемолизин – сыворотка крови кроликов, гипериммунизированных эритроцитами барана. Для определения титра гемолизина из него готовят серию разведений на ФР и затем испытывают его активность, для чего готовят разведение 1:100 (0,2 см³ гемолизина разводят в 9,8 см³ ФР). Затем в отдельной пробирке готовят следующее разведение гемолизина 1:1000, для чего к 1,0 см³ его в разведении 1:100 добавляют 9,0 см³ ФР. Это разведение является основным, из которого готовят все последующие разведения: 1:1500, 1:2000, 1:3000, 1:4000 и т.д. Схема титрования гемолизина представлена в таблице 1:

Таблица 1

Компоненты	Разведения гемолизина					
	1:1000	1:1500	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000
Гемолизин, см ³	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Физиологический р-р, см ³	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Комплемент в разведении 1:20, см ³	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты, 2% взвесь, см ³	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

После внесения компонентов смесь выдерживают в водяной бане в течение 10 мин при температуре 37⁰С, после чего проводят учет реакции.

Титром гемолизина считается наивысшее разведение, дающее полный гемолиз эритроцитов. **Рабочим разведением** гемолизина считается его четырехкратная концентрация от предельного титра (например, предельный титр 1:3000, рабочее разведение будет 1:750). Поскольку гемолизин, выпускаемый биофабрикой, консервирован глицерином, для приготовления рабочего разведения, его берут вдвое больше, т.е. 2:750 или 0,2 см³ гемолизина и 74,8 см³ ФР.

Титрованный гемолизин в рабочем разведении смешивают с равным количеством 2%-ной взвеси эритроцитов. Полученная смесь называется гемолитической системой (гемсистемой).

Примечание: титрование гемолизина проводят один раз для новой партии коммерческого препарата, в дальнейшем в реакции используют препарат с уже установленным титром.

Титрование комплемента

Титрование комплемента ведут в гемсистеме и обязательно в день постановки реакции. Вначале делают разведение комплемента 1:20, затем из него готовят разведения в следующих дозах: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 и т.д. до 0,4 см³ и добавляют компоненты реакции по схеме: (таблица 2).

Таблица 2

%-ное содержание цельного комплемента в дозе	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Комплемент 1:20, см ³	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4
ФР, см ³	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1
Гемолизин в рабочем титре, см ³	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты, 2% взвесь	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ФР (вместо антигена и сыворотки), см ³	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

После внесения компонентов смесь помещают в водяную баню на 15 мин при 37⁰С.

Титром комплемента считают его наименьшее количество, дающее полный гемолиз эритроцитов. В дальнейшем для постановки главного опыта комплемент берут с постоянным излишком в 2 условные единицы от титра его в гемолитической системе. Например, если титр комплемента в гем.системе 1,5% (см. схему титрования комплемента), для получения рабочего разведения следует взять 2,5%, при этом разведение комплемента в главный опыт делают из нативного (цельного) комплемента.

Подготовка материала к исследованию

Стенки афт отмывают ФР (рН 7,4-7,6), просушивают фильтровальной бумагой, взвешивают, измельчают в фарфоровой ступке с битым нейтральным стеклом до получения однородной массы. Антигены для РСК готовят в виде 33%-ной суспензии (1:3) на ФР. Полученную взвесь экстрагируют в течение 30 мин при комнатной температуре, 1 ч промораживают в условиях морозильной камеры. К оттаявшей смеси добавляют 10% хлороформа, тщательно встряхивают на шуттеле аппарате в течение 5 мин, затем центрифугируют при 3000-5000 об/мин в течение 10 мин. Далее, в зависимости от предназначения материала, очищенный препарат прогревают 30 мин в водяной бане при температуре 58⁰С и используют для серологических тестов.

Культуральную вирусосодержащую суспензию перед исследованием осветляют центрифугированием и очищают хлороформом, как указано выше.

Сыворотки морских свинок

Перед использованием сухую сыворотку разводят ФР до объемов, указанных на этикетке. Вскрытые ампулы хранят при температуре (4±2)⁰С и используют в течение суток.

Антигены

Перед использованием антигены вируса ящура растворяют дистиллированной водой или ФР до объемов, указанных на этикетке. Вскрытые ампулы хранят при температуре от 2 до 8⁰С и используют в течение суток.

10. Постановка главного опыта

При определении типов вируса ящура позитивные гипериммунные сыворотки и антигены не титруют, а используют их в удвоенных титрах. Например, если предельный титр сыворотки, указанный на этикетке, 1:40, то удвоенным титром ее будет разведение 1:20; если предельный титр антигена 1:8, то удвоенным его титром будет разведение 1:4.

РСК ставят в объеме 0,5 или 1,0 см³. Схема постановки реакции при типировании штаммов вируса ящура представлена в таблице 3. В верхней части таблицы 3 показан контроль компонентов, взятых в реакцию.

