



УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Руководителя

Россельхознадзора

И.А. Власов

«14» декабря 2009 г.

Инструкция

по применению набора для диагностики инфекционной анемии лошадей в реакции диффузионной преципитации (РДП) (организация-производитель ФГУП «Щелковский биокombинат»)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для диагностики инфекционной анемии лошадей в реакции диффузионной преципитации (РДП).

2. Набор рассчитан на исследование 90-120 проб сывороток крови.

Набор содержит:

| Наименование препарата | Основные характеристики препарата | Содержание препарата в единице упаковки | Количество единиц фасовки в одном наборе |
|--|---|---|--|
| 1. Антиген вируса ИНАН специфический преципитирующий (антиген) | Антиген представляет собой стерильный, лиофилизированный экстракт гомогената селезенки лошади больной инфекционной анемией. Антиген имеет вид сухой однородной по цвету и структуре аморфной массы темно- или светло-коричневого цвета. | 2 см ³ | 1 фл. |
| 2. Сыворотка специфическая преципитирующая (антисыворотка) | Инактивированная лиофилизированная сыворотка лошади с хроническим течением инфекционной анемии. По внешнему виду сухая пористая масса розовато-серого цвета. | 2 см ³ | 3 фл. |
| 3. Кислота борная | Сыпучий порошок белого цвета | 1,65 г | 1 фл. |

| | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|-------|
| 4. Раствор натрия гидроокиси 3 %-ный. | Бесцветная прозрачная жидкость | 10 см ³ | 1 фл. |
| 5. Агар «Дифко» (ВАСТО-АГАР) | Сыпучий порошок светло-бежевого цвета | 1,5 г. | 1 фл. |

3. Препараты, входящие в состав набора (антиген, антисыворотка, кислота борная, раствор натрия гидроокиси, агар «Дифко»), расфасованы во флаконы вместимостью 10 см³, укупорены пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками.

4. На каждый флакон с препаратами наклеена этикетка с указанием: наименования препарата, его количества в объемных единицах, количества доз антигена и антисыворотки, объема растворителя вносимого во флакон с антигеном и антисывороткой, необходимого для приготовления рабочего разведения, номера серии и срок годности.

5. Флаконы с препаратами, входящими в состав набора, уложены в картонные коробки с разделительными перегородками. В каждую коробку вложено инструкция по применению набора.

6. На коробке с флаконами наклеена этикетка, на которой должно быть указано: наименование предприятия-изготовителя, его товарного знака, полное наименование набора, номера серии и номера контроля, количества флаконов каждого препарата в коробке, количества препарата в объемных единицах и количество доз препарата во флаконе (для антигена и антисыворотки), дата изготовления, срок годности, условия хранения, обозначение нормативного документа и надписи «Для животных».

7. Флаконы с препаратами без этикеток, с трещинами, нарушенной укупоркой, содержащие посторонние примеси, хлопья, с истекшим сроком годности выбраковывают и обезвреживают кипячением в течение 15 минут.

8. Срок годности набора - 2 года от даты изготовления при хранении в сухом темном месте при температуре от 4 °С до 8 °С.

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 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 НАБОРА.

13. 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.

14. Антиген и антисыворотка, имеющиеся в наборе, используются в качестве тест-системы "антиген-антитело" при постановке реакции.

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

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

16. Испытуемые сыворотки получают от исследуемых лошадей в количестве не менее $5\text{-}6\text{ см}^3$. Их консервируют путем добавления антибиотиков - пенициллина и стрептомицина по 1000 ед/мл и хранят при температуре $4\text{-}8^{\circ}\text{C}$ в течение 10 суток. Сыворотки без консерванта сохраняют в замороженном состоянии.

17. Для приготовления 1% геля агара "Дифко" в стеклянную колбу вместимостью $250\text{-}300\text{ см}^3$ отмеряют 140 см^3 воды дистиллированной и, затем, в нее последовательно вносят кислоту борную и раствор натрия гидроксида 3%. Содержимое колбы перемешивают до полного растворения борной кислоты. Проверяют рН буфера. Буфер должен иметь рН в пределах $8,6\pm 0,1$.

В приготовленный боратный буфер вносят агар "Дифко" - $1,5\text{ г}$. 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 см^3 расплавленного агара, предварительно охладив его до 60°C . Чашки оставляют на один час с приоткрытыми крышками и дают ему застыть.

18. 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 7 жестко закрепленных трубочек диаметром 7 мм - одна в центре и 6 по окружности на расстоянии 3 мм от центральной и друг от друга (см. приложение 1, рис. 1). Агаровые пробки удаляют иглой, пинцетом или канюлей, соединенной с вакуумной установкой. Если в лунках накапливается влага, то ее перед внесением реагентов отсасывают пипеткой.

19. Постановка реакции.

Используют 2 схемы заполнения лунок. Первая - в центральную лунку вносят микропипеткой 0,05-0,06 мл антигена в три периферические лунки, через одну, закапывают по 0,05-0,06 мл антисыворотку в рабочих разведениях (п.3.2). Оставшиеся 3 свободные лунки заполняют с помощью тонко оттянутой пастеровской пипетки исследуемыми сыворотками. При этом в одной чашке исследуются 12 проб сыворотки (см. приложение, рис.2).

20. В случае проведения массовых исследований может быть использована вторая схема заполнения лунок, которая позволяет в одной чашке одновременно исследовать 16 проб. В центральные лунки вносят антиген в две периферические, диаметрально противоположные лунки вносят антисыворотку и в оставшиеся 4 - испытуемые сыворотки (см. приложение, рис. 3). Для каждой пробы сыворотки используют отдельную пастеровскую пипетку.

После заполнения лунок чашки Петри закрывают крышками и помещают во влажную камеру при температуре 18-25 °С.

21. Учет реакции.

Реакцию учитывают через 48-72 часа. Чашки просматривают на темном фоне в косо направленном пучке света. Для этой цели используют осветитель ОИ-19 или дугой 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 четкими, располагаться посередине между лунками с антигеном и сывороткой.

22. Существенный сдвиг контрольных линий преципитации в сторону антигена или сыворотки, а так же если она слабо выражена, является показателем слабой активности одного или обоих компонентов набора. В этом случае проводят подтитровку антигена и антисыворотки. Для этого сухой препарат антиген или антисыворотку растворяют в два раза меньшем объеме

дистиллированной воды. затем готовят разведения 1:1,25; 1:1,5; 1:1,75 и проверяют в РДП. За рабочее разведение принимают то разведение диагностикума, которое дает четкие линии преципитации, расположенные посередине между лунками с антигеном и антисывороткой.

23. Оценка результатов реакции:

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

Положительная:

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

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

в) 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 реакция - слабый изгиб контрольной линии плохо просматривается; образуются интенсивные неспецифические линии или ореол вокруг лунок, что затрудняет учет 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 - образуются 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.

24. При образовании интенсивного ореола вокруг лунок, затрудняющего учет 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.

25. Жеребят, полученных от положительно реагирующих в реакции РДП кобыл, исследуют после отъема в возрасте 6-8 месяцев.

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

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

27. При работе с препаратами, входящими в состав набора следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с ветеринарными препаратами.

При попадании на открытые участки тела или слизистые оболочки глаз, рта, носа и после окончания работы руки и другие открытые участки тела моют водой с мылом.

28. Набор следует хранить в местах недоступных для детей.

ПРИЛОЖЕНИЕ

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

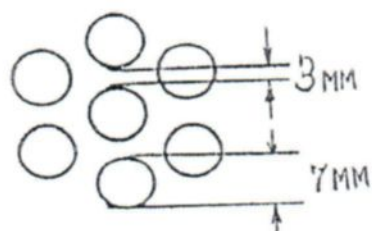


Рис. 1 Трафарет для размещения лунок в РДП



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.

Инструкция разработана ФГУ «ВИЭВ» и ФГУП «Щелковский биокомбинат»

141142, Московская обл., Щелковский район, п. Биокомбината, ФГУП «Щелковский биокомбинат»

Набор рекомендован к регистрации ФГУ «ВГНКИ»

Регистрационный номер ПВР - 1-2.3/01289

С утверждением настоящей инструкции прекращает действие на территории России наставление по применению набора для диагностики инфекционной анемии лошадей в реакции диффузионной преципитации за № 13-5-02/0894 от 27.01.04 г., утвержденное Департаментов ветеринарии Минсельхоза РФ.