



Министерство сельского хозяйства РФ
ФГБНУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)
№ РОСС RU.С007.Д00316

«Для ветеринарного
применения»

**НАБОР АНТИГЕНОВ И СЫВОРОТОК
ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗОВ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

ТУ 9388-020-00492374-2007

Антиген хламидийный для РСК – 10 амп. по 1,0 см³
Антиген контрольный для РСК – 2 амп. по 1,0 см³
Сыворотка хламидийная для РСК – 5 амп. по 1,0 см³
Сыворотка отрицательная для РСК – 3 амп. по 1,0 см³

Серия №
Контроль №

Дата изготовления:

СРОК ГОДНОСТИ 18 МЕС.

ХРАНИТЬ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ НЕ ВЫШЕ +8°C

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
А.И. Никитин
« 12 » _____ 2016 г



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора антигенов и сывороток для серологической
диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных

(Организация-разработчик ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической,
радиационной и биологической безопасности», 420075 г. Казань, Научный
городок-2)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных применяют для постановки реакции связывания комплемента (РСК), реакции длительного связывания комплемента (РДСК) и реакции непрямого связывания комплемента (РНСК) для выявления специфических хламидийных антител и установления нарастания титра их в сыворотках крови животных и птиц (мелкого и крупного рогатого скота, свиней, лошадей, пушных зверей, собак, кошек, птиц и др.), больных или подозрительных в заболевании хламидиозом.

2. Набор диагностикума для серологических исследований содержит: 10 ампул родоспецифического хламидийного антигена, 2 ампулы контрольного антигена, 5 ампул иммунной хламидийной сыворотки и 3 ампулы контрольной отрицательной сыворотки. Антигены представляют собой аморфную массу белого цвета лиофилизированные в ампулах по 1,0 см³, сыворотки - желтоватого цвета лиофилизированные в ампулах по 1,0 см³.

3. На ампулы с антигенами и сыворотками наклеивают этикетку на которой указывают следующие обозначения: название препарата, номер серии, объем в см³, титр, рабочее разведение.

4. На каждую коробку с набором антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных наклеивают этикетку, на которой указывают: наименование и товарный знак организации-производителя, полное название набора, перечень антигенов и сывороток, количества ампул каждого препарата, входящего в набор, номер серий, дату изготовления, срок годности, номер контроля, условия хранения и обозначение технических условий.

5. При отсутствии маркировки (этикетки) на ампулах диагностикума, нарушении целостности ампул, изменении цвета и

консистенции содержимого, наличии хлопьев и посторонних примесей при его растворении, а также при неполном растворении - набор бракуют.

6. Набор пригоден для применения в течение 18 мес с даты изготовления при условии хранения в темном сухом месте при температуре не выше 8⁰С. Возможно хранение наборов при любой минусовой температуре.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. Метод основан на образовании иммунного комплекса антиген-антитело посредством связывания комплемента и обнаружения иммунного комплекса индикаторной (гемолитической) системой.

8. Набор рассчитан на исследование 200 проб сывороток крови.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

9. Подготовка компонентов к исследованию.

9.1. Для исследования пригодны сыворотки крови свежие (не позднее 3-х сут. с момента взятия), замороженные при минус 20⁰С и консервированные борной кислотой (2% к объему). Мутные, проросшие и гемолизированные сыворотки для исследования непригодны.

Кровь для исследования животных на хламидийную инфекцию берут из яремной вены в количестве 5-7 см³ в стерильные пробирки и отделяют сыворотку (2-3 см³). Кровь берут в острый период заболевания (первая порция). Вторая порция берется на 18-20 сут.

9.2. Перед применением лиофилизированные антигены и сыворотки растворяют в 1 см³ физиологического раствора. Затем из этих растворов готовят рабочее разведение согласно этикетке.

Разведенные диагностикумы пригодны в течение 3-х сут при условии хранения в плотно закрытых пробирках или флаконах при температуре от 2 до 6⁰С.

9.3. Все компоненты реакции связывания комплемента (РСК) разводят физиологическим раствором, приготовленным за день или в день опыта на дистиллированной воде (рН 7,0-7,2) из химически чистой поваренной соли. Перед употреблением физиологический раствор фильтруют и кипятят в течение 5 мин.

Для устранения антикомплемментарности контрольные иммунные и испытуемые сыворотки крови разводят физиологическим раствором 1:5 и инактивируют при температуре 59-63⁰С в течение 30 мин.

Постановку РСК, РДСК и РНСК проводят в объеме 0,5 см³ или 1,0 см³ (сыворотки, антиген в рабочем разведении, комплемент в рабочей дозе разливают по 0,1 или по 0,2 см³, гемолитическую систему - по 0,2 или по 0,4 мл соответственно). На примерах, приведенных в таблицах 1-4 реакция показана в объеме 1,0 см³.

10. Постановка реакции связывания комплемента.

10.1. Для постановки РСК необходимы следующие ингредиенты:

- а) специфический хламидийный и контрольный антигены;
- б) специфическая хламидийная, контрольная (отрицательная) и исследуемые сыворотки;
- в) сухой или жидкий комплемент;
- г) стандартная гемолитическая сыворотка;
- д) 2,5%-я взвесь бараньих эритроцитов.

10.2. Этапы постановки РСК:

а) Приготовление гемолитической системы. Смешивают равные части 2,5%-ных эритроцитов барана (2,5 см³ сгустка отмытых эритроцитов на 97,5 см³ физиологического раствора) и разведенной гемолитической сыворотки в двойном титре (если титр гемолизина 1:3000, то двойной титр будет равен 1:1500). Смесь эритроцитов и гемолизина сенсibiliзируют 30 мин при 37⁰С. Остальное время гемолитическая система хранится при температуре 4-6⁰С.

б) Титрование комплемента. Комплемент титруют каждый раз перед постановкой главного опыта РСК, РДСК и РНСК в гемолитической системе. Сухой комплемент растворяют в физиологическом растворе до нативного состояния (как указано на этикетке) и делают основное разведение 1:30 (0,3 см³ комплемента + 8,7 см³ физиологического раствора).

Титрование комплемента начинают с дозы 0,02 см³ и до 0,18 см³ с интервалами по 0,02. Для этого в дополнительный ряд пробирок вносят комплемент (разведенный 1:30) в дозах 0,2; 0,4; 0,6 и т.д. до 1,8 см³ и добавляют в каждую пробирку недостающее до 2,0 см³ количество физиологического раствора, т.е. 1,8; 1,6; 1,4 и т.д. Затем из дополнительного ряда комплемент переносят по 0,2 см³ в основной ряд пробирок. Во все пробирки разливают по 0,4 см³ физиологического раствора и по 0,4 см³ гемолитической системы, слегка встряхивают и ставят в водяную баню на 30 мин при температуре 37-38⁰С (схему разведения и титрования комплемента см. в таблице № 1).

Титром (единицей) комплемента считают наименьшую его дозу, которая дает полный гемолиз эритроцитов.

В примере, приведенном в таблице № 1, титр комплемента, разведенного 1:30, равен 0,1 см³, удвоенный титр будет являться его рабочей дозой (0,2 см³).

Расчет количества чистого комплемента, необходимого для постановки главного опыта, делают по формуле:

$$\frac{A \times B}{C} = X, \text{ где}$$

A - рабочая доза комплемента;

B - количество пробирок, занятых в реакции;

C - основное разведение комплемента.

$$\text{Пример: } \frac{0,2 \times 90}{30} = 0,6$$

Таблица I

Схема разведения и титрования компонента для РСК, РДСК и РНСК

Компоненты, мл	Доза компонента								
	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18
Дополнительный ряд пробирок									
Комплемент в разведении 1:30	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8
Физиологический раствор	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
Основной ряд пробирок									
Комплемент в соответствующей дозе	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 минут при 37-38°C									
Примерный результат	++++	++++	++++	++	-	-	-	-	-

Так как количество разведенного компонента, требуемое для постановки всей реакции (в данном примере 90 пробирок), равно 18 см^3 ($0,2 \times 90$), то к $0,6 \text{ см}^3$ чистого компонента следует добавить $17,4 \text{ см}^3$ физиологического раствора.

10.3. Главный опыт РСК.

Испытуемые сыворотки исследуют со специфическим антигеном в разведении 1:5 и 1:10 (доза сыворотки $0,04$ и $0,02 \text{ см}^3$), с контрольным антигеном (на специфичность) без антигена (на антикомплемментарность) в разведении 1:5.

Инкубацию бактериологической системы проводят в водяной бане 90 мин при $37-38^\circ\text{C}$; время реакции гемолиза эритроцитов в водяной бане 30 мин при $37-38^\circ\text{C}$.

10.4. Контроли главного опыта РСК и РДСК.

Контролями главного опыта РСК и РДСК являются:

1. Специфическая хламидийная сыворотка без антигена с контрольным антигеном в разведении 1:5 и с антигеном специфическим до ее предельного титра, начиная с разведения 1:5;

2. Контрольная (отрицательная) сыворотка, в разведениях 1:5 и 1:10 со специфическим антигеном и в разведении 1:5 с контрольным антигеном и без антигена;

3. Антиген специфический и контрольный в двойной дозе - на антикомплемментарность (комплеммент +) и на гемотоксичность (комплеммент -);

4. Гемолитическая система - на гемотоксичность (комплеммент -). Схема постановки главного опыта РСК и учет результатов представлены в таблице № 2.

11. Постановка реакции длительного связывания компонента.

11.1. Первую фазу реакции длительного связывания компонента (РДСК) проводят в холодильнике при температуре $2-6^\circ\text{C}$ в течение 16-18 ч, вторую - в водяной бане 30 мин при $37-38^\circ\text{C}$.

Гемолитическую систему получают путем смешивания равных объемов гемолизина в тройном титре и 2,5%-ной взвеси эритроцитов барана. Смесь сенсibiliзируют при $37-38^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

Комплеммент титруют так же, как при постановке РСК в гемолитической системе (таблица № 1).

11.2. Главный опыт РДСК.

В первый день разливают компоненты для главного опыта. Для этого инактивированные испытуемые сыворотки разливают по $0,2 \text{ см}^3$ в 4 пробирки: в первую, вторую и третью пробирки - разведение сыворотки 1:5, в четвертую пробирку - разведение сыворотки 1:10. Затем в 1-ю пробирку наливают $0,2 \text{ см}^3$ физиологического раствора для контроля сыворотки на антикомплемментарность; во вторую пробирку - $0,2 \text{ см}^3$ контрольного антигена в рабочем разведении (контроль на специфичность); в 3-ю и 4-ю пробирки специфический антиген в рабочем титре по $0,2 \text{ см}^3$. Во все пробирки опыта разливают комплемент в двойной дозе и штативы помещают в холодильник.

11.3. Контроли главного опыта РДСК такие же, как при постановке РСК. На следующий день штативы с первой фазой реакции достают из холодильника и после выдерживания в течение 20-30 минут при температуре 18-22⁰ С во все пробирки разливают гемолитическую систему в дозе 0,4 см³. Схема главного опыта реакции длительного связывания комплемента представлена в таблице № 2.

12. Постановка реакции непрямого связывания комплемента.

12.1. В реакции непрямого связывания комплемента (РНСК) используют те же ингредиенты, что и в РСК, и весь ход постановки реакции (до главного опыта) проводится так же, за исключением того, что на всех подготовительных этапах реакция ведется в объеме 1,2 см³. Комплемент титруется в гемолитической системе в объеме 1,2 см³ и используется в двойной дозе). До 1,2 см³ объем реакции доводится на каждом этапе добавлением 0,2 см³ физиологического раствора.

12.2. Главный опыт РНСК.

Главный опыт при постановке РНСК проводится в три этапа:

12.2.1. Исследуемая сыворотка (0,2 см³) с хламидийным и контрольным антигенами (по 0,2 см³) инкубируется 90 минут при 37⁰С.

12.2.2. На втором этапе в реакцию вводится дополнительная индикаторная система в виде специфической хламидийной сыворотки в рабочем разведении (0,2 см³) и одновременно прибавляется комплемент в рабочем разведении (две дозы) и смесь (исследуемая сыворотка, антиген, хламидийная сыворотка и комплемент) инкубируется 90 мин при температуре 37-38⁰С.

12.3. На третьем этапе добавляется гемолитическая система (0,4 см³) и реакция заканчивается через 30 мин инкубации при 37-38⁰С. Учет результатов проводят через 30 мин после изъятия штативов. Схема постановки и учета результатов РНСК приведена в таблицах № 3 и № 4.

13. Учет результатов исследования.

13.1. Учет результатов реакции проводят дважды: первый раз тотчас после водяной бани, второй - после оседания эритроцитов (через 3-4 ч) или на следующий день при условии хранения штативов в холодильнике при температуре 4-6⁰С.

Результаты реакции оценивают по феномену гемолиза или задержки гемолиза эритроцитов. Степень задержки гемолиза эритроцитов оценивают по 4-х крестовой системе.

13.2. Диагностическим титром испытуемой сыворотки являются ее разведения 1:5 и 1:10 (0,04 и 0,02 мл) при полном гемолизе эритроцитов в контроле сыворотки без антигена. Сыворотка считается:

положительной - при задержке гемолиза на 4, 3 и 2 креста в разведении 1:10;

сомнительной - при задержке гемолиза на 1 крест в разведении 1:10 и от 1 до 4-х крестов в разведении 1:5;

Таблица № 2

Схема главного опыта РСК и РДСК

Компоненты реакции	Разведение сывороток					Контроли				
	1:5	1:5	1:5	1:10	Антиген специфический		Антиген контрольный		Гемол. система	
	№№ пробирок				На антикомплементарная	На гемотоксичность	На антикомплементарная	На гемотоксичность	На гемотоксичность	
Испытуемая сыворотка	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-
Физиологический раствор	0,2	-	-	-	-	0,2	-	0,2	0,2	0,6
Контрольный антиген	-	0,2	-	-	-	-	0,4	0,4	0,4	-
Специфический антиген в рабочем титре	-	-	0,2	0,2	0,4	0,4	-	-	-	-
Комплемент в рабочем разведении	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2	-	-	-
Водяная баня 90 минут при 37-38 ⁰ С (по схеме РСК) или 16-18 часов при 2-6 ⁰ С (по схеме РДСК)										
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 минут при 37-38 ⁰ С										
Результат реакции	-	-	++++	++++	-	++++	-	++++	-	++++

Таблица № 4

Схема учета результатов главного опыта РНСК

Сыворотки	Разведение сывороток					Контроли		Гемолитическая система	Результаты
	1:5	1:5	1:5	1:10	Антиген специфический	Антигенный контроль 2 дозы	Антигенный контроль 2 дозы		
Испытуемая № 1	-	-	-	-	-	-	-	-	положит.
Испытуемая № 2	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	отрицат.
Позитивная	-	-	-	-	-	-	-	До предельного титра	положит.
Нормальная	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	До предельного титра	отрицат.
Позитивная (без добавления индикаторной сыворотки)	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	До предельного титра	положит.
Негативная (без добавления индикаторной сыворотки)	-	-	-	-	-	-	-	-	отрицат.
Контроли на антикомplementарность							-	-	
Контроли на гемоксичность							++++	++++	++++

отрицательный - при полном гемолизе эритроцитов в разведении 1:5 и 1:10.

13.3. Животные, с сыворотками крови которых получена сомнительная реакция, подлежат повторному исследованию через 2-3 недели после первого исследования. Дважды давшие сомнительную реакцию животные считаются носителями хламидий.

13.4. В случаях, когда диагноз на хламидийную инфекцию устанавливается первично, сыворотки крови, давшие положительные результаты, исследуют до предельного титра, затем замораживают и исследуют повторно одновременно со второй порцией, полученной от того же животного через 2-3 недели. При двух-трехкратном нарастании титров антител и наличии клинических признаков болезни диагноз на хламидийную инфекцию считают установленным.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ.

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

15. Все работы необходимо проводить в спецодежде.

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

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

Инструкция разработана ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности». Юридический и почтовый адрес -420075, Россия, г. Казань, Научный городок -2.

Организация-производитель: ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

С утверждением настоящей инструкции считать утратившей силу инструкцию, утвержденную Россельхознадзором от 03.03.2008 г.