УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Агровет»

Д.А. Девришов

«19» 01 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для серологической диагностики вирусной диареи 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 вируса диареи сенсибилизированный в 3% суспензии эритроцитов,

Форма выпуска

Диагностический набор выпускается в жидком виде.

Состав

В состав диагоностического набора входят следующие компоненты:

- специфический эритроцитарный антиген вируса диарей – 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 в объеме 2,0 см^3

Показания для применения

Набор предназначен для выявления антител к вирусу диареи 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 см^3 сыворотки). Диагностическая гипериммунная сыворотка после растворения может храниться при температуре 2 – 8 °С 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

Все исследуемые образцы должны быть идентифицированы (промаркированы).

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 микрометодомв 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 рН7,2-7,4;
- приготовить разбавитель;
- получить исследуемую сыворотку

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

натрия-двуводного, растворяют в небольшом количестве воды и доводят до метки 1 литр (раствор Б).

Растворы А и Б можно хранить при температуре 2 - 8 °С в течение месяца. Для приготовления буфера к 24 $см^3$ раствора А добавляют 76 $см^3$ раствора Б и вносят 0,85 г химически чистого хлористого натрия. С помощью pH-метра проверяют pH буфера и при необходимости доводят до pH 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 флаконапереносят 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 исследуемую сыворотку крови разводят 1:4 дистиллированной водой переносят в стерильную пробирку и прогревают 30 минут при температуре 55 - 57 ^oC.

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 pH 7,2-7,4, с добавлением нормальной сыворотки кролика в количестве 1% от объема буфера).

Выполнение анализа (РНГА)

Реакцию непрямой гемагглютинации проводят микро методом в полистироловых планшетах с U-образными лунками для иммунологических реакций однократного применения.

В лунку микро панели 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 вируса диареи, 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 вируса диареи, а во второй ряд по 0,025 $см^3$ 1%-ной взвеси контрольного эритроцитарного антигена;

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

В два ряда лунок микро панели 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 вируса диареи, а во второй ряд по 0,025 $см^3$ 1%-ной взвеси контрольного эритроцитарного антигена;

в) контроль на активность специфического эритроцитарного антигена вируса диареи 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 вируса диареи;

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

Регистрация и учет результатов

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

Реакцию считают положительной (оценивают на «+»), если агглютинировавшие эритроциты выстилают дно лунки, образуя форму перевернутого«зонтика».

Реакцию считают отрицательной (оценивают на «-») 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, дающее 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 ВД эритроцнтарным антигеном и с контрольным антигеном не должен превышать 1:8.

- титр антител специфической сыворотки со специфическим ВД 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 вирусу диареи эритроцитарным антигеном титр 1:16 и выше.

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

Диагностика острой вирусной 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 вирусной диареи крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) разработана ООО «Агровет»
(109472 Москва, ул. Ташкентская д.34, кор.5).