



ФКП «Ставропольская биофабрика»
355019, Российская Федерация, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Биологическая, д. 19
Тел. +7(8652)28-76-69 www.stavbio.ru

**НАБОР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА
ЖИВОТНЫХ**
в реакции связывания комплемента (РСК)

СТО 00482861-0140-2021





УТВЕРЖДАЮ

Врио директора

ФКП «Ставропольская биофабрика»

А.Г. Пильтяй

» 10 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для диагностики листериоза животных в реакции связывания комплемента (РСК)

(Организация-разработчик: ФКП «Ставропольская биофабрика»,
Российская Федерация, 355019, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Биологическая, д. 18)

I. Общие сведения

1. Набор для диагностики листериоза животных в реакции связывания комплемента (РСК).

2. Набор предназначен для выявления специфических антител в сыворотках крови животных, подозреваемых в заражении листериозом.

3. В состав набора входят:

- антиген листериозный жидкий - взвесь инактивированных штаммов *Listeria monocytogenes* I и II серогрупп - 10 ампул (флаконов) по 1 см³;

- сыворотка листериозная позитивная жидкая, полученная от волов-продуцентов, консервированная мертиолятом натрия (1:10000) - 2 флакона по 20 см³ в рабочем разведении.

4. По внешнему виду компоненты набора представляют собой:

- антиген - однородную жидкость молочно-белого цвета с сероватым оттенком, при хранении возможно образование белого осадка, гомогенизирующегося при встряхивании;

- сыворотка - прозрачную жидкость от соломенно-желтого до красного цвета.

5. Компоненты набора выпускают:

- антиген листериозный инактивированный жидкий - по 1,0 см³ в стеклянных ампулах вместимостью 5,0 см³, герметически запаенных или стеклянных флаконах вместимостью от 2 до 20 см³, укупоренных резиновыми пробками и обкатанных алюминиевыми колпачками;

- сыворотку листериозную позитивную жидкую - по 20,0 см³ в стеклянных флаконах вместимостью 20,0 см³, укупоренных резиновыми пробками и обкатанных алюминиевыми колпачками.

6. На каждую ампулу и флакон с компонентами наклеивают этикетку с указанием: организации-производителя, наименования компонента, его количества в ампуле (флаконе) в см³, количества доз в ампуле, рабочего разведения, номера серии, даты изготовления (месяц, год), срока годности.

Ампулы и флаконы с компонентами набора упаковывают в картонные коробки с разделительными перегородками, обеспечивающими их неподвижность и целостность.

7. На каждую коробку с набором наклеивают этикетку с указанием: наименования организации-производителя её адрес и товарный знак, названия набора, перечня компонентов, входящих в набор, количества ампул и флаконов каждого компонента в

наборе, номера серии, даты выпуска, срока годности, условий хранения и транспортирования, обозначения СТО. В коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

8. Срок годности набора 12 месяцев с даты выпуска, при соблюдении условий хранения и транспортирования. По истечении срока годности компонентов набор к применению не пригоден.

9. Набор хранят и транспортируют всеми видами транспорта при температуре от 2 °С до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше 25 °С не более 15 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

10. Компоненты набора без маркировки, с нарушением целостности и/или герметичности укупорки, с измененным внешним видом, с наличием посторонних примесей, с истекшим сроком годности, подвергшиеся замораживанию, бракуют, обеззараживают кипячением и утилизируют.

Утилизация обеззараженных компонентов набора не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

II. Принцип метода

11. Сущность реакции состоит в том, что при специфическом взаимодействии антигены и антитела образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент, т.е. происходит связывание комплемента комплексом антиген-антитело. Если же комплекс антиген-антитело не образуется, то комплемент остается свободным. РСК проводят в две фазы: 1 фаза – инкубация смеси, содержащей три компонента антиген+антитело+комплемент; 2 фаза (индикаторная) – выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним. При образовании комплекса антиген-антитело происходит связывание им комплемента и во 2 фазе гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет. Если комплекс антиген-антитело не образуется, комплемент остается свободным и во 2 фазе присоединится к комплексу эритроцит – антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз различной интенсивности, вплоть до полного лизиса эритроцитов.

12. Набор предназначен для исследования 800 проб сывороток крови.

III. Порядок применения

13. Подготовка биологического материала

Исследуют сыворотки крови животных, подозреваемых в заражении листериозом. Если РСК проводят в течение 24 ч после отбора проб, образцы сывороток хранят при температуре 4 °С. При более длительном хранении образцы замораживают при минус 20 °С. Перед исследованием замороженные образцы быстро (в течение 5-10 мин) размораживают в водяной бане при температуре (37±1) °С. В случае выпадения осадка пробы обязательно осветляют центрифугированием 10 мин при 2000g. Затем испытуемые и контрольные сыворотки крови в течение 30 мин инактивируют при (60±1) °С - сыворотки кроликов, при (58±1) °С - сыворотки лошадей и овец, при (56±1) °С - сыворотки КРС и свиней.

14. Подготовка набора к работе:

- антиген листериозный - разводят физиологическим раствором 1:20. Перед употреблением антиген необходимо тщательно взбалтывать;
- сыворотку листериозную позитивную, готовую к применению, предварительно

инактивируют (п.13).

15. Подготовка компонентов реакции:

- физиологический раствор (0,85%-ный) химически чистого хлорида натрия в дистиллированной воде, рН 7,0-7,2, выдерживают не менее 30 мин при температуре 37 °С;
- негативная (сыворотка крови здорового животного того же вида, что и испытуемая) и испытуемые сыворотки крови животных - после предварительной инактивации (п.13) разводят 1:10 физиологическим раствором;
- гемолитическую сыворотку (гемолизин) - разводят физиологическим раствором до рабочего разведения указанного на этикетке.

Примечание:

При расчете количества гемолизина следует исходить из его титра, не учитывая количество глицерина, то есть при титре гемолизина 1:1000 его удвоенный титр будет 1:500, для приготовления которого следует взять 0,1 см³ гемолизина и 49,9 см³ физиологического раствора.

Для титрования комплемента и постановки главного опыта гемолизин применяют в рабочем титре, который является четырехкратной дозой по сравнению с предельным титром. Например, если предельный титр равен 1:2000, то в реакции следует применять разведение 1:500, для чего к 1 см³ гемолизина приливают 499 см³ физиологического раствора;

- комплемент сухой для РСК, применяется в титре, установленном в день постановки реакции путем титрования в бактериолитической и гемолитической системах по стандартной методике;

- гемолитическая система - к равному объему 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана на физиологическом растворе добавляют равный объем гемолизина в рабочем разведении и выдерживают в водяной бане при (37±1) °С в течение 30 мин.

16. Постановка реакции связывания комплемента

Основные условия постановки реакции:

Реакцию ставят в общем объеме 1,0 см³ всех компонентов. Испытуемые сыворотки исследуют в разведении 1:10 с антигеном и без антигена (вместо антигена используют физиологический раствор) в объеме 0,2 см³. В пробирки с исследуемыми и контрольными сыворотками вносят антиген в рабочем разведении или физиологический раствор в объеме 0,2 см³. Затем вносят комплемент в объеме 0,2 см³ и ставят пробирки в водяную баню, время связывания комплемента в бактериолитической системе 20 минут - при (37±1) °С, после чего в пробирки вносят гемолитическую систему в объеме 0,4 см³ и переносят пробирки вновь в водяную баню на 20 минут - при (37±1) °С.

Основные контроли главного опыта:

- негативная и позитивная листериозная сыворотки в разведении 1:10 с антигеном и без антигена;

- антиген на антикомплиментарность и гемотоксичность - без комплемента и с комплементом;

- гемолитическая система с комплементом и без комплемента;

- комплемент в двойной дозе с эритроцитами без гемолитической сыворотки.

Учет результатов реакции:

Результаты реакции оценивают визуально по степени задержки гемолиза эритроцитов в крестах два раза:

- первый раз - после извлечения штатива из водяной бани;

- второй раз - через 14-18 часов выдерживания проб при комнатной температуре

