СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ ВГНКИ,
председатель ТК 454
_____ А.Н. Панин
25 сентября 2014г

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФКП
«Курская биофабрика»
_____ В. М. Безгин
01 октября 2014г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению антигена сапного для реакции связывания комплемента
(Организация-разработчик: ФКП «Курская биофабрика – фирма «БИОК»)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Международное непатентованное наименование - Антиген сапной для реакции связывания комплемента.

2. Лекарственная форма - раствор.

Антиген сапной для реакции связывания комплемента (далее по тексту антиген) представляет собой экстракт инактивированной термически бактериальной массы из культуры Burkholderia mallei, предназначенный для реакции связывания комплемента (РСК) при диагностике сапа.

По внешнему виду антиген представляет собой прозрачную слегка опалесцирующую жидкость светло-желтого цвета, без осадка и механических примесей.

Антиген расфасовывают по 1 $см^3$ в стерильные ампулы вместимостью 3 $см^3$. ампулы запаивают.

3. Ампулы с антигеном по 10 штук упаковывают в коробки с разделительными перегородками или любые другие, обеспечивающие их сохранность.

Срок годности антигена 2 года с даты выпуска при соблюдении условий хранения и транспортирования.

По истечении срока годности препарат не должен применяться.

4. Антиген хранят и транспортируют в темном сухом месте при температуре от 2 °С до 8 °С.

Допускается транспортирование антигена в упаковке организации-производителя при температуре не выше 25 °С в течение не более 15 суток.

5. Антиген следует хранить в местах, недоступных для детей.

6. Антиген в ампулах без маркировки, с нарушением целостности и/или герметичности укупорки, с измененным внешним видом, подвергшийся замораживанию, с истекшим сроком годности бракуют, обеззараживают кипячением в течение 30 минут и утилизируют.

Утилизация обеззараженного антигена не требует специальных мер предосторожности.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

7. Антиген представляет собой диагностический препарат. Без сапной сыворотки не должен вызывать задержки гемолиза эритроцитов. Без сапной сыворотки и комплемента не должен вызывать гемолиза эритроцитов. В смеси с сапной сывороткой должен вызывать задержку гемолиза эритроцитов и не вызывать ее в смеси с негативной сывороткой. Активность антигена должна быть не ниже 1:100.

Антиген не токсичен.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Антиген предназначен для использования в реакции связывания комплемента при серологической диагностике сапа.

Исследования разрешается проводить только ветеринарным врачам и ветеринарным фельдшерам со специальным средним образованием под контролем ветеринарного врача.

9. Запрещается:

- применять инструменты, используемые для постановки реакции, для проведения других исследований.

10. Каждую ампулу с антигеном перед применением просматривают. При обнаружении в антигене каких-либо примесей, при нарушении целостности стекла или запайки, отсутствии надписей на ампулах, их выбраковывают.

10.1 Перед применением антигена содержимое одной ампулы растворяют в 99 $см^3$ физиологического раствора.

Перед постановкой реакции связывания комплемента подготавливают следующие компоненты реакции:

- испытуемая сыворотка крови лошадей;
- сыворотка сапная для РСК(позитивная сыворотка);
- сыворотка крови лошадей неспецифическая неконсервированная (негативная сыворотка);
- сыворотка гемолитическая для РСК;
- комплемент сухой для РСК;
- физиологический раствор;
- 2,5 %-ная взвесь эритроцитов барана в физиологическом растворе.

10.2 Титрование гемолитической сыворотки (гемолизина).

Титрование гемолизина проводят при использовании каждой новой серии и в дальнейшем ежегодно.

Из основного разведения гемолизина 1:100 (0,1 $см^3$ гемолизина и 9,9 $см^3$ физиологического раствора) готовят последующие разведения.

Таблица №1 Схема разведения гемолизина

Основное разведение гемолизина 1:100, $см^3$	Физиологический раствор, $см^3$	Полученное разведение гемолизина
0,2	0,8	1:500
0,1	0,9	1:1000

0.1	1,4	1:1500
0,1	1,9	1:2000
0,1	2,4	1:2500
0,9	2,9	1:3000

Затем по 0,2 $см^3$ каждого разведения переносят в пробирки, в каждую пробирку добавляют но 0,2 $см^3$ комплемента в разведении 1:20, 0,2 $см^3$ 2,5 %-иой взвеси эритроцитов и 0,4 $см^3$ физиологического раствора. Штатив с пробирками встряхивают и помещают в водяную баню на 10 мин при температуре 37 °С - 38 °С.

Титром гемолизина считают наибольшее его разведение, при котором наблюдается полный гемолиз эритроцитов.

10.3 Приготовление гемолитической системы.

Гемолитическую систему готовят смешиванием в равных объемах 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана в физиологическом растворе и раствора гемолитической сыворотки, взятой в удвоенном титре (например, при титре гемолизина 1:1000 берут 2:1000, т.е. для приготовления 100 $см^3$ гемолизина берут 0,2 $см^3$ гемолизина из ампулы и разводят в 99,8 $см^3$ физиологического раствора). Полученные 100 $см^3$ раствора гемолизина приливают при постоянном помешивании к 100 $см^3$ взвеси эритроцитов. Гемолитическую систему помещают в водяную баню при температуре 37 °С - 38 °С на 20 минут для сенсибилизации эритроцитов.

10.4 Титрование комплемента.

Титрование комплемента проводят перед каждой постановкой реакции. Отбирают необходимое для данного объема исследований количество ампул (флаконов) с комплементом (из расчета 1 ампула или флакон на 100 пробирок реакции), растворяют препарат в физиологическом растворе, количество которого указано на ампуле (флаконе), сливают в одну емкость и перемешивают. Таким образом получают основной раствор комплемента, который хранят в холодильнике на протяжении постановки реакции. Из этого раствора готовят разведение 1:20 для титрования.

Комплемент титруют в бактериолитической системе, для чего позитивную, негативную и 1-2 сыворотки из опыта разводят физиологическим раствором 1:10, инактивируют при температуре 60 °С - 62 °С в течение 30 минут и разливают по 0,2 $см^3$ каждую в два ряда пробирок.

Внесение остальных ингредиентов и условия титрования показаны в таблице 2 на примере негативной сыворотки, при этом во вторые ряды сывороток вместо антигена вносят 0,2 $см^3$ физиологического раствора.

При работе с аппаратом Флоринского для разведения комплемента берут дополнительный ряд пробирок, в которых делают те же разведения комплемента, но объем увеличивают в 10 раз. Затем разливателем Флоринского переносят по 0,2 $см^3$ разведенного комплемента во все пробирки каждого ряда и вносят остальные ингредиенты, как указано в таблице 2.

Титром комплемента в бактериолитической системе считают минимальное количество его, необходимое для полного гемолиза эритроцитов барана в пробирках с негативной сывороткой и сыворотками из опыта с антигеном и без антигена, а также в пробирках с сапной сывороткой без антигена при полной задержке гемолиза в пробирках с сапной сывороткой и антигеном.

Таблица 2. Схема титрования комплемента в бактериолитической системе (по первому ряду пробирок)

Компоненты реакции	Номера пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Негативная сыворотка в разведении 1:1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген в рабочем разведении	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент 1:20	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2

Физиологический раствор	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	-
Водяная баня 20 минут при 37 °С - 38 °С										
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 20 минут при 37 °С - 38 °С										
Примерный результат	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
Дополнительный ряд пробирок для предварительного разведения комплемента										
Комплемент 1:20	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Физиологический раствор	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	-

10.5 Приготовление комплемента.

Количество комплемента для главного опыта определяют по формуле:

$$X = T \times П/20,$$

где X – количество комплемента, необходимое для главного опыта;

Т — титр комплемента в бактериологической системе;

П — количество пробирок в реакции;

20 — кратность разведения комплемента при титровании.

Например, в опыте 200 пробирок, титр комплемента (по табл. 2) — 0,1. Следовательно, количество его для проведения опыта:

$$0,1 \times 200/20 = 1,0 \text{ см}^3$$

Необходимое количество разведенного комплемента для главного опыта равно 40 $см^3$ (т.е. 0,2 $см^3 \times 200$). Следовательно, к 1,0 $см^3$ основного раствора комплемента добавляют 39,0 $см^3$ физиологического раствора.

10.6 Постановка главного опыта.

Каждую сыворотку крови, предварительно инактивированную, как указано в п. 10.4, исследуют в трех пробирках: без антигена в разведении 1:5 (контроль сыворотки) и с антигеном в разведениях 1:5 и 1:10.

Для этого в первую и третью пробирку разливают физиологический раствор в количестве 0,4 $см^3$ и 0,1 $см^3$ соответственно. Затем в первую вносят 0,1 $см^3$ испытуемой сыворотки, смешивают и переносят 0,2 $см^3$ во вторую и 0,1 $см^3$ — в третью пробирки.

В опытные пробирки вносят по 0,2 $см^3$ сапного антигена в рабочем разведении, в контрольные — по 0,2 $см^3$ физиологического раствора, во все пробирки — по 0,2 $см^3$ комплемента в установленном титре. Штативы встряхивают и помещают в водяную баню на 20 мин при температуре 37 °С - 38 °С.

Затем во все пробирки вносят по 0,4 $см^3$ гемолитической системы, встряхивают и вновь помещают в водяную баню на 20 мин при температуре 37 °С - 38 °С.

Одновременно ставят следующие контроля:

- позитивная и негативная сыворотки в тех же разведениях, что и испытуемые с антигеном и без антигена;
- антиген без сыворотки (на антикомплементарность);
- антиген без сыворотки и комплемента (на гемотоксичность);

гемсистема с физраствором.

При массовых исследованиях допускается постановка реакции в одной пробирке с разведением сыворотки 1:10 (0,02 $см^3$ сыворотки и 0,18 $см^3$ физиологического раствора). При работе с аппаратом Флоринского к 0,2 $см^3$ физиологического раствора. Сыворотки с задержкой гемолиза исследуют повторно, как указано выше.

10.7 Учет результатов реакции проводят дважды: непосредственно после последнего прогревания пробирок в водяной бане и на следующие сутки после хранения пробирок при температуре от 4 °С до 8 °С.

Сначала учитывают результаты контролей. Если в пробирках с позитивной сывороткой и антигеном, с антигеном без сыворотки и комплемента, с гемолитической системой и физиологическим раствором будет полная задержка гемолиза, а в пробирках с негативной сывороткой и антигеном, с сапной и негативной сыворотками без антигена и с антигеном без сыворотки – полный гемолиз, постановку реакции считают правильной, и проводят учет результатов.

Реакцию учитывают по степени задержки гемолиза эритроцитов, которую определяют по шкале, приготовленной перед учетом реакции. Для этого содержимое трех-пяти пробирок с полным гемолизом сливают в одну, затем гемолизированную жидкость и физиологический раствор разливают в пробирки по следующей схеме:

Таблица 3

Комплементы	Номера пробирок				
	1	2	3	4	5
Гемолизированная жидкость ($см^3$)	1,0	0,75	0,5	0,25	-
Физиологический раствор ($см^3$)	-	0,25	0,5	0,75	1,0
Процент гемолиза	100	75	50	25	0

В соответствии с этой шкалой устанавливают степень задержки гемолиза эритроцитов в каждой пробирке.

10.8 Реакцию оценивают в крестах в зависимости от процента гемолизированных эритроцитов:

++++ (4 креста) – полное отсутствие гемолиза;

+++ (3 креста) – гемолиз 25% эритроцитов;

++ (2 креста) – гемолиз 50% эритроцитов;

+ (1 крест) – гемолиз 75% эритроцитов;

- (минус) – полный гемолиз.

10.9 Диагностическим титром сыворотки считают разведение ее 1:10. При задержке гемолиза эритроцитов в этом разведении сыворотки на ++++ и +++ реакцию считают положительной независимо от результатов реакции с сывороткой в разведении 1:5. При задержке на ++ и + реакцию считают сомнительной, если задержка гемолиза в разведении сыворотки 1:5 соответствует ++++ или +++.

Во всех других случаях реакцию считают отрицательной.

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

12. Особенностей проявления реакций при соблюдении техники ее постановки не установлено.

13. Следует избегать нарушений схемы проведения реакции связывания комплемента и учета реакции, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.

14. Постановка реакции связывания комплемента происходит «in vitro» на организм животных влияния не оказывает.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

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

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

17. При попадании антигена на кожу и/или слизистые оболочки их рекомендуется промыть водопроводной водой.

18. Организация-производитель – Федеральное казенное предприятие «Курская биофабрика – фирма «БИОК» (305004, Россия, г. Курск, ул. Разина, 5).

Инструкция по применению антигена сапного для реакции связывания комплемента разработана специалистами ФКП "Курская биофабрика", 305004, г. Курск, ул. Разина, 5. и ФГУ «ВГНКИ», 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5.

Рекомендовано к применению в Российской Федерации ФГУ "ВГНКИ"