Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения
«Республиканская ветеринарная лаборатория»
Комитета ветеринарного контроля и надзора
Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан

Стандартная операционная процедура «Проведение реакции агглютинации при исследовании сыворотки крови на бруцеллёз животных»

Копия	Код	Номер версии	Разработано	Подпись
166	СОП-РВЛ- РА-003-2026	№5	Отдел методологии и образовательного центра	Руководитель отдела _____ Байсеитов С.Т. Эксперт _____ Базаров Е.Р.
Ответственные за исполнение		Заведующие лабораториями, ветеринарные врачи и лаборанты областных/региональных и районных/зональных ветеринарных лабораторий, осуществляющие проведение исследований на бруцеллёз животных методом реакции агглютинации (далее – РА).		
Дата введения		01.06.2026	**Дата пересмотра**	

Принял в работу:

Наименование обл/регионального филиала_____

Наименование отдела/районной вет. лаборатории_____

_____ _____/_____
ФИО *должность* *подпись*

_____ _____/_____
ФИО *должность* *подпись*

Астана, 2026 г

1. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1 Настоящая Стандартная операционная процедура (далее – СОП) разработана на основании ГОСТ 34105-2023 «Лабораторная диагностика бруцеллеза. Серологические методы».

1.2 Процедура устанавливает порядок проведения РА для диагностики бруцеллёза у крупного рогатого скота (далее - КРС), мелкого рогатого скота (далее – МРС) лошадей, буйволов, верблюдов, оленей (маралов), собак, пушных зверей и морских свинок.

1.3 Метод основан на агглютинации (склеивания) корпускулярных антигенов (убитых культур бруцелл в S- или R-форме) под действием соответствующих им специфических антител (агглютининов), присутствующих в сыворотке крови больного или вакцинированного животного.

1.4 Термины и определения

- Антиген - антиген единый бруцеллезный, представляющий собой гомогенную взвесь инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл в физиологическом растворе;
- Позитивная сыворотка (S#) - заведомо положительная сыворотка, содержащую антитела к бруцеллам, используемая для подтверждения чувствительности и активности антигена, а также правильность постановки реакции;
- Негативная сыворотка (S=) - заведомо отрицательная сыворотка, не содержащую антител к возбудителю бруцеллеза, применяемая для подтверждения специфичности антигена и исключения ложноположительных результатов, а также правильность постановки реакции;

2. ТРЕБОВАНИЯ К БЕЗОПАСНОСТИ

2.1 Работа проводится с соблюдением требований Закона РК «О биологической безопасности» и правил работы с ПБА II группы патогенности.

2.2 Все манипуляции с сыворотками проводятся в защитной одежде (халат, перчатки, маска, чепчик).

2.3 Биологические отходы и отработанные материалы подлежат обязательной дезинфекции и утилизации.

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

3.1 Компоненты, применяемые при постановке РА:

- Испытуемая сыворотка;
- Антиген бруцеллезный единый для РА;
- Позитивная (**S#**) и негативная(**S=**) контрольные сыворотки;
- 0,85 %-ый фенолизированный физиологический раствор с содержанием 0,5% фенола;

3.2 Оборудование и вспомогательные средства:

- Термостат суховоздушный;
- Дозаторы переменного объема от 10 мкл до 1000 мкл;
- Наконечники;
- Пробирки Флоринского;
- pH-метр;
- Штативы;
- Спирт этиловый 70%;

- Вата медицинская;
- Фильтровальная бумага;
- Дезинфицирующие средства;
- Маркер и карандаш для маркировки;

4. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

4.1 Подготовка:

1. Температура в помещении: +22 ± 4°С.
2. Выдержать Антиген при комнатной температуре 30–40 минут.
3. Антиген аккуратно встряхнуть до однородности.
4. Для разведения сывороток готовят фенолизированный раствор хлорида натрия с содержанием фенола 0,5%. Концентрация хлорида натрия зависит от вида животных:
   - 0,85% для КРС, лошадей, верблюдов и собак (R-антиген);
   - 5% для овец, коз и собак (S-антиген);
   - 10% для оленей (маралов).
5. При необходимости уровень pH довести до 7,0-7,2.

5. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1 Контроли ставят аналогично классическому методу в четырех разведениях.

5.2 Негативной контроль - в аналогичных разведениях, позитивный контроль - до предельного титра.

5.3 Классический метод (в четырех разведениях):

1. Готовят ряд из 5 пробирок (1 ряд - контроль сыворотки, без антигена).
2. Антиген разводят фенолизированным раствором хлорида натрия в соотношении 1:10.
3. В пробирках первого ряда готовят основное разведение:
   - **КРС, лошади, верблюды:** 0,1 мл сыворотки + 2,4 мл фенолизированный 0,85% физиологический раствор (разведение 1:25).
   - **Овцы, козы, собаки:** 0,2 мл сыворотки + 2,3 мл фенолизированный 5% физиологический раствор (разведение 1:12,5).
   - **Олени:** 0,2 мл сыворотки + 2,3 мл фенолизированный 10% физиологический раствор (разведение 1:12,5).
   - **Пушные звери, морские свинки:** 0,3 мл сыворотки + 1,2 мл фенолизированный 10% физиологический раствор (разведение 1:5).
   - **Собаки с *R*-бруцелезным антигеном (*B.canis*):** 0,1 мл сыворотки + 2,4 мл фенолизированный 0,85% физиологический раствор (разведение 1:25).
4. В пробирки 3, 4 и 5 рядов вносят по 0,5 мл фенализированный физиологический раствор.
5. Приготовление последовательных разведений:
   - Из 1-й пробирки переносят 0,5 мл во 2-ю пробирку. Тщательно перемешивают.
   - Из 1-й пробирки переносят 0,5 мл в 3-ю пробирку. Тщательно перемешивают.
   - Из 3-й пробирки переносят 0,5 мл в 4-ю пробирку. Тщательно перемешивают.
   - Из 4-й пробирки переносят 0,5 мл в 5-ю пробирку. Тщательно перемешивают.
   - Из 5-й пробирки 0,5 мл удаляют в дезраствор.

6. В пробирки 2, 3, 4 и 5 рядов вносят по 0,5 мл разведенного (1:10) антигена. Пробирки первого ряда служат контролем сыворотки (без антигена).

7. Инкубация: штативы встряхивают и помещают в термостат +37...+38°С на 16-20 часов.

5.4 Массовый метод (в двух разведениях):

1. Антиген разводят соответствующим фенолизированным физиологический раствор (п. 4.1.4) в соотношении 1:20.
2. В две пробирки вносят неразведенную испытуемую сыворотку:
- **КРС, лошади, верблюды:** 0,02 мл и 0,01 мл соответственно.
- **Мрс, олени, собаки:** 0,04 мл и 0,02 мл соответственно.
3. В каждую пробирку добавляют по 1 мл разведенного антигена (1:20).
4. Инкубация: штативы встряхивают и помещают в термостат +37...+38°С на 16-20 часов.

6. КОНТРОЛИ КАЧЕСТВА

6.1 Для каждой партии проб одновременно ставят контроли.

6.2 Для объективной оценки готовят *стандарты мутности*:

1. *Приготовление рабочего разведения:* Готовят разведение антигена 1:10, смешивая 0,5 мл антигена и 4,5 мл фенолизированного физиологического раствора.
2. *Подготовка первого ряда:* В четыре пробирки первого ряда последовательно вносят разведенный антиген (1:10) в объемах: **2 мл; 1,5 мл; 1,0 мл и 0,5 мл**;
3. Начиная со второй пробирки вносят фенолизированный физиологический раствор в объемах: **0,5 мл; 1,0 мл; 1,5 мл** соответственно. Общий объем в каждой пробирке должен составлять 2,0 мл.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешивают.
5. *Подготовка контрольного ряда:* Из каждой пробирки первого ряда переносят по 1,0 мл соответствующей смеси во второй ряд.
6. *Соответствие степени агглютинации:* Полученные разведения соответствуют:
- 1-я пробирка - 0% агглютинации (мутность 100%);
- 2-я пробирка - 25% агглютинации (мутность 75%);
- 3-я пробирка - 50% агглютинации (мутность 50%);
- 4-я пробирка - 75% агглютинации (мутность 25%);
7. *Инкубация:* Штативы со стандартами выдерживают в термостате одновременно с основной реакцией.

6.3 При наличии хлопьев или посторонних примесей в пробирке контроля сыворотки (первый ряд классического метода), результаты не учитывают.

7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

7.1 Перед учетом результатов штативы выдерживают при комнатной температуре в течение 60 минут.

7.2 Результаты учитывают визуально – по степени просветления (Рисунок 1.) жидкости и виду осадка до и после лёгкого встряхивания. Оценку выражают в крестах согласно Таблице 1.

Таблица 1. Степень просветления жидкости

Оценка	Просветление	Вид осадка («зонтика»)	После встряхивания	% агглютинации
++++	Полное	Четкий «зонтик»	Крупные хлопья, жидкость прозрачная	**100%**
+++	Неполное	Хорошо выражен	Наличие хлопьев и комочков	**75%**
++	Частичное	Умеренно выражен	Мелкие хлопья в мутноватой среде	**50%**
+	Едва заметное	Слабо выражен	Незначительное количество хлопьев	**25%**
–	Отсутствует	Осадок в виде точки	Равномерная муть (эффект «косички»)	**0%**

7.2 Титр антител – последнее разведение сыворотки, в котором агглютинация составляет не менее ++ (50%). Титр выражается в МЕ/мл (например, реакция КРС на разведении 1:200 при оценке ++ и выше = 200 МЕ – положительный результат).

7.3 Оценка результатов:

Таблица 2. Интерпретация результатов РА на бруцеллез

Вид животного	Статус хозяйства	Группа животных	Положительно (МЕ)	Сомнительно (МЕ)
КРС, лошади, верблюды	Благополучное	Все	**200** и выше	**до 100**
	Неблагополучное	Все	**100** и выше	**50**
МРС (овцы, козы)	Благополучное	Невакцинированные	**100** и выше	**до 50**
	Благополучное	Вакцинированные	**200** и выше	**до 100**
	Неблагополучное	Все	**50** и выше	**25**
Олени	Благополучное	Невакцинированные	**50** и выше	**25**
	Благополучное	Вакцинированные	**100** и выше	**до 50**
	Неблагополучное	Все	**50** и выше	**25**
Собаки	Любое	S-антиген	**50** и выше	**25**
	Любое	R-антиген	**1:100 (++ и выше)**	**1:50 (++++)**
Пушные звери, мор. свинки	Любое	Все	**10** и выше	–

1. Положительная реакция (++ и выше): животное считается реагирующим на бруцеллёз. Пороговые значения в МЕ по видам и статусу хозяйства – см. Таблицу 2.

2. Сомнительная реакция (++ и выше, ниже диагностического порога): животное подлежит повторному исследованию через 15–20 дней. Пороговые значения по видам – см. Таблицу 2.

7.4 При исследовании в двух разведениях, все сыворотки, показавшие реакцию на 2 креста (++) и более в любом разведении, подлежат обязательному повторному испытанию классическим методом (в 4 разведениях).

8. ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ДАННЫХ

8.1 Результаты исследования фиксируются в рабочем журнале, описи отбора проб, журнале серологических исследований № 10-вет и в ИС VetLab. Расходы компонентов фиксируются в журнале титрации и в АС SimBase.

8.2 После регистрации результатов составляется Протокол испытания, который подписывается Ветеринарным врачом и Заведующим лабораторией.

9. ПЕРЕСМОТР, ВНЕСЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ, ХРАНЕНИЕ И РАССЫЛКА НАСТОЯЩЕГО СОП

10.1. Пересмотр, внесение изменений, хранение и рассылка настоящего СОП «Проведение реакции связывания комплемента при исследовании сыворотки крови на бруцеллез животных» осуществляются в соответствии с требованиями системы менеджмента качества.

10.2. Оригинал настоящего СОП регистрируется и хранится в отделе методологии и образовательного центра.

10.3. Учтенные копии настоящего СОП рассылаются заведующим ЛДЗЖ областных/региональных, районных/зональных филиалов, ветеринарным врачам и лаборантам, непосредственно выполняющим постановку РБП.

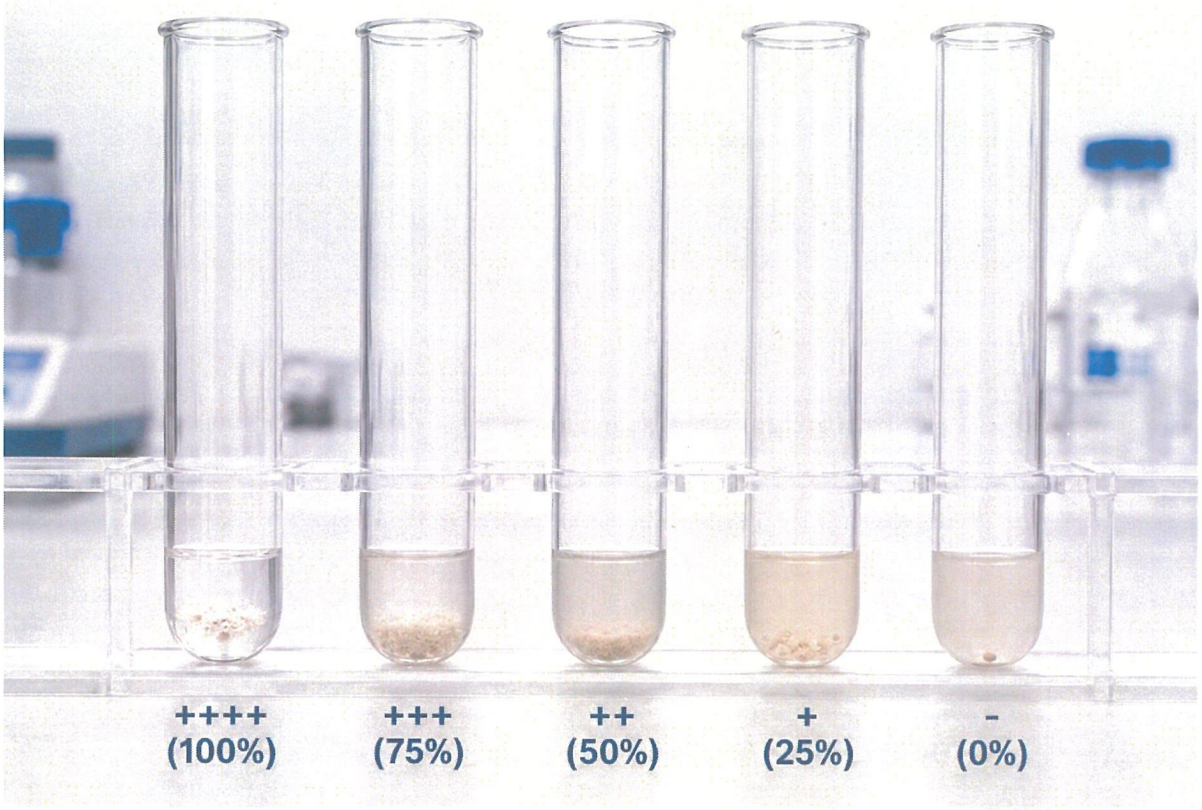


Рисунок 1. Степень просветления жидкости

Приложение 1. Этапы процесса РА и анализ возможных ошибок

Этап	Подэтап / Действие	Критические контрольные точки (КТ)	Типичные ошибки и их последствия	Меры предотвращения / Работа над ошибками
1. Преаналитика	1.1 Отбор проб (вне лаборатории)	• Соответствие номера пробирки описи и инвентарному номеру животного. • Отсутствие выраженного гемолиза, признаков замораживания и протухания сыворотки. • Соблюдение температурного режима транспортировки (холодовая цепь +4...+8°C).	• Перепутанные пробирки → ложная идентификация больного или здорового животного. • Гемолизированная или протухшая сыворотка → неспецифические хлопья, затрудняющие читку реакции (ложноположительный или ложноотрицательный результат).	• Строгое соблюдение правил отбора и идентификации проб на местах. • Использование термоконтейнеров с хладагентами при доставке. • Обязательная браковка некачественного материала на этапе приемки.
	1.2 Регистрация и подготовка образцов	• Регистрация в рабочем журнале, описи и ИС VetLab. • Маркировка пробирок/планшетов перед разведением. • Сыворотки для классической РА не инактивируют (исследуют в нативном состоянии).	• Описка при переносе номеров в журнал серологических исследований № 10-вет. • Случайная инактивация сывороток (прогревание) для РА → частичное разрушение термолабильных антител (IgM) → снижение титров и ложноотрицательный результат.	• Сквозной контроль записей («внес один, проверил второй»). • Четкое разделение потоков сывороток: пробы для РА строго изолируются от проб, направляемых на термическую инактивацию для РСК.
	1.3 Подготовка (реагенты/оборудование)	• Выдерживание единого антигена для РА и РСК при комнатной температуре (+22 ± 4°C) в течение 30–40 минут перед использованием. • Проверка pH фенолизированного физраствора (0,85% NaCl на 0,5% феноле, pH 6,8–7,2). • Калибровка и проверка точности дозаторов.	• Использование холодного антигена прямо из холодильника → замедление скорости агглютинации и снижение выраженности реакции. • Нарушение pH или концентрации фенола в физрастворе → спонтанная агрегация антигена (ложный плюс).	• Обязательный предварительный прогрев антигена до комнатной температуры. • Контроль pH физраствора перед каждым циклом исследований. • Плановое техническое обслуживание и калибровка микродозаторов.

2. Аналитика	2.1 Внесение компонентов (Постановка)	• Постановка обязательных контролей для каждой партии (негативная сыворотка S=, позитивная сыворотка S#, контроль антигена с физраствором). • Точное соблюдение геометрии разведений (последовательное титрование от 1:50 до 1:400 или по схеме двух разведений). • Своевременная смена наконечников.	• Ошибки при переносе и титровании объемов физраствора/сыворотки → изменение конечной концентрации антител в пробирке. • Перенос следов сыворотки из предыдущих лунок/пробирок при плохом перемешивании или без смены наконечника (эффект «carry-over»).	• Строгое выполнение схемы серийных разведений. • Тщательное перемешивание смеси на каждом шаге титрования. • Смена наконечников при переходе от одной пробы к другой и при манипуляциях с контролями.
	2.2 Инкубация	• Выдерживание пробирок/планшетов в термостате при температуре +37...+38°C в течение строго заданного времени (16–20 часов).	• Колебания температуры в термостате или сокращение времени инкубации → неполное формирование комплекса антиген-антитело и отсутствие четкого осадка («зонтика»). • Чрезмерное передерживание в термостате → подсыхание реагентов.	• Регулярный мониторинг и фиксация температуры в термостате дважды в день. • Использование таймера для точного контроля экспозиции (не менее 16 и не более 20 часов).
	2.3 Учет реакции (Читка)	• Оценка валидности панели по контрольным пробам: S# - четкий осадок с полным/частичным просветлением; S= - гомогенная муть без хлопьев; контроль антигена - отсутствие самоагглютинации. • Визуальная оценка степени агглютинации в крестах (от «-» до «++++») по зонтичному осадку и степени прозрачности супернатанта.	• Встряхивание пробирок перед читкой → разрушение хрупких агглютинатов (крупные хлопья разбиваются в муть, положительный результат превращается в ложноотрицательный). • Читка при плохом или неотвесно падающем освещении. • Учет результатов при сомнительном поведении контролей.	• Пробирки извлекают из термостата бережно, без резких движений и взбалтывания. • Читка проводится на специальном столике с зеркалом (агглютиноскопе) или с использованием источника направленного рассеянного света. • При невалидных контролях результаты всей партии бракуются.
3.	3.1 Первичная	• Немедленное занесение	• Описка при переносе крестов по	• Двойной контроль записей

Постаналитика	запись результатов	результатов (выраженность в крестах по разведениям) в рабочий журнал, описи и ИС VetLab. ● Определение статуса реакции (положительная, сомнительная, отрицательная) на основе титров и диагностических порогов (в МЕ) для конкретного вида животных. ● Фиксация расхода антигена в журнале титрации и АС SimBase.	разведениям. ● Неверная интерпретация статуса животного (например, игнорирование того, что для МРС сомнительной считается реакция от 50 МЕ, а для КРС пороги иные). ● Использование корректирующих замазок.	вторым лаборантом/врачом. ● Использование Таблицы 2 (диагностические пороги в МЕ) СОП в качестве настольного руководства при интерпретации. ● Исправление ошибок только зачеркиванием с подписью.
	3.2 Оформление акта экспертизы (протокола испытания)	● Формирование протокола испытания в соответствии с требованиями законодательства Республики Казахстан. ● Проверка соответствия инвентарных номеров скота, дат исследований и реквизитов владельца. ● Оформление направления на переисследование через 15–20 дней при получении сомнительного результата.	● Технические ошибки ввода данных, опечатки в идентификационных номерах. ● Отсутствие указания на необходимость повторного исследования сомнительно реагирующих животных.	● Автоматизация выгрузки результатов из ИС VetLab. ● Многоэтапный контроль данных перед верификацией протокола подписями врача и заведующего.
	3.3 Дезинфекция и утилизация	● Сбор и обеззараживание отработанной посуды, планшетов, наконечников и остатков сывороток в соответствии с требованиями к ПБА II группы патогенности.	● Нарушение времени экспозиции или неправильный расчет концентрации дезинфицирующего раствора. ● Вынос биологических отходов без надлежащей обработки.	● Применение валидированных режимов автоклавирования или дезинфекции. ● Строгий учет приготовления рабочих растворов дезсредств в специальном журнале.
4. Архивирование	4.1 Хранение документов	● Архивация оригиналов журналов (рабочего, серологического № 10-вет, расхода антигенов). ● Обеспечение сохранности записей в информационных системах.	● Утеря первичных рабочих листов или сбои в локальной сети без резервных копий данных → невозможность подтверждения прослеживаемости испытаний при	● Ограничение физического доступа к бумажным архивам (хранение в закрывающихся шкафах у ответственного лица). ● Ежедневное автоматическое

			верификационных проверках.	резервное копирование баз данных ИС VetLab и АС SimBase на изолированный сервер организации.

Лист ознакомления

№	ФИО	Должность	Подпись
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			