УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Агровет»

Д.А. Девришов

«19» 01 2021 г.

# ИНСТРУКЦИЯ

по применению набор для серологической диагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).
(Организация-разработчик - ООО «Агровет», 109472 г. Москва, ул. Ташкентская д.34, корп. 5).

**Описание**

Действующим началом диагностикума является антиген аденовируса сенсибилизированный в 3% суспензии эритроцитов.

**Форма выпуска**

Диагностический набор выпускается в жидком виде.

**Состав**

В состав диагностического набора входят следующие компоненты:

- специфический эритроцитарный аденовирусный антиген – 1 флакон в объеме 13,0 $см^3$;
- контрольный эритроцитарный антиген – 1 флакон в объеме 13,0 $см^3$;
- специфическая гипериммунная сыворотка - 1 флакон в объеме 1,0 $см^3$;
- контрольная сыворотка – 1 флакон в объеме 1,0 $см^3$;
- сыворотка для разбавителя – 1 флакон 2,0 $см^3$

**Показания для применения**

Набор предназначен для выявления антител к аденовирусноййинфекции крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации.

**Способ применения**

В качестве анализируемых образцов используют образцы сыворотки крови от больных и переболевших животных в начале заболевания и через 3-4 недели.

Для проведения исследований направляют не менее 15-20 проб сывороток.
Сыворотки хранят в условиях, предотвращающих бактериальный пророст при температуре от 2 до 8° С не более 15 дней.

Для более длительного хранения (до 2 месяцев) возможно добавление борной кислоты в качестве консерванта (2-3 кристаллика на 1,0$см^3$ сыворотки). Диагностическая гипериммунная сыворотка после растворения может храниться при температуре 2 – 8 $^oC$ в

пробирке под резиновой пробкой до 10 дней. Допускается хранение сывороток при минус 20°С в течение месяца, перед исследованием их размораживают при комнатной температуре.

Парные сыворотки должны исследоваться одномоментно (независимо от результатов первого исследования), для этого первая сыворотка до исследования должна храниться в замороженном виде.

Образцы сывороток с выраженным гемолизом, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания или повторно замораживаемых не допускается

**Маркировка компонентов**

На флаконы с компонентами наклеивают этикетки с указанием: наименование организация-производителя; ее адрес и товарный знак; наименование компонента; объем во флаконе, номер серии, дата выпуска; рабочее разведения компонента; срок годности; обозначения СТО.

Флаконы согласно комплектации, упаковывают в картонные коробки по ГОСТ 33781 или пластиковые (полистироловые) контейнеры с разделительными перегородками, обеспечивающими их неподвижность и целостность.

В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению диагностического набора.

На каждую упаковку с набором флаконов наклеивают этикетку, на которой должны быть указаны: наименование организации-производителя; ее адрес и товарный знак, телефон, наименование компонентов, количество флаконов в коробке; номер серии; дата выпуска (месяц, год), срок годности (месяц, год), количество определений; условия хранения, обозначение СТО.

Один комплект рассчитан на 100 определений исследуемых проб микрометодом в РНГА, включая контроли.

Срок годности набора 6 месяцев с даты выпуска при условии хранения в темном месте при температуре от 2 до 8 °С. Не допускается замораживание набора.

**Подготовка компонентов и растворов для РНГА**

Для проведения РНГА необходимо провести следующие подготовительные работы:

- приготовить 0,15 М раствор с pH7,2-7,4;
- приготовить разбавитель;
- получить исследуемую сыворотку.

Для приготовления 0,15 М раствор с pH 7,2-7,4 в мерную колбу 1,0 л вносят 20,4 г химически чистого безводного однозамещенного фосфорнокислого калия, в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят водой до метки 1.0 литр (раствор А). В другую мерную колбу на 1,0 литр вносят 26,7 г химически чистого двузамещенного фосфорнокислого натрия-двуводного, растворяют в небольшом количестве воды и доводят

до метки 1.0 литр (раствор Б). Растворы А и Б можно хранить при температуре 2 - 8 °С в течение месяца. Для приготовления буфера к 24,0 $см^3$ раствора А добавляют 76,0 $см^3$ раствора Б и вносят 0,85 г химически чистого хлористого натрия. С помощью рН-метра проверяют рН буфера и при необходимости доводят до рН 7,2-7,4 растворами А или Б.

Для приготовления разбавителя к 100 $см^3$ буфера добавляют 1,0 $см^3$ нормальной сыворотки крови кролика. Для этого флакон с сывороткой встряхивают и содержимое флакона переносят в буфер. Затем разбавитель прогревают при температуре 65-66 °С в течение 40 минут, дают остыть при комнатной температуре, добавляют 0,3 $см^3$ формалина и фильтруют через бумажный фильтр. Хранят разбавитель при комнатной температуре в течение месяца. При появлении мути на дне сосуда с разбавителем его снова фильтруют. Мутный разбавитель не используют.

Для проведения диагностических исследований сыворотку разводят 1:2 дистиллированной водой переносят в стерильную пробирку и прогревают 30 минут при температуре 55 - 57°С.

Флакон с эритроцитарным антигеном тщательно встряхивают до полной гомогенизации содержимого, стерильно отбирают 1,0 $см^3$ и переносят во флакон с 2,0 $см^3$разбавителя (0,15М фосфатно-буферный физиологический раствор рН 7,2-7,4, с добавлением нормальной сыворотки кролика в количестве 1% от объема буфера).

**Выполнение анализа (РНГА).**

Реакцию непрямой гемагглютинации ставят микрометодом с использованием полистироловых микропланшет с U-образными лунками для иммунологических реакций однократного применения.

В лунку микропанели вносят по 0,05 $см^3$разбавителя. В первые лунки каждого ряда вносят исследуемые сыворотки в количестве 0,05 $см^3$. На каждую исследуемую сыворотку необходимо два ряда лунок. Последующими переносами получают двукратные разведения сывороток от 1:2 до 1:4096. Затем в первый ряд лунок вносят по 0,025 $см^3$ 1%-ной взвеси специфического эритроцитарного антигена аденовирусной инфекции, а во второй ряд по 0,025 $см^3$ 1%-ной взвеси контрольного эритроцитарного антигена. Панель встряхивают, закрывают специальной крышкой и на 2-3 часа оставляют при комнатной температуре.

Реакцию сопровождают следующими контролями:

а) контроль на отсутствие спонтанной агглютинации специфического и контрольного эритроцитарного антигенов.

В два ряда лунок вносят по 0,05 $см^3$ разбавителя, затем в первый ряд лунок вносят по 0,025 $см^3$ 1%-ной взвеси специфического эритроцитарного антигена аденвируса, а во второй ряд по 0,025 $см^3$ 1%-ной взвеси контрольного эритроцитарного антигена;

б) контроль на отсутствие агглютинации специфического эритроцитарного антигена аденовирусаи контрольного эритроцитарного антигена с отрицательной сывороткой крупного рогатого скота.

В два ряда лунок микропанели вносят по 0,05 см$^3$ разбавителя, в первые лунки вносят по 0,05 см$^3$ отрицательной сыворотки крупного рогатого скота и титруют. Затем в первый ряд вносят по 0,025 см$^3$ 1%-ной взвеси специфического эритроцитарного антигена аденовируса, а во второй ряд по 0,025 см$^3$ 1%-ной взвеси контрольного эритроцитарного антигена;

в) контроль на активность специфического эритроцитарного антигена аденовируса со специфической сывороткой крупного рогатого скота. В ряд лунок микро панели вносят по 0,05 см$^3$ разбавителя, в первую лунку вносят 0,05 см$^3$ специфической сыворотки и титруют, как исследуемые сыворотки, затем вносят по 0,025 см$^3$ 1%-ной взвеси специфического эритроцитарного антигена аденовируса;

г) контроль специфической сыворотки на наличие антител к контрольному эритроцитарному антигену. В ряд лунок микро панели вносят по 0,05 см$^3$ специфической к антигену аденовируса сыворотки и титруют, затем вносят по 0,025 мл 1%-ной взвеси контрольного эритроцитарного антигена

**Учет реакции и интерпретация результатов**

Учет результатов реакции проводят через 2-3 часа при комнатной температуре, определяя наличие или отсутствие агглютинации эритроцитов.

Реакцию считают положительной (оценивают на «+», если аглютинировавшие эритроциты равномерно выстилают дно лунки, образуя форму перевернутого «зонтика»

Реакцию считают отрицательной (оценивают «-» при оседании эритроцитов на дно лунки в виде диска или компактного кольца с четким ровным краем.

Примечание. В первых лунках планшета может наблюдаться «феномен» сползания агглютинированных эритроцитов с образованием по краю лунки кольца с неровным краем (эффект «свертывания зонтика»).

За титр антител в РНГА принимают наивысшее разведение сыворотки, дающую четкую агглютинацию – равномерная агглютинация эритроцитов «зонтик» по всей лунке.

Учёт реакции проводят только при условии четких результатов, полученных в контролях.

Контроли реакции:

- в контрольных лунках на спонтанную агглютинацию эритроциты должны осесть в виде точки или плотного кольца.

- титр отрицательной сыворотки со специфическим к аденовирусу эритроцитарным антигеном и с контрольным антигеном не должен превышать 1:8.

Титр антител специфической сыворотки со специфическим к аденовирусу эритроцитарным антигеном должен быть не ниже 1:128, а с контрольным эритроцнтарным антигеном не выше 1:8.

Результаты РНГА с испытуемыми сыворотками оценивают по титру антител.Положительным результатом, считают сыворотки, дающие со специфическим к аденовирусу эритроцитаным антигеном титр 1:16 и выше.

При наличии в испытуемых сыворотках антител с контрольным эритроцитарным антигеном в титрах более 1:8, положительными считают сыворотки, которые со специфическим к аденовирусу эритроцитарным антигеном дали титры в 4 и более раз выше контроля (например: в контроле1:32, то в исследуемой сыворотке должен быть не ниже 1:512).

Диагностика острой аденовирусной инфекции и дифференциация вакцинных антител. Увеличение титров в парных сыворотках в 4 раза и выше, свидетельствует о наличии инфекции.

**Порядок предъявления рекламации**

В случае несоответствия диагностического набора требованиям, указанным в настоящей инструкции, а также его неэффективности, применение данной серии препарата прекращают. Контроль набора диагностического, поступающей по рекламациям проводит организация-производитель.

**Меры предосторожности при применении**

При проведении исследований необходимо:

- работать в боксированных помещениях для проведения микробиологических исследований с применением индивидуальных средств защиты (защитной одежды и одноразовых резиновых перчаток);

- следует избегать контакта компонентов с кожей и слизистыми, а при попадании на них незамедлительно промыть большим количеством воды;

- не пипетировать ртом;

- в случае пролива образцов и рабочих растворов на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекционную обработку с использованиемдезинфицирующих средств, эффективность которых подтверждена в отношении используемого в работе возбудителя;

- инструменты и оборудование (до и после работы) подвергать обработке с использованием 70 % этилового спирта или дезинфицирующих средств, эффективность которых подтверждена в отношении используемого в работе возбудителя;

- остатки испытуемых сывороток, полистироловые планшеты после учета результатов обеззараживают путем погружения в 3% раствор хлорамина на 5 часов или автоклавирования при 0,5 атм. в течение 30 минут.

- остатки диагностикума и акреолизированных эритроциты барана не требуют особых условий утилизации и могут быть вылиты в канализацию.

Инструкция по применению набора для серологической диагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) разработана ООО «Агровет»
(109472 Москва, ул. Ташкентская д.34, корп.5).