

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора
Н.А.Власов
«11» сентября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора

для выявления антител к вирусу блютанга иммуноферментным методом
«БЛЮТАНГ-СЕРОТЕСТ»

(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для выявления антител к вирусу блютанга (BTV) иммуноферментным методом «БЛЮТАНГ-СЕРОТЕСТ».

2. В состав набора входят иммуноспецифические и химические компоненты:

1). Планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках антигеном VP7 BTV – 2 штуки;

2). Положительный контроль (K^+), прозрачная жидкость розово-красного цвета, $1,5 \text{ см}^3$ – 1 флакон;

3). Отрицательный контроль (K^-), прозрачная жидкость сине-голубого цвета, $1,5 \text{ см}^3$ – 1 флакон;

4). **Раствор конъюгата** (белок VP7 BTV, меченный пероксидазой хрена), прозрачная жидкость сине-голубого цвета, $22,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон;

5). 20-кратный концентрат буферного раствора для промывки планшетов и разведения сывороток (**ФСБТ**), прозрачная жидкость, бесцветная или с желтоватым оттенком, $25,0 \text{ см}^3$ – 3 флакона;

6). Субстратный раствор (**СР**) с хромогеном, бесцветная прозрачная жидкость, $25,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон;

7). **Стоп-раствор**, бесцветная прозрачная жидкость, $25,0 \text{ см}^3$ – 1 флакон.

3. Набор «БЛЮТАНГ-СЕРОТЕСТ» предназначен для выявления антител к вирусу блютанга в сыворотке крови больных, подозреваемых на заболевание, экспериментально зараженных и вакцинированных животных (крупного рогатого скота, овец и коз). Набор позволяет выявлять пробы с низким содержанием антител.

Набор рассчитан на проведение на одном планшете одновременного анализа 46 исследуемых проб сывороток (в 2 повторах) и двух контрольных проб (в 2 повторах). Компоновка набора допускает возможность дробного использования компонентов для проведения нескольких серий анализов по мере поступления биоматериала.

4. Упаковка и маркировка

Компоненты набора расфасовывают в пластиковые (стеклянные), герметично укупоренные флаконы (пробирки) соответствующей вместимости.

Пластиковые флаконы (пробирки) укупоривают завинчивающимися или защелкивающимися пластиковыми крышками. Стеклоаные флаконы укупоривают резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми или пластиковыми завинчивающимися колпачками.

На флаконы (пробирки) с каждым компонентом наклеивают этикетки с указанием:

Названия и/или товарного знака организации-производителя и разработчика, краткого названия набора, краткого названия компонента, его номера, количества в упаковке, номера серии, номера контроля, срока годности (месяц и год).

Полистироловые планшеты упаковывают в индивидуальные полиэтиленовые пакеты. На пакеты наклеивают этикетки с указанием: названия и/или товарного знака организации-производителя и разработчика, краткого названия набора, названия адсорбированного компонента, номера серии и контроля, срока годности.

Флаконы (пробирки) с компонентами набора и планшеты упаковывают в картонные или пластиковые коробки с наличием гнезд.

На каждую коробку с диагностическим набором наклеивают этикетку, в которой указывают: страну, город, название и/или товарный знак организации-производителя и разработчика, полное название набора, номер серии и номер контроля, дату изготовления (месяц и год), срок годности (месяц и год), условия хранения, регистрационный номер, знак соответствия в системе ГОСТ Р, обозначение нормативного документа, надпись «для животных». В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

5. Срок годности компонентов набора - 12 месяцев от даты изготовления при условии хранения и транспортирования их в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C. Не допускается замораживание компонентов набора (кроме сывороток)! Запрещается смешивать компоненты наборов разных серий, переливать в другую посуду и использовать набор по истечении срока годности.

Флаконы без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Планшеты и контрольные сыворотки обеззараживают 3% раствором хлорамина. Остальные компоненты набора не требуют специальных мер утилизации.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для проведения ИФА используют: одно- и многоканальные микропипетки переменных объемов со сменными наконечниками, мерную лабораторную посуду, дистиллированную или деионизованную воду, суховоздушный термостат с температурой 37°C, спектрофотометр с вертикальным лучом света длиной волны 450 нм, липкую пленку.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

6. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного в лунках планшета белка VP7 вируса блютанга со специфическими антителами из сыворотки крови и последующем выявлении связавшихся антител белком VP7, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат). Пероксидаза в составе конъюгата вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству конъюгата и, соответственно, антител в определяемой пробе.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

7. Подготовка к исследованиям

7.1. Подготовка биологического материала

Для анализа используют сыворотку крови крупного рогатого скота, овец и коз. Если анализ проводят в течение 24 ч после отбора проб, образцы биоматериала хранят при температуре 4°C. Для более длительного хранения образцы замораживают при температуре минус 20°C. Перед исследованием замороженные образцы в течение 5-10 мин нагревают в водяной бане при температуре 37°C.

В случае выпадения осадка в пробах сыворотки крови их обязательно осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 2000g.

Не рекомендуется исследование проросших и гемолизированных проб, а также многократное замораживание и оттаивание образцов сыворотки крови.

7.2. Подготовка рабочих растворов

7.2.1. Перед началом работы все реагенты выдерживают не менее 30 мин при комнатной температуре (20-25°C) и тщательно перемешивают.

ВНИМАНИЕ. При неоднократном использовании компонентов набора контрольные сыворотки рекомендуется расфасовать по 120 мкл в отдельные пробирки типа Эппендорф и хранить до следующего анализа при температуре минус 20°C. Другие компоненты, оставшиеся после частичного использования, должны храниться плотно закрытыми в упаковке производителя.

7.2.2. Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов и разведения сывороток (ФСБТ). Содержимое флакона № 5 разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой. (Пример: для получения 500 мл рабочего раствора к 25 мл концентрата добавляют 475 мл воды). Следует иметь в виду, что для обработки одного стрипа требуется примерно 30 мл рабочего раствора. Рабочий раствор стабилен при температуре 4⁰С в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при температуре минус 20⁰С.

7.2.3. Остальные компоненты набора: положительный (К⁺, флакон №2) и отрицательный (К⁻, флакон №3) контроля, раствор конъюгата (флакон №4), субстратный раствор (СР, флакон №6) и стоп-раствор (флакон №7) - готовы к применению.

8. Проведение анализа

8.1. В лунки А1-В1 и С1-Д1 вносят по 100 мкл контрольных проб (К⁺, К⁻).

В остальные лунки планшета вносят по 50 мкл рабочего раствора ФСБТ (п. 7.2.2.) и по 50 мкл испытуемых проб сыворотки крови. При внесении образцов в лунки содержимое тщательно перемешивают пипетированием. Рекомендуется исследовать каждую пробу в двух повторах.

Закрывают планшет липкой пленкой и инкубируют 1 ч при температуре 37⁰С.

8.2. Планшет 6 раз промывают рабочим раствором ФСБТ, подготовленным по п. 7.2.2, на автоматическом промывающем устройстве или вручную, каждый раз доверху заполняя лунки (300 мкл на лунку) и полностью удаляя жидкость постукиванием перевернутого планшета по фильтровальной бумаге.

ВНИМАНИЕ. При этой операции возможно выпадение стрипов из рамки! Рекомендуется промаркировать стрипы для восстановления их первоначального расположения.

8.3. В каждую лунку вносят по 100 мкл конъюгата. Планшет закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 ч при температуре 37⁰С.

8.4. Планшет 6 раз промывают рабочим раствором ФСБТ (см. этап 8.2).

8.5. В каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного раствора. Планшет инкубируют 15 минут в темноте при комнатной температуре.

8.6. Останавливают реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора.

8.7. После остановки реакции оптическую плотность субстратной смеси измеряют на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм (А₄₅₀).

9. Учет и интерпретация результатов

9.1. Вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности отрицательного и положительного контролей (А₄₅₀ К⁻ и А₄₅₀ К⁺).

Вычисляют *cut off* (отсекающее значение), необходимое для правильной интерпретации результатов реакции:

$$cut\ off = 0,15 \times A_{450}K^+$$

Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

$$A_{450}K^+ > 0,8$$

$$A_{450}K^- < cut\ off$$

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют.

Если А₄₅₀ отрицательного и положительного контролей соответствуют вышеуказанным критериям, то далее проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

9.2. Вычисляют среднее значение А₄₅₀ (если пробу исследовали в двух повторах) для каждой опытной пробы (А₄₅₀ОП).

Пробу считают отрицательной, если А₄₅₀ОП меньше *cut off*

Пробу считают положительной, если А₄₅₀ОП больше *cut off*

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

10. Работу с компонентами набора следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При попадании их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды

11. Запрещается прием пищи и воды, курение в помещении, где проводятся работы с компонентами набора.

12. Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим» совместно с фирмой INGENASA (Испания). Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16.

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу инструкция по применению набора для выявления антител к вирусу блютанга иммуноферментным методом «БЛЮТАНГ-СЕРОТЕСТ», утвержденная Россельхознадзором 09. 12. 2008 г.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ
Регистрационный номер ПВР-1-7.8/02296