УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор ООО
«Агровет»

Д.А. Девришов

«19» 01 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

По применению набора для серологической диагностики респираторно синцитиальной инфекции крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

(Организация-разработчик - ООО «Агровет», 109472 г. Москва, ул. Ташкентская д.34, корп. 5).

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Наименование диагностического набора.

Набор эритроцитарный для серологической диагностики респираторно синцитиальной инфекции крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинаиии (РНГА).

1.2. Диагностикум выпускается в наборе:

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

1.3. По внешнему виду эритроцитарные антигены представляют собой прозрачную надосадочную жидкость и осадком эритроцитов коричневого или бурого цвета. После осторожного встряхивания получается гомогенная взвесь коричневого цвета.

Специфическая и отрицательная сыворотки крови крупного рогатого скота и сыворотка крови кролика для разбавителя по внешнему виду представляют собой опалесцирующую жидкость соломенно-желтого цвета без признаков гемолиза.

1.4. 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; «Для ветеринарного применения».

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 диагностикума.

1.5. На каждую коробку с флаконами 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; надписи: «Для ветеринарного применения.

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

Срок годности набора 9 месяцев с даты выпуска при условии хранения в темном месте при температуре от 2 до 8 °С. Не допускается замораживание набора.

2. Порядок применения

2.1. Набор предназначен для выявления специфических антител к вирусу респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации, которую проводят микрометодом в полистироловых планшетах для иммунологических реакций однократного применения.

2.2. Для проведения исследований в лабораторию направляют не менее 15-20 проб сывороток крови от больных и переболевших животных в начале заболевания и через 3-4 недели.Сыворотки хранят при температуре от 2 до 8° С не более недели или при минус 20°С в течение месяца.

Гемолизированные, проросшие или консервированные сыворотки для исследования не пригодны.

2.3. Подготовка к анализу

Для проведения РНГА необходимо провести следующие подготовительные работы

- приготовить 0,15М фосфатно-буферный раствор pH 7,2-7,4;
- приготовить разбавитель

2.3.1 Для приготовления 0,15М фосфатно-буферного физиологического раствора pH 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 л 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. Доводят до pH 7,2-7,4 растворами А или Б.

2.3.2. Для приготовления растворителя к 100 $см^3$ буфера раствора добавляют 1,0 $см^3$ нормальной сыворотки крови кролика. Ампулу с сывороткой встряхивают и содержимое ампулы 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 разбавитель снова фильтруют. Мутный разбавитель не используют. Для проведения диагностических исследований сыворотки крови разводят 1:2 дистилированной водой, переносят в стерильную пробирку и прогревают на водяной бане при температуре 55 – 57 °С 30 минут.

3. Методика постановки реакции

3.1. Постановка контролей

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 респираторно синцитиального эритроцитарного антигена, а во второй ряд по 0,025 мл 1%-ной взвеси контрольного эритроцитарного антигена;

б) контроль на отсутствие агглютинации специфического респираторно синцитиального эритроцитарного антигена и контрольного эритроцитарного антигена 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 РС эритроцитарного антигена, а во второй ряд по 0,025 $см^3$1%-ной взвеси контрольного эритроцитарного антигена;

в) контроль на активность специфического респираторно синцитиального эритроцитарного антигена с специфической сывороткой крупного рогатого скота. В ряд лунок микропанели 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 РС эритроцитарного антигена;

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

3.2. Выполнение анализа.

В лунки микропанели вносят по 0,05 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 РС эритроцитарного антигена, 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.

4. Учет реакции

4.1. За титр антител в РНГА принимают наивысшее разведение сыворотки, дающее четкую агглютинацию (зонт).

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

4.3. Контроли реакции. В контрольных лунках на спонтанную агглютинацию эритроциты должны осесть в виде точки или плотного кольца. Титр отрицательной сыворотки со специфическим РС эритроцитарным антигеном и с контрольным антигеном не должен превышать 1:8. Титр антител специфической сыворотки со специфическим РС эритроцитарным антигеном должен быть не ниже 1:128, а с контрольным эритроцитарным антигеном не выше 1:8.

4.4. Результаты РНГА с испытуемыми сыворотками оценивают по титрам и в зависимости от наличия антител к контрольному эритроцитарному антигену: при наличии в испытуемых сыворотках антител к контрольномуэритроцитарному антигену в титрах не выше 1:8, положительными считают сыворотки, дающие со специфическим к РС эритроцитарным антигеном титры 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 РС эритроцитарным антигеном дали титры в 4 и более раз выше.

Увеличение титров в парных сыворотках в 4 раза и выше, а также увеличение числа, серо позитивных сывороток свидетельствует о наличии инфекции.

5. Утилизация отходов

5.1. 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.

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

6. Порядок предъявления рекламации

6.1. В случае несоответствия диагностического набора требованиям, указанным в настоящей инструкции, а также его неэффективности, применение данной серии препарата прекращают. Контроль диагностического набора, поступающей по рекламациям проводит организация-производитель, а при разногласиях в оценке качества вакцины между производителем и потребителем, контроль проводит центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория. Одновременно с этим в адрес института направляют один невскрытый набор данной серии с сопроводительным письмом.

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