



ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «КУРСКАЯ БИОФАБРИКА - ФИРМА «БИОК»
305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5. Тел. (4712) 70-06-70, факс (4712) 70-54-26

**НАБОР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАРАГРИППА-3
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Для ветеринарного применения
СТО 00482909-042-2008
Набор компонентов

Антиген специфический вируса ПГ-3	4 фл. по 1 см ³ , титр в РГА (1:256) ± 1 разведение
Сыворотка крови лошадей специфическая к вирусу ПГ-3	2 фл. по 1 см ³ , титр в РЗГА 1:126
Сыворотка крови лошадей специфическая к вирусу ПГ-3	2 фл. по 1 см ³
Сыворотка крови лошадей нормальная	4 фл. по 0,5 см ³ , рабочий титр в РИФ 1:8
Сыворотка флуоресцирующая к вирусу ПГ-3	

Серия № XX
Дата производства: XX.XXXX

В наборе 100 доз

Годен до: XX.XXXX

Применять согласно инструкции
Хранить в местах недоступных для детей
Хранить в темном помещении при температуре не выше 10 °С
Транспортировать всеми видами крытого транспорта в условиях, исключающих замораживание и перегрев выше 25 °С.
Отпускается без рецепта



УТВЕРЖДАЮ



Директор
ФКП «Курская биофабрика»


В. М. Безгин

« 30 » 01 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ по применению набора для диагностики парагриппа-3 крупного рогатого скота

(Организация-разработчик: Федеральное казенное предприятие «Курская биофабрика – фирма «БИОК» (ФКП «Курская биофабрика»), г. Курск

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для диагностики парагриппа-3 (ПГ-3) крупного рогатого скота предназначен для идентификации вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

2. В состав набора входят следующие компоненты:

- антиген специфический вируса ПГ-3 крупного рогатого скота, объем 1,0 см³ - 4 амп.
- сыворотка крови лошадей специфическая к вирусу ПГ-3 крупного рогатого скота, объем 1,0 см³ - 2 амп.
- сыворотка крови лошадей неспецифическая (отрицательный контроль), объем 1,0 см³ - 2 амп.
- сыворотка флуоресцирующая к вирусу ПГ-3 крупного рогатого скота для ИФ, объем 0,5 см³ - 4 амп.

3. Внешний вид:

- антиген специфический - сухая гомогенная аморфная масса розового цвета с фиолетовым оттенком;
- сыворотки - сухая гомогенная аморфная масса желтовато-белого цвета;
- сыворотка флуоресцирующая - сухая гомогенная аморфная масса желтовато-зеленого цвета.

4. Маркированные флаконы (ампулы) устанавливают (укладывают) в маркированные коробки с разделительными перегородками, или любые другие, обеспечивающие их целостность.

Срок годности набора 24 месяца с даты изготовления при соблюдении условий хранения.

Хранить набор в сухих, закрытых и темных местах при температуре не выше 10 °С.

Транспортируют набор всеми видами крытого транспорта в условиях, исключающих перегрев выше 25 °С в течение не более 15 суток.

Набор хранить в местах, не доступных для детей.

В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

По истечении срока годности препарат не должен применяться.

II. ПРИНЦИПЫ МЕТОДА

5. В основе механизма реакции гемагглютинации (РГА) для выявления антигена вируса ПГ-3 крупного рогатого скота лежит адсорбция вируса на поверхности эритроцитов морской свинки и их специфического склеивания (агглютинации).

Метод выявления антител к вирусу ПГ-3 крупного рогатого скота в сыворотках крови в реакции задержки гемагглютинации (РЗГА) основан на способности антител предотвращать феномен агглютинации эритроцитов морской свинки в присутствии гомологичного антигена.

Принцип метода флюоресценции антител основан на визуальном учете специфического взаимодействия антител с вирусом ПГ-3 крупного рогатого скота. Образующийся при этом комплекс антиген-антитело, меченный флюорохромом, обнаруживается по характерному свечению в лучах люминесцентного микроскопа.

6. Лабораторная диагностика ПГ-3 крупного рогатого скота основывается на обнаружении специфического антигена в исследуемом материале:

- методом иммунофлуоресценции (ИФ);
- выделением вируса и его идентификации в серологических реакциях – реакции гемагглютинации (РГА);
- выделением специфических антител в сыворотке крови переболевших животных при постановке серологической реакции - РЗГА.

Для постановки контроля в серологических реакциях набор укомплектован неспецифической сывороткой (отрицательный контроль).

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

7. В лабораторию направляют для исследования патологический материал от больных животных, взятый в период максимального проявления у них клинических признаков или от вынужденно убитых или павших, взятый не позднее, чем через 2 часа после их гибели.

8. От больных животных берут:

- тампонами мазки со слизистой носовой перегородки для реакции иммунофлуоресценции и для обнаружения возбудителя;
- пробы крови для выявления в ней антител.

Тампоны с материалом помещают в пенициллиновые флаконы с 2-5 см³ раствора натрия хлорида 0,9 %, содержащим 1000 ЕД/см³ пенициллина и 1000 мкг/см³ стрептомицина.

Кровь в объеме не менее $5,0 \text{ см}^3$ берут в пробирки, после свертывания доставляют в лабораторию.

9. От павших и вынужденно убитых животных берут кусочки носовой перегородки, трахеи, легких. Флаконы с патологическим материалом доставляют в лабораторию в термосе со льдом.

10. Для получения суспензии (с целью выделения вируса) ткань измельчают, растирают в ступке со стеклянным песком, разводят раствором Хенкса, содержащим антибиотики, центрифугируют при 5000 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость отсасывают и выдерживают при температуре 4°C в течение 2-4 часов.

Флаконы с тампонами встряхивают 2-3 минуты, тампоны отжимают и удаляют, а содержимое флакона центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость отсасывают в стерильную пробирку, куда вносят по 500 ЕД/см^3 пенициллина и 500 мкг/см^3 стрептомицина, выдерживают при 4°C в течение 2-4 часов и используют для заражения культуры клеток или в РГА. Из осадка центрифугата готовят мазки для исследования методом иммунофлуоресценции.

11. Для постановки методов РГА и РЗГА используют:

- пипетки градуированные, вместимостью $1,0 \text{ см}^3$;
- планшеты с лунками полистероловые, 72-луночные;
- раствор натрия хлорида 0,9 %, рН 7,2-7,4;
- эритроциты морской свинки 1 % взвесь;
- водяная баня.

Содержимое ампул с антигеном вируса ПГ-3 крупного рогатого скота, сыворотками контрольной и специфической растворяют в $1,0 \text{ см}^3$ раствора натрия хлорида 0,9 %, рН 7,2-7,4. Разведенные компоненты хранят в условиях холодильника при температуре не выше 10°C не более 24 часов.

12. Постановка реакции гемагглютинации (РГА) и ее учет.

Во все лунки планшета вносят по $0,2 \text{ см}^3$ раствора натрия хлорида 0,9 %, затем в первые лунки вертикального ряда вносят по $0,2 \text{ см}^3$ исследуемого материала (см. п. 10) и готовят двукратные разведения его от 1:2 до 1:1024. Затем во все лунки вносят по $0,2 \text{ см}^3$ 1 % взвеси эритроцитов морской свинки.

Одновременно ставят контроль: к $0,2 \text{ см}^3$ раствора натрия хлорида вносят $0,2 \text{ см}^3$ 1 % взвеси эритроцитов морской свинки.

Учет результатов реакции проводят визуально, по 4-х-крестовой системе:

++++ - все агглютинирующие эритроциты ровным слоем покрывают дно лунки (в виде зонтика);

+++ - диаметр «зонтика» несколько меньше диаметра лунки;

++ - скопление эритроцитов в виде рыхлой точки;

+ - все эритроциты сосредоточены в центре дна лунки в виде компактной точки.

Положительной считается реакция на два и более креста при оседании эритроцитов в виде компактной точки в контроле.

13. Постановка реакции задержки гемагглютинации (РЗГА) и ее учет осуществляется для:

- идентификации вируса ПГ-3 крупного рогатого скота выявленного в РГА из исследуемого материала с использованием сыворотки специфической, входящей в набор;

- определения антител в сыворотке крови животных (исследуемой) с использованием антигена специфического вируса ПГ-3 крупного рогатого скота, входящего в набор.

Для постановки реакции готовят рабочее разведение антигена (специфического или исследуемого). Рабочее разведение антигена должно содержать 4 гемагглютинирующие единицы (ГАЕ), которое определяют делением полученного титра антигена в РГА на 4. Рабочую дозу антигена контролируют в РГА. Реакция ставится в пяти лунках. Во 2, 3, 4 и 5 лунки вносят $0,2 \text{ см}^3$ раствора натрия хлорида 0,9 % (первая лунка остается пустой).

В первую и вторую лунки вносят по $0,2 \text{ см}^3$ рабочего разведения антигена и из второй лунки делают разведения (1:2; 1:4; 1:8; 1:16), затем во все лунки вносят по $0,2 \text{ см}^3$ 1 %-ной взвеси эритроцитов морской свинки.

Учет реакции ведут через 60 минут. В первых трех лунках должна быть агглютинация, что соответствует 4, 2, 1 ГАЕ, в четвертой и пятой лунках агглютинация должна отсутствовать.

Для постановки основного опыта с целью определения титра антител в исследуемой сыворотке крови животных её разводят 1:8 раствором натрия хлорида 0,9 % (рН 7,2-7,4) прогревают на водяной бане при температуре $(56 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. Готовят двукратные последовательные разведения сыворотки в объеме $0,2 \text{ см}^3$ от 1:8 до 1:2048. Во все лунки вносят по $0,2 \text{ см}^3$ рабочего разведения специфического антигена, содержащего 4 ГАЕ, и выдерживают 60 мин при температуре $(22,0 \pm 4) \text{ }^\circ\text{C}$. После 60 мин контакта сыворотки с антигеном в лунки вносят по $0,4 \text{ см}^3$ 1 % взвеси эритроцитов морской свинки.

Для постановки основного опыта с целью идентификации вируса ПГ-3 крупного рогатого скота (исследуемого материала) специфическую сыворотку разводят 1:8 раствором натрия хлорида 0,9 % (рН 7,2-7,4) прогревают на водяной бане при температуре $(56 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. Готовят двукратные последовательные разведения сыворотки в объеме $0,2 \text{ см}^3$ от 1:8 до 1:2048. Во все лунки вносят по $0,2 \text{ см}^3$ рабочего разведения антигена (исследуемого), содержащего 4 ГАЕ, и выдерживают 60 мин при температуре $(22,0 \pm 4) \text{ }^\circ\text{C}$. После 60 мин контакта сыворотки с антигеном в лунки вносят по $0,4 \text{ см}^3$ 1 % взвеси эритроцитов морской свинки.

При постановке главного опыта одновременно ставят контроль:

«а» - в $0,4 \text{ см}^3$ раствора натрия хлорида вносят $0,4 \text{ см}^3$ 1 % взвеси эритроцитов морской свинки;

«б» - контрольную сыворотку разводят 1:8 раствором натрия хлорида 0,9 % (рН 7,2-7,4) прогревают на водяной бане при температуре $(56 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. Готовят двукратные последовательные разведения сыворотки в объеме $0,2 \text{ см}^3$ от 1:8 до 1:2048. Во все лунки вносят по $0,2 \text{ см}^3$ рабочего разведения специфического антигена, содержащего 4 ГАЕ, и выдерживают 60 мин при температуре $(22,0 \pm 4) \text{ }^\circ\text{C}$. После 60 мин контакта

сыворотки с антигеном в лунки вносят по $0,4 \text{ см}^3$ 1 % взвеси эритроцитов морской свинки.

Учет реакции проводят через 60 минут, при полном оседании эритроцитов в контроле «а».

Титром антител в сыворотке считается наибольшее ее разведение, которое вызывает полную задержку гемагглютинации. Наличие задержки гемагглютинации говорит о присутствии в исследуемой сыворотке специфических антител, а в исследуемом материале антигена. В контроле «б» реакция должна быть отрицательной – полное оседание эритроцитов.

14. Проведение метода иммунной флюоресценции.

Проведение метода иммунной флюоресценции осуществляется для выявления вируса ПГ-3 крупного рогатого скота в мазках-отпечатках срезов органов и тканей, мазках-отпечатках со слизистой носовой перегородки, а также в зараженной вирусом ПГ-3 крупного рогатого скота культуре клеток.

Мазки-отпечатки со слизистой носовой перегородки готовят из осадка центрифугата, полученного как описано в п. 10.

Мазки-отпечатки срезов органов и тканей готовят на обезжиренном предметном стекле. Для этого делают соскобы скальпелем непосредственно в каплю раствора натрия хлорида 0,9 % на предметном стекле.

Для определения наличия вируса ПГ-3 в зараженной культуре клеток культуру клеток ПЭК выращивают во флаконах, на дно которых помещены покровные стекла. После формирования монослоя проводят заражение исследуемым материалом (часть флаконов не инфицируют) для чего из флаконов сливают ростовую среду, клеточный монослой промывают от сыворотки раствором Хенкса. Затем вносят в клеточный монослой исследуемый материал в количестве $0,1 \text{ см}^3$ и оставляют флаконы при температуре $(37,0 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ на 30 минут для адсорбции вируса. Затем заливают поддерживающую среду без сыворотки и инкубируют при температуре $(37,0 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ 48 ч. Затем из флаконов с инфицированной культурой клеток и не инфицированной (контрольные) сливают среду, не извлекая покровное стекло, приливают ацетон, охлажденный до $4 \text{ }^\circ\text{C}$, до полного погружения покровных стекол и оставляют на 10 мин при температуре $18 \text{ }^\circ\text{C} - 25 \text{ }^\circ\text{C}$ (комнатной температуре). Затем ацетон сливают и промывают раствором натрия хлорида 0,9 % 5 – 6 раз и один раз дистиллированной водой. Осторожно извлекают пинцетом покровные стекла и укладывают их на фильтровальную бумагу вверх монослоем для подсушивания.

Мазки-отпечатки, покровные стекла с инфицированной культурой клеток и не инфицированной (контрольные) подсушивают на воздухе и окрашивают флуоресцирующей сывороткой. Флуоресцирующую сыворотку разводят в $0,5 \text{ см}^3$ дистиллированной воды, затем раствором натрия хлорида 0,9 % доводят до рабочего разведения, указанного на этикетке ампулы и окрашивают исследуемые препараты во влажной камере (чашка Петри с влажным тампоном) в течение 60 минут при температуре $(37-38) \text{ }^\circ\text{C}$. Затем препараты отмывают 5 – 10 раз дистиллированной водой, просушивают на воздухе. На

препараты наносят нефлуоресцирующее масло и исследуют под люминесцентным микроскопом.

Положительным результатом исследования методом иммунофлуоресценции считается наличие специфической флуоресценции которая характеризуется ярко зеленого или зеленовато-желтого цвета. При отрицательном результате – специфическая флуоресценция отсутствует, клетки флуоресцируют тусклым зеленовато-серым цветом.

15. Несоответствие объемов смешиваемых компонентов может привести к ошибочным результатам реакции.

16. Особенности проявления реакций при соблюдении техники ее постановки не установлено.

17. Следует избегать нарушений схемы проведения анализа и учета, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.

18. Постановка реакции проводят «in vitro».

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

19. При работе с компонентами набора следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами для ветеринарного применения.

20. Все лица, участвующие в серологическом исследовании, должны быть одеты в спецодежду (халат, головной убор). В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

21. При попадании компонентов набора на кожу и/или слизистые оболочки рекомендуется промыть водопроводной водой.

22. При соблюдении указанных правил использования набора не представляет опасности для здоровья человека.

Организация – производитель – ФКП «Курская биофабрика» (305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5).

Адрес места производства ФКП «Курская биофабрика» (305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5).

Инструкция по применению набора для диагностики парагриппа – 3 крупного рогатого скота разработана специалистами ФКП «Курская биофабрика» (305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5).

Наименование и адрес организации уполномоченной на принятие претензий от потребителя	Федеральное казенное предприятие «Курская биофабрика – фирма «БИОК» 305004, РФ, г. Курск, ул. Разина, 5
--	---