

СОГЛАСОВАНО

Председатель технического комитета №454

«Охрана жизни и здоровья животных и
нарно-санитарная безопасность продуктов живот-
ного происхождения и кормов»

Для
В.И. Смоленский

«18» 2016 г.

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора ФКП

«Щелковский биокOMBинат»

Г.А. Бачериков

«18» 2016 г.

КОПИЯ

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для диагностики инфекционной анемии лошадей
в реакции диффузионной преципитации (РДП)

(Организация-разработчик: ФКП «Щелковский биокOMBинат», 141142, Московская область,
Щелковский район, п. БиокOMBината)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Международное непатентованное наименование – Набор для диагностики инфекци-
онной анемии лошадей в реакции диффузионной преципитации (РДП).

2. В состав набора входят следующие компоненты:

Наименование ком- понента	Основные характеристики компонента	Содержание компонента в единице упа- ковки	Количество еди- ниц фасовки в одном наборе
1. Антиген вируса ИНАН специфиче- ский преципитирую- щий (антиген)	Антиген представляет собой стерильный, лиофилизиро- ванный экстракт гомогената селезёнки лошади, больной инфекционной анемией. Ан- тиген имеет вид сухой одно- родной по цвету и структуре аморфной массы тёмно- или светло-коричневого цвета	2 см ³	1 флакон
2. Сыворотка специ- фическая преципи- тирующая (антисы- воротка)	Инактивированная лиофили- зированная сыворотка ло- шади с хроническим тече- нием инфекционной анемии. По внешнему виду пористая масса светло-бежевого цвета с желтоватым оттенком	2 см ³	3 флакона
3. Кислота борная	Сыпучий порошок белого цвета	1,65 г	1 флакон
4. Раствор натрия гидроокиси 3%-ный	Бесцветная прозрачная жид- кость	10 см ³	1 флакон
5. Агар «Дифко»	Сыпучий порошок светло-бе- жевого цвета	1,5 г	1 флакон

3. Компоненты, входящие в состав набора (антиген, антисыворотка, кислота борная, раствор натрия гидроокиси, агар «Дифко»), расфасованы во флаконы вместимостью 10 см³, герметично укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками. Компоненты, представленные в лиофилизированном виде (антиген, антисыворотка), после добавления дистиллированной воды растворяется в течение 3-5 минут.

4. Флаконы с компонентами, входящими в состав диагностического набора, уложены в коробки пенополистирольные с гнездами или картонные коробки с разделительными перегородками, обеспечивающими их целостность. В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению диагностического набора.

5. Срок годности набора – 24 месяца с даты выпуска при соблюдении условий хранения и транспортирования. По истечении срока годности набор к применению не пригоден.

Антиген и антисыворотку, неиспользованные в день растворения, сохраняют в замороженном состоянии при температуре минус 10 °С до повторного исследования. Повторное замораживание сыворотки не допускается.

6. Диагностический набор транспортируют и хранят в сухом темном месте при температуре от 2 °С до 8 °С.

Допускается транспортирование набора при температуре до 20 °С не более 5 суток.

7. Диагностический набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

8. Флаконы с компонентами набора без маркировки, с нарушением целостности и/или герметичности укупорки, с измененным цветом и/или консистенцией, с наличием посторонних примесей, с истекшим сроком годности, бракуют, обеззараживают путем кипячения в течение 30 минут и утилизируют.

Утилизация обеззараженных компонентов диагностического набора не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

9. Антиген (экстракт гомогената селезенки) содержит внутренний структурный белок вируса с молекулярной массой g 26. Он относится к так называемым растворимым антигенам, способным диффундировать в агаровом геле. Является общим (группоспецифическим антигеном) для всех штаммов вируса инфекционной анемии лошадей (ИНАН).

10. Принцип метода основан на встречной диффузии антител (иммунной сыворотки) и растворимого антигена в агаровом геле. При наличии в исследуемой сыворотке антител гомологичных антигену образуется полоса преципитации.

11. Набор применяют для лабораторной диагностики инфекционной анемии лошадей с целью обнаружения специфических антител в сыворотках крови лошадей больных инфекционной анемией.

12. Специфические антитела появляются в крови животных через 2-6 недель после инфицирования и сохраняются на протяжении длительного времени (более 7 лет).

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

11. Диагностический набор применяют для исследования сывороток крови лошадей на выявление антител к вирусу инфекционной анемии при остром, хроническом и латентном течении болезни. Набор рассчитан на исследование 90-120 проб сывороток крови.

12. Антиген и антисыворотка, имеющиеся в наборе, используются в качестве тест-системы «антиген-антитело» при постановке реакции.

13. Перед постановкой реакции сухие антиген и антисыворотку растворяют дистиллированной водой в объёме, указанном на этикетке (приготовленные разведения являются рабочими разведениями). Антиген и антисыворотка должны полностью раствориться в течение 3-5 минут без образования не разбивающихся при встряхивании хлопьев.

14. Испытуемые сыворотки получают от исследуемых лошадей в количестве не менее 5-6 см³. Их консервируют путём добавления антибиотиков – пенициллина и стрептомицина по 1000 ЕД/мл и хранят при температуре от 4 до 8 °С в течение 10 суток. Сыворотки без консерванта сохраняют в замороженном состоянии.

15. Для приготовления 1% геля агара «Дифко» в стеклянную колбу вместимостью 250-300 см³ отмеряют 140 см³ воды дистиллированной и, затем, в неё последовательно вносят кислоту борную и раствор натрия гидроокиси 3%. Содержимое колбы перемешивают до полного растворения борной кислоты. Проверяют рН буфера. Буфер должен иметь рН в пределах 8,6±0,1.

В приготовленный боратный буфер вносят агар «Дифко» - 1,5 г. Колбу ставят в баню с водой, воду доводят до кипения и выдерживают в бане до полного расплавления агара. В чашки Петри диаметром 15 см вносят 15 см³ расплавленного агара, предварительно охладив его до 60 °С. Чашки оставляют на один час с приоткрытыми крышками и дают ему застыть.

16. Контроль качества агара проводят визуально, после его застывания. Слой агара должен быть ровным по всей поверхности чашки, без пузырьков газа. Толщина слоя 3 мм.

После застывания агара приступают к вырезанию лунок. Для этого используют специально изготовленные пробойники из семи жёстко закреплённых трубочек диаметром 7 мм – одна в центре и шесть по окружности на расстоянии 3 мм от центральной и друг от друга (см. рис. 1).

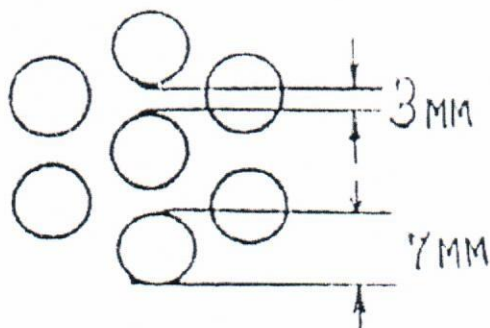


Рис. 1 Трафарет для размещения лунок в РДП

Агаровые пробки удаляют иглой, пинцетом или канюлей, соединённой с вакуумной установкой. Если в лунках накапливается влага, то её перед внесением реагентов отсасывают пипеткой.

17. Постановка реакции.

Используют две схемы заполнения лунок. Первая – в центральную лунку вносят микропипеткой 0,05-0,06 см³ антигена в три периферические лунки, через одну, закапывают по 0,05-0,06 см³ антисыворотку в рабочих разведениях. Оставшиеся три свободные лунки заполняют с помощью тонко оттянутой пастеровской пипетки исследуемыми сыворотками. При этом в одной чашке исследуются 12 проб сыворотки (см. рис. 2).

18. В случае проведения массовых исследований может быть использована вторая схема заполнения лунок, которая позволяет в одной чашке одновременно исследовать 16 проб. В центральную лунку вносят антиген, в две периферические, диаметрально противоположные лунки вносят антисыворотку и оставшиеся четыре лунки – испытуемые сыворотки

(см. рис. 3). Для каждой пробы сыворотки используют отдельную пастеровскую пипетку. После заполнения лунок чашки Петри закрывают крышками и помещают во влажную камеру при температуре от 18 до 25 °С.

19. Учёт реакции.

Реакцию учитывают через 48-72 часа. Чашки просматривают на тёмном фоне в косо направленном пучке света. Для этой цели используют осветитель ОИ-19 или другой аналогичный прибор.

Оценку реакции делают по контрольной линии преципитации – линии преципитации между контрольными антигеном и антисывороткой. Если она отсутствует или слабо выражена, то исследование необходимо повторить. Контрольные линии преципитации должны быть чёткими, располагаться посередине между лунками с антигеном и сывороткой.

20. Существенный сдвиг контрольных линий преципитации в сторону антигена или сыворотки, а также если она слабо выражена, является показателем слабой активности одного или обоих компонентов набора. В этом случае проводят подтитровку антигена и сыворотки. Для этого сухой препарат антиген или антисыворотку разводят в два раза меньшем объёме дистиллированной воды, затем готовят разведения 1:1,25; 1:1,5; 1:1,75 и проверяют в РДП. За рабочее разведение принимают то разведение компонентов диагностикума, которое даёт чёткие линии преципитации, расположенные посередине между лунками с антигеном и антисывороткой.

21. Оценка результатов реакции:

Отрицательная – контрольные линии продолжаются в сторону лунки с испытуемой сывороткой без изгибов или с небольшим изгибом в сторону контрольной сыворотки (см. приложение, рис. 3, лунка 3).

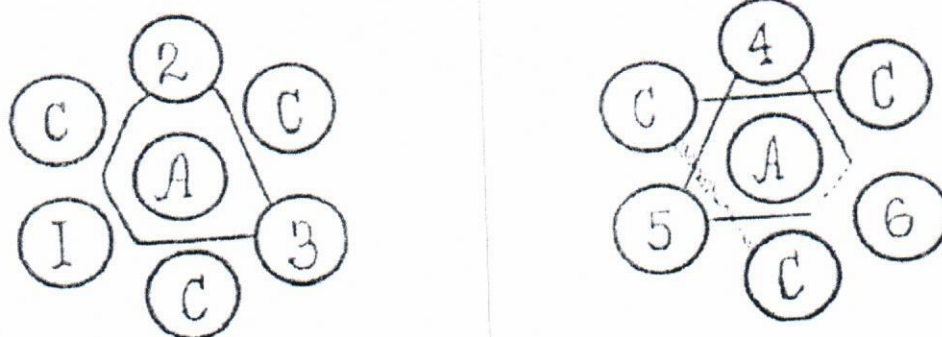


Рис. 2 Схема заполнения лунок для одновременного исследования на одной чашке Петри 12 проб сыворотки

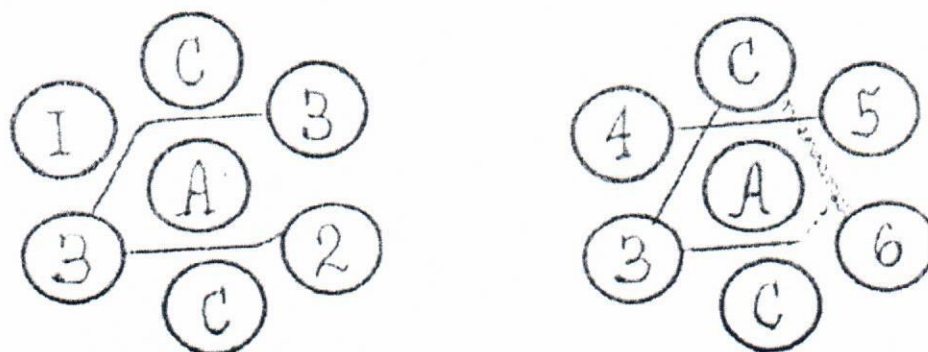


Рис. 3 Схема заполнения лунок для одновременного исследования на одной чашке Петри 16 проб сыворотки
Условные обозначения:

А – лунки с антигеном;

С – лунки с контрольными антисыворотками;

1, 2, 3, 4, 5, 6 – лунки с испытуемыми сыворотками.

Положительная:

- между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном образуется полоса преципитации, которая соединяется с контрольной линией (см. приложение, рис 2 и 3, лунка 1);

- линия преципитации отсутствует, но контрольные линии образуют вблизи с испытуемой сывороткой изгиб, направленный в сторону антигена – слабоположительная сыворотка (см. приложение, рис. 2 и 3, лунка 2);

- контрольные линии укорачиваются со стороны лунки с испытуемой сывороткой, в отдельных случаях контрольные линии полностью растворяются, что свидетельствует о высоком титре антител (см. приложение, рис. 2 и 3, лунка 6). Более различимые линии преципитации будут образовываться, если эти пробы развести 1:4 или 1:8 и повторить реакцию.

Сомнительная – слабый изгиб контрольной линии плохо просматривается, образуются интенсивные неспецифические линии или ореол вокруг лунок, что затрудняет учёт реакции.

От животных, давших сомнительную реакцию, через 2-3 недели берут кровь и исследование повторяют.

Пробы сыворотки, давшие при повторном исследовании отрицательный результат, считают отрицательными.

При получении повторной сомнительной реакции – результат считают положительным.

Неспецифическая преципитация – образуется с некоторыми пробами сыворотки, особенно полученными от старых лошадей. Признаком неспецифической реакции является перекрещивание линий преципитации с контрольными линиями (см. приложение, рис 2 и 3, лунки 5 и 4).

В одной и той же пробе сыворотки могут быть специфические и неспецифические антитела.

22. При образовании интенсивного ореола вокруг лунок, затрудняющего учёт реакции, эти пробы сыворотки исследуют повторно, добавив к агару 5% хлористого натрия. Для этого к 150 мл боратного буфера добавляют 7,5 граммов химически чистого хлористого натрия.

23. Жеребят, полученных от положительно реагирующих в РДП кобыл, исследуют после отъёма в возрасте 6-8 месяцев.

24. Результаты учёта реакции регистрируют в специальных журналах, которые должны быть прошнурованы, пронумерованы и скреплены печатью.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

25. При работе с набором следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами ветеринарного назначения.

26. Все лица, участвующие в проведении серологических исследований на инфекционную анемию лошадей, должны быть одеты в спецодежду (халат, головной убор, резиновые перчатки). В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

27. При попадании компонентов диагностического набора на кожу и/или слизистые оболочки их следует промыть большим количеством чистой водопроводной воды.

ФКП «Щелковский биокомбинат», 141142, Московская область, Щелковский район, п. Биокомбината

ФКП «Щелковский биокombинат», 141142, Московская область, Щелковский район, п. Биокombината

С утверждением настоящей Инструкции утрачивает действие «Инструкция по применению набора для диагностики инфекционной анемии лошадей в реакции диффузионной преципитации (РДП)», утвержденная 23 марта 2016 года.

СТ. МЕНЕДЖЕР